

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

**ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRE YARDIMLI
DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZ**

Dr. Özgür SUNAY

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2010

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRE YARDIMLI DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZ

UZMANLIK TEZİ

Dr. Özgür SUNAY

Danışman Öğretim Üyesi: Prof Dr. Mustafa YILMAZ

**Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından
2008294 talep no ile desteklenmiştir.**

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET	1
2. İNGİLİZCE ÖZET	3
3. GİRİŞ VE AMAÇ	5
4. GENEL BİLGİLER	10
4.1. KEMİK YAPISI VE ORGANİZASYONU.....	10
4.2. KEMİK MATRİKSİ	12
4.2.1. Organik bölüm.....	12
4.2.2. İnorganik bölüm.....	13
4.3. KOMPAKT (KORTİKAL, DENS) KEMİK DOKUSU VE YAPISI.....	13
4.3.1. Periosteum.....	15
4.3.2. Endosteum.....	16
4.4. SPONGİYÖZ KEMİK DOKUSU(TRABEKÜLLÜ KEMİK).....	16
4.5. KEMİK DOKUNUN HÜCRELERİ.....	16
4.5.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	17
4.5.2. Osteoblastlar.....	17
4.5.3. Osteositler.....	18
4.5.4. Osteoklastlar.....	19
4.6. KEMİK TÜRLERİ.....	20
4.6.1. Birincil Kemik Dokusu.....	21
4.6.2. İkincil Kemik Dokusu.....	22
4.7. KEMİK HİSTOGENEZİ (KEMİK OLUŞUMU).....	22
4.7.1. İntramembranöz Kemik Oluşumu.....	22
4.7.2. Kondral Kemikleşme.....	23
4.7.2.1. Perikondral Kemikleşme.....	24
4.7.2.2. Enkondral Kemikleşme.....	24
4.8. KEMİĞİN HASARLANMAYA YANITI (KIRIK İYİLEŞMESİ).....	26
4.9. KIRIK İYİLEŞMESİNİN REGÜLASYONU.....	32
4.9.1. Prostaglandinler.....	32
4.9.2. Kemik Uyarıcı Faktörler.....	33
4.10. DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZ TANIMI VE GELİŞİM SÜRECİ.....	36
4.10.1. Osteotomi Kuralları ve Osteotomi Seviyesinin Belirlenmesi.....	44
4.10.2. Distraksiyon Osteogenezin Biyolojik Temeli.....	45
4.10.2.1. Distraksiyon Histogenezi.....	51
4.10.3. Distraksiyon Osteogenezde Olası Komplikasyonlar.....	51
4.11. KÖK HÜCRE TANIMI, ÖZELLİKLERİ VE ELDE EDİLMESİ.....	54
4.11.1. Embriyonik Kök Hücreler.....	55
4.11.2. Erişkin Kök Hücreler.....	57
4.11.2.1. Mezenkimal Kök Hücreler.....	63

4.11.2.2. Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları.....	65
4.11.3. Klinik Uygulamalar.....	70
4.11.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Açısından Avantajları.....	70
4.11.4. Adipoz Kökenli Kök Hücreler.....	72
4.11.5. Doku Mühendisliği.....	73
4.11.6. Histolojik Genel Bilgiler.....	74
4.12. DENEY HAYVANI (TAVŞAN) BACAĞI ANATOMİSİ.....	76
5. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	78
5.1. DENEY HAYVANLARININ BAKIMI.....	81
5.2. CERRAHİ YÖNTEM.....	86
5.2.1. Adipoz Doku Elde Edilmesi.....	86
5.2.2. Distraktör Takılması.....	87
5.2.3. Distraksiyon İşlemi.....	90
5.3. KÖK HÜCRE ELDE EDİLMESİ.....	91
5.3.1. Tavşan Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi.....	91
5.3.2. Kök Hücrelerin Pasajlanması ve Sayılması.....	93
5.3.3. Elde Edilen Kök Hücrelerin Görüntülenmesi.....	94
5.3.4. Kök Hücrelerin Akım Sitometre (FACS) ile Sayılması.....	94
5.3.5. Kök Hücrelerin Yeşil Floresan Protein (GFP) ile İşaretlenmesi.....	95
5.3.6. Kök Hücrelerin Diferansiyasyonu (Farklılaşması).....	96
5.4. DEĞERLENDİRME.....	100
5.4.1. Radyolojik Değerlendirme.....	100
5.4.2. Biyomekanik Değerlendirme.....	102
5.4.3. Histopatolojik Değerlendirme.....	103
5.4.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	106
6. BULGULAR.....	107
6.1. AKIM SİTOMETRE (FACS) SONUÇLARI.....	107
6.2. BİYOMEKANİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	108
6.3. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI.....	111
6.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME.....	117
SONUÇLARI.....	
6.4.1. Işık Mikroskopik Bulgular.....	117
6.4.2. Histolojik Sayısal Değerlendirme.....	129
6.4.3. İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler.....	131
7. TARTIŞMA.....	135
8. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	169
9. KAYNAKLAR.....	171

TABLO LİSTESİ

TABLO 1: KEMİK DOKUSU HÜCRELERİ VE ÖZELLİKLERİ	12
TABLO 2: KAYNAĞINA, FARKLANMA YETENEĞİNE VE KÖKEN VERİŞLERİNE GÖRE KÖK HÜCRELERİN SINIFLARI	54
TABLO 3: KÖK HÜCRE TANIMLAMALARINDA KULLANILAN KISALTMALAR VE ANLAMLARI	55
TABLO 4: KÖK HÜCRE KAYNAKLARI VE ÜRETİLEN HÜCRELER	58
TABLO 5: YETİŞKİNDE MKH KAYNAKLARINA ÖRNEKLER	62
TABLO 6: MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KARAKTERİZASYONUNDA KULLANILAN BAŞLICA FARKLILAŞMA PROTOKOLLERİ	68
TABLO 7: DENEY GRUPLARININ ÖZELLİKLERİ	80
TABLO 8: DİSTRAKSİYON SÜRECİNİN ŞEMATİK GÖRÜNÜMÜ	83
TABLO 9: GRUP II VE GRUP III İÇİN DENEYİN ALGORİTMİ	85
TABLO 10: RADYOLOJİK SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN MODİFİYE LANE VE SANDHU SKORLAMASI	101
TABLO 11: HER ÜÇ GRUPTA SAPTANAN BİYOMEKANİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI	110
TABLO 12: GRUPLARIN ALDIĞI RADYOLOJİK SKOR ORTALAMALARI	115
TABLO 13: GRUPLAR ARASI KALLUS ALANI VE DİSTRAKSİYON ALANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	116

ŞEKİL LİSTESİ

ŞEKİL 1: ÖĞÜTÜLEREK ÇOK İNCELTİLMİŞ KURU KEMİĞİN MİKROSKOBİK FOTOĞRAFI.....	10
ŞEKİL 2: A: KORTİKAL KEMİĞİN VE SÜNGERİMSİ KEMİĞİN TRABEKÜLER KAFES YAPISINI GÖSTEREN KALIN KEMİK KESİTİ. B: TİPİK, GELİŞİGÜZEL KOLLAJEN LİF DAĞILIMI SERGİLEYEN SÜNGERİMSİ KEMİK KESİTİ	11
ŞEKİL 3: KEMİK DOKUSUNDAKİ KANALLAR SİSTEMİ	14
ŞEKİL 4,5: HAVERS SİSTEMİ (OSTEON) KESİTİ.....	14
ŞEKİL 6: KEMİĞE AİT LAMELLERİ GÖSTEREN UZUN KEMİK DİYAFİZ DUVARININ ŞEMATİK ÇİZİMİ.....	15
ŞEKİL 7: OSTEOPROGENİTÖR HÜCRELERİN FARKLILAŞMASI.....	17
ŞEKİL 8: YANYANA DİZİLMİ OSTEOLAST HÜCRELERİ	18
ŞEKİL 9: HİDROKSİAPATİT KRİSTALLERİ İLE KEMİK FORMASYONU VE KEMİK MİNERAL BİLEŞENLERİ.....	18
ŞEKİL 10: İKİ OSTEOSİT VE HAVERS SİSTEMİNİN ŞEMATİK ÇİZİMİ.....	19
ŞEKİL 11: SİTOPLAZMİK UZANTILARI İLE BİRLİKTE KEMİK MATRİKSİNİN SARDIĞI BİR OSTEOSİTİ GÖSTEREN KEMİK DOKU KESİTİ	19
ŞEKİL 12: KEMİK DOKUSUNU SİNDİREN ÜÇ OSTEOKLAST	20
ŞEKİL 13: BİRİNCİL KEMİK DOKUSU OLUŞUMU.....	21
ŞEKİL 14: İNTRAMEMBRANÖZ KEMİKLEŞME	23
ŞEKİL 15: İNTRAKARTİLAGİNÖZ KEMİKLEŞME	24
ŞEKİL 16: HİYALİN KIKIRDAK MODEL ÜZERİNDE BİR UZUN KEMİĞİN MEYDANA GELİŞİ.....	25
ŞEKİL 17: KIKIRDAK MATRİKS	25
ŞEKİL 18: KIRIK İYİLEŞMESİ SÜRECİ.....	27
ŞEKİL 19: KEMİK ONARIM EVRELERİ	27
ŞEKİL 20: KIRIK HEMATOMU	28
ŞEKİL 21: PERİOSTTAN VE ENDOSTEUMDAN HÜCRE ÇOĞALMASIYLA YENİ BİR KEMİK DOKUSU OLUŞMASI SAYESİNDE KIRIK BİR KEMİĞİN ONARILMASI.....	31
ŞEKİL 22: İLİZAROV TİPİ DİSTRAKTÖR	37
ŞEKİL 23: İLİZAROV'UN KLİNİK ÇALIŞMALARI.....	40
ŞEKİL 24: DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZ İŞLEMİ.....	40
ŞEKİL 25: İLİZAROV TİPİ DİSTRAKTÖRÜN UNİLATERAL DİSTRAKTÖR İLE KARŞILAŞTIRILMASI.....	42
ŞEKİL 26: OSTEOTOMİ VE LATENT PERİYOT.....	47
ŞEKİL 27: DİSTRAKSİYON ALANININ ORTASINDA RADYOLUSENT FİBRÖZ İNTERZONLAR OLUŞUMU.....	49
ŞEKİL 28: KONSOLİDASYON PERİYODU.....	50
ŞEKİL 29: BAZI ERİŞKİN KÖK HÜCRELERİN VÜCUTTA BULUNDUKLARI YERLER.....	60
ŞEKİL 30: HEMATOPOETİK VE STROMAL KÖK HÜCRE FARKLILAŞMASI	61
ŞEKİL 31: ERİŞKİN KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMASI.....	61
ŞEKİL 32: MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMA KAPASİTESİ.....	64
ŞEKİL 33: İNSAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ.....	65
ŞEKİL 34: ADİPOJENİK, OSTEOPJENİK VE KONDROJENİK FARKLILAŞMA.....	67
ŞEKİL 35: FLORESAN DESTEKLİ HÜCRE SAYIMI	69
ŞEKİL 36: MEZENKİMAL KÖK HÜCRE YÜZEY BELİRTEÇLERİ	70
ŞEKİL 37: ADİPOZ KÖKENLİ KÖK HÜCRELERİN FARKLILAŞMA POTANSİYELLERİ.....	72
ŞEKİL 38: TEMEL DOKU MÜHENDİSLİĞİ PRENSİBİ	73
ŞEKİL 39: BAĞ DOKULARI VE ADİPOZ DOKUNUN HİSTOLOJİK GÖRÜNÜMÜ.....	75
ŞEKİL 40,41: TAVŞAN ARKA BACAK KASLARI.....	77
ŞEKİL 42: KÖK HÜCRE ELDE EDİLMESİ.....	93
ŞEKİL 43: KÖK HÜCRELERİN YÜZEY BELİRTEÇLERİNİN (MARKER) İŞARETLENİP SAYILMASI (TAGGING).....	95
ŞEKİL 44: KÖK HÜCRELERİN AKIM SİTOMETRE İLE SAYIM SONUÇLARI	107
ŞEKİL 45: AKIM SİTOMETRE SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	108
ŞEKİL 46: BİYOMEKANİK DEĞERLENDİRME SONUÇLARI	109
ŞEKİL 47: ÜÇ NOKTA KIRMA TESTİNDE ALINAN MAKSİMUM YÜKLENME ORTALAMALARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	110
ŞEKİL 48: RADYOLOJİK SKOR ORTALAMALARININ GRAFİKSEL KARŞILAŞTIRILMASI.....	115
ŞEKİL 49: GRUPLARIN KALLUS DOLULUK ORANLARININ KARŞILAŞTIRILMASI	116
ŞEKİL 50: GRUPLAR ARASI HÜCRE SAYIMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	130

ŞEKİL 51: GRUPLAR ARASI KEMİK-KIKIRDAK ALAN ÖLÇÜMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	130
ŞEKİL 52: KEMİK-KIKIRDAK ALAN HESAPLAMASI.....	130
ŞEKİL 53: İMMÜNOHİSTOKİMYASAL DEĞERLERİN KARŞILAŞTIRILMASI	134

RESİM LİSTESİ

RESİM 1: TAVŞAN TİBİASI VE İLİŞKİLİ KASLAR.....	76
RESİM 2: DENEYDE KULLANILAN DİSTRAKTÖRÜN GÖRÜNÜMÜ	79
RESİM 3: DİSTRAKTÖRDE KULLANILAN DELİKLİ VİDA, SOMUN VE PUL	79
RESİM 4: A: DENEYDE KULLANILAN MALZEMELER B: ANESTEZİK ANALJEZİK VE PROFİLAKTİK AMAÇLA KULLANILAN İLAÇLAR	80
RESİM 5: DENEY HAYVANLARININ LABORATUVAR ORTAMI.....	81
RESİM 6: ÇALIŞMA SIRASINDA GELİŞTİRLEN ÇUVAL PANSUMAN.....	81
RESİM 7: YAĞ ALINMA İŞLEMİ ÖNCESİ DENEĞİN HAZIRLANMASI	86
RESİM 8: STERİL OPERASYON ALANININ HESAPLANMASI VE İNSİZYON	86
RESİM 9: ELDE EDİLEN YAĞ DOKULARININ SERUM İLE YIKANDIKTAN SONRA STERİL KABA ALINMASI	86
RESİM 10: KANAMA KONTROLÜNÜN ARDINDAN İNSİZYONUN KAPATILMASI	87
RESİM 11: K TELLERİNİN GEÇİRİLECEĞİ ALANLARIN SAPTANMASI İÇİN YAPILAN ÖN ÇALIŞMA.....	88
RESİM 12: TİBİAYA “K” TELLERİNİN PERKUTAN TAKILMASI.....	88
RESİM 13: İLK HALKANIN ÜST İKİ “K” TELİ ARASINA YERLEŞTİRİLMESİ.....	88
RESİM 14: DİSTRAKTÖRÜN TİBİAYA YERLEŞTİRİLMİŞ HALİ.....	88
RESİM 15: DİSTRAKTÖRÜN TAKILMASININ ARDINDAN OSTEOTOMİ BÖLGESİNİN SAPTANMASI	89
RESİM 16: DENEĞİN OSTEOTOMİ UYGULANMIŞ TİBİASI.....	89
RESİM 17: DİSTRAKTÖRÜN TAKILMASININ ARDINDAN PANSUMAN YAPILDI.....	89
RESİM 18: 0.7 MM/GÜN OLACAK ŞEKİLDE 15 GÜN DİSTRAKSİYON UYGULANDI.....	90
RESİM 19: DİSTRAKSİYON SÜRECİNDE DENEKLER	90
RESİM 20: YAĞ DOKUSUNUN MİNS EDİLME İŞLEMİ.....	92
RESİM 21: YAĞ DOKUSUNUN PETRİ KABI İÇERİSİNDE KÜÇÜK PARÇALAR HALİNE GETİRİLMESİ.....	92
RESİM 22: KOLLAJENAZ EKLENMESİNİN ARDINDAN YAĞ DOKUNUN VORTEKSLENMESİ	92
RESİM 23: ÇALKALAMALI SU BANYOSU	92
RESİM 24: İŞLEMLERİN SONUCUNDA ELDE EDİLEN PELLET	92
RESİM 25: HÜCRELERİN EKİLDİĞİ FLASKLARIN İNKÜBATÖRÜN İÇERİSİNDEKİ GÖRÜNÜMÜ	93
RESİM 26: HÜCRELERİN HEMOSİTOMETRE İLE SAYILMASI	94
RESİM 27: IŞIK MİKROSKOBUNDA YILDIZSI UZANTILARI OLAN KÖK HÜCRELERİN GÖRÜNTÜLENMESİ.....	94
RESİM 28: TRANSFEKSİYON SONRASI İŞARETLİ KÖK HÜCRELERİN İMMÜNOFLORESAN MİKROSKOP İLE IŞIMALARININ GÖSTERİLMESİ.....	96
RESİM 29: DİFERANSİYE KÖK HÜCRELERİN GÖRÜNÜMÜ	96
RESİM 30: ALİZARİN RED BOYASI UYGULANMIŞ MKH’LER	97
RESİM 31: ALİZARİN RED BOYASI İLE KIRMIZIYA BOYANMIŞ KALSİYUM DEPOZİTLERİ.....	97
RESİM 32: KÖK HÜCRE ENJEKSİYONU ÖNCESİ DENEKLERİN ANESTEZİSİ SAĞLANDI	99
RESİM 33: KÖK HÜCRE ENJEKSİYONU BİR DAKİKA İÇİNDE YAVAŞ YAVAŞ YAPILDI	99
RESİM 34: ENJEKTÖRÜN UYGUN POZİSYONU GRAFİYLE GÖRÜNTÜLENDİ	99
RESİM 35: DENEKLERİN RADYOLOJİK GÖRÜNTÜLENMESİ	101
RESİM 36: KALLUS DOLULUK MİKTARLARININ BELİRLENMESİ	102
RESİM 37: ÜÇ NOKTA KIRMA (BENDING) TESTİNİN UYGULANIŞI	103
RESİM 38: SAKRİFİKASYONUN ARDINDAN İNCELEME İÇİN ÜÇ SANTİMETRE KEMİK DOKUSU EKŞİZE EDİLDİ.....	104
RESİM 39: DİFERANSİYASYON GRUBUNDAKİ DENKLERİN (GRUP III) 1., 4. VE 8. HAFTALARDAKİ RADYOLOJİK GÖRÜNÜMLERİ.....	112
RESİM 40: KÖK HÜCRE GRUBUNDAKİ (GRUP II) DENEKLERİN 1., 4. VE 8. HAFTALARDAKİ RADYOLOJİK GÖRÜNÜMLERİ.....	113
RESİM 41: KONTROL GRUBUNDAKİ (GRUP I) DENEKLERİN 1., 4. VE 8. HAFTALARDAKİ RADYOLOJİK GÖRÜNÜMLERİ.....	114
RESİM 42,43,44,45: GRUP I’E AİT HİSTOLOJİK İNCELEME RESİMLERİ	118
RESİM 46,47,48,49,50,51: GRUP II’YE AİT HİSTOLOJİK İNCELEME RESİMLERİ.....	120
RESİM 52,53,54,55,56,57,58,59,60,61: GRUP III’E AİT HİSTOLOJİK İNCELEME RESİMLERİ	124
RESİM 62,63,64,65,66,67: IMMUNOHİSTOKİMYASAL İNCELEMELERE AİT RESİMLER.....	131

KISALTMALAR

- ADAS:** ADİPOSE DERİVED STEM CELL (ADİPOZ KAYNAKLI KÖK HÜCRE)
- GFP:** GREEN FLUORESCENCE PROTEİN (YEŞİL FLORESAN PROTEİN)
- DO:** DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZ
- ADKKH:** ADİPÖZ DOKU KAYNAKLI KÖK HÜCRE
- MKH:** MEZENKİMAL KÖK HÜCRE
- MSC:** MESENCHİMAL STEM CELL (MEZENKİMAL KÖK HÜCRE)
- AKKH:** ADİPOZ KAYNAKLI (KÖKENLİ) KÖK HÜCRE
- PLA:** PROCESSED LİPOASPIRATE (İŞLENMİŞ LİPOASPIRAT)
- HBMP:** HUMAN BONE MORPHOGENETİC PROTEİN (İNSAN KEMİK ŞEKİLLENDİRİCİ PROTEİNİ)
- AKH:** ADİPOZ KÖKENLİ HÜCRE
- TGF β :** TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR (ŞEKİLLENDİRİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- FGF:** FİBROBLAST GROWTH FACTOR (FİBROBLAST BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- BMP:** BONE MORPHOGENİC PROTEİN (KEMİK ŞEKİLLENDİRİCİ PROTEİN)
- IGF:** INSULİN-LİKE GROWTH FACTOR (İNSÜLİN BENZERİ BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- PG:** PROSTOGLANDİN
- PGE2:** PROSTOGLANDİN E2
- PGI2:** PROSTOGLANDİN I2
- PDGF:** PLATELET DERİVED GROWTH FACTOR (PLATELET KÖKENLİ BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- PGF:** PLASENTAL GROWTH FACTOR (PLASENTAL BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- TGF:** TRANSFORMİNG GROWTH FACTOR (TRANSFORME EDİCİ BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- EGF:** EPİDERMAL GROWTH FACTOR (EPİDERMAL BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- CDGF:** CONDROSİT DERIVED GROWTH FACTOR (KONDROBLAST KÖKENLİ BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- MDGF:** MACROPHAGE DERIVED GROWTH FACTOR (MAKROFAJ KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- ECGF:** EPİDERMAL CELL GROWTH FACTOR (EPİDERMAL HÜCRE KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- ECDGF:** ENDOTELIAL CELL GROWTH FACTOR (ENDOTELİYAL HÜCRE KAYNAKLI BÜYÜME FAKTÖRÜ)
- Kİ:** KEMİK İLİĞİ
- EKH:** EMBRİYONİK KÖK HÜCRE
- FCS:** FOETAL CALF SERUM (FÖTAL BUZAĞI SERUMU)
- MSC:** MESENCHİMAL STROMAL CELL (MEZENKİMAL STROMAL HÜCRE)
- MMSC:** MULTIPOTENT MESENCHİMAL STROMAL CELL (MULTİPOTENT MEZENKİMAL STROMAL HÜCRE)
- DMEM:** DULBECCO'S MODIFIED EAGLE SERUM
- FBS:** FETAL BOVINE SERUM
- FACS:** FLUORESCENT ASSISTED CELL SORTER (FLORESAN DESTEKLİ HÜCRE SAYIMI)

CD: CLUSTERS OF DIFFERENTIATION (FARKLANMA KÜMELERİ)

CFU-F: COLONY FORMING UNIT FIBROBLAST (KOLONİ ŞEKİLLENDİRİCİ FİBROBLAST)

TEŞEKKÜR

Plastik ve rekonstrüktif cerrahi eğitiminin oldukça uzun, yorucu, çok emek isteyen ancak bir o kadar da keyifli bir süreç olduğunu düşünüyorum. Kişiliğimin, karakterimin ve cerrahi yeteneklerimin şekillendiği bu sabır isteyen süreçte her zaman yanımda bulunarak bana sonsuz destek olan sevgili eşime ve aileme, deneyimlerini ve bilgilerini benimle paylaşan hocalarım Prof.Dr. Ali Barutçu'ya, Prof. Dr. Can Karaca'ya, Prof.Dr. Atay Atabey'e, Prof. Dr. Mustafa Yılmaz'a, Doç.Dr. Adnan Menderes'e, Doç.Dr Haluk Vayvada'ya ve Yard. Doç.Dr. Cenk Demirdöver'e, son yedi yılımın büyük kısmını beraber geçirdiğim asistan arkadaşlarıma, her zaman yardımlarını gördüğüm anabilim dalı sekreterimiz Tülay Güler başta olmak üzere tüm plastik cerrahi bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Bu tez çalışması birçok kişinin uzun zaman ve emek harcamasıyla meydana gelmiştir. Başta tez danışmanım Prof.Dr. Mustafa Yılmaz olmak üzere tezin tüm aşamalarında bana destek olan ve bu çalışmaya çok fazla emek harcayan Histoloji-Embriyoloji yüksek lisans öğrencisi Ziya Denek'e, İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji bölümü laboratuvarlarında bu çalışmanın yapılmasını kabul eden ve desteğini esirgemeyen Doç.Dr.Yusuf Baran'a ayrıca titiz ve kusursuz çalışmaları ile kök hücre elde edilmesinin her aşamasını büyük başarıyla tamamlayan asistanları Geylani Can ile Zeynep Çakır'a, deneyin cerrahi aşamalarında ve her hafta deneklerin grafiye transportunda beni yalnız bırakmayan asistan arkadaşım Bilgehan İlker'e, biyomekanik çalışmaların yapılmasında yardımlarını esirgemeyen Prof.Dr. Hasan Havıçcıoğlu'na ve biyomekanik bilim dalı çalışanlarına, distraktörlerin üretim ve tedarik aşamasında yardımcı olan Bekir Özdil ve Emir Türemen'e, Histolojik incelemelerin değerlendirilmesinde bilgisini esirgemeyen Doç.Dr. Güven Erbil'e, tezin basım aşamasında emeği geçen Mehmet Güçlü'ye uzun takip süresi boyunca deneklerin sağlıklı ve canlı kalmasında büyük emeği olan Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ı personeli Adem Ulu'ya teşekkür ederim.

1.ÖZET

Başlık: Adipoz Kökenli Kök Hücre Yardımlı Distraksiyon Osteogenez

Araştırmacının Adı, Fakültesi ve Yazışma adresi:

Özgür Sunay

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı İnciraltı-İzmir

Amaç ve Hipotez:

Bu çalışmanın amacı, tavşandan elde edilecek erişkin adipoz kökenli kök hücrelerin osteojenik diferansiyasyonunun sağlanması ve bu diferansiye hücrelerin tavşan tibiasında distraksiyon alanında kullanılarak yeni kemik oluşumuna entegre olması ile daha kısa sürede kemik uzatılmasının başarılmasıdır.

Bu çalışma, tavşan erişkin yağ hücrelerinin in vitro ortamda kültüre edilmesi ve osteojenik medyada diferansiye edilmesinin ardından bu kök hücrelerin Ilizarov distraktörleri takılmış ve osteotomi uygulanmış tavşan tibiasındaki osteotomi alanına verilmesinin yeni kemik oluşumunu hızlandıracağı ve oluşan kemik kalitesini arttıracığı hipotezi üzerine kurulmuştur.

Yöntem:

Çalışmada 21 adet, dişi, ortalama 3 kg ağırlığında Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı. Denekler rastgele olacak şekilde kontrol, kök hücre ve diferansiye kök hücre olmak üzere üç gruba ayrıldı. Grup-I'de sadece sağ tibial osteotomi yapılarak distraktör takıldı ve yedi günlük latent periyodun ardından günde 0,7 mm olmak üzere on beş gün distrakte edildi. Grup-II'de önce deneklerin her iki inguinal bölgesinden yağ dokusu alındı ve in vitro koşullarda kök hücreler elde edildi. Bu kök hücreler plazmid yardımıyla "yeşil floresan protein" (GFP) ile işaretlendi ve distraksiyon işleminin tamamlanmasının ardından GFP işaretli kök hücreler kallus içerisine enjekte edildi. Grup-III'te ise elde edilen GFP işaretli kök hücreler osteojenik

diferansiyasyona uğratıldı ve osteojenik diferansiyasyon sonrası elde edilen “osteoblast benzeri hücreler” kallus dokusu içine enjekte edildi. Haftalık tibia radyografileri çekilen denekler tüm gruplarda sekiz haftalık konsolidasyon süresinin tamamlanmasının ardından sakrifiye edilerek radyolojik, biyomekanik ve histopatolojik açıdan incelendi.

Bulgular:

Radyolojik görüntüleme sonuçları incelendiğinde Grup III’de diğer gruplara göre çok belirgin olmak üzere deney gruplarında kontrol grubuna göre kallus yoğunluğunun ve kemikleşmenin artmış olduğu görüldü. Biyomekanik değerlendirmede de en yüksek değerler Grup III’de saptandı. Histopatolojik incelemelerde yeni oluşan kemik kalitesinin, trabekül hacimlerinin, kemik yapımında görevli hücre sayılarının Grup III’de diğer gruplara göre daha fazla miktarda olduğu görüldü.

Sonuç:

Elde edilen bulgular ışığında adipoz dokudan elde edilen ve osteojenik diferansiyasyon geçiren kök hücreler kullanılarak distraksiyon osteogenez tekniğinin toplam süresinin kısaltılabileceği ve daha kaliteli kemik elde edilebileceği söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: ADAS, Distraksiyon Osteogenez, Adipoz kökenli kök hücre

2.ABSTRACT

Title: Distraction Osteogenesis via Adipose Derived Stem Cells

Name, School and Address:

Özgür Sunay
Dokuz Eylül University School of Medicine Plastic Reconstructive and
Aesthetic Surgery Inciralti-İzmir

Aim and hypothesis:

The aim of this study is to achieve osteogenic differentiation of adult stem cells from rabbit and to accomplish faster bone lengthening via entegration of this cells into new bone.

Materials and Method:

Twenty-one New Zealand rabbits were included in study. Subjects randomly divided to control, stem cell and differentiate stem cell groups (n=7). In Group I, distractor applied right after osteotomy and distraction process finished in 15 days. In Group II, adipose tissue obtained from inguinal region of rabbit, afterwards adipose derived stem cells obtained invitro conditions. This stem cells marked by “*green flourescent protein*” (*GFP*) and injected to callus at the end of distraction process. In Group III stem cells obtained equally to Group II, then differentiation process applied and differentiate cells injected to callus likewise Group II. At the end of eight weeks subjects were sacrificed and evaluated radiologically, biomechanically and histopathologically.

Findings:

Under the scope of the result of radiologically, it was observed that callus density and ossification rate increased in Group III, when compared to the Group I and Group II. According to biomechanical tests, the highest rates was determined in

Group III. In histopathological studies, it was also observed that the quality of newly formed bone and the cells active in bone formation were significantly higher in Group III when compared to the Group I and II

Results

Depending on these results, it can be concluded that, the consolidation period of distraction osteogenesis shortens by applying the adipose derived stem cells of which undergo osteogenic differentiation.

Key letters: ADAS, Distraction Osteogenesis, Adipose derived stem cell

3.GİRİŞ VE AMAÇ

Kemik defektleri genellikle ateşli silah yaralanması veya trafik kazası gibi yüksek enerjili travmalarla oluşan açık kırıklara, malignansi ve enfeksiyonlara sekonder görülür.¹ Kemik kaybı, travma sırasında oluşabileceği gibi, yapılan debridmanlar esnasında da oluşabilir. Bunun dışında, enfeksiyon ya da tümöral nedenlerle yapılan eksizyonlar ya da konjenital sebepler de kemik defektlerinin ortaya çıkmasında rol oynayabilirler.²

Kemik defektlerinin tedavisi için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu amaçla kullanılan başlıca teknikler; otojen spongiyöz kemik grefti, vasküler pediküllü serbest kemik grefti, demineralize allogreft uygulaması, “*spacer*” olarak protez uygulaması ve distraksiyon osteogenezdır.²

Otolog spongiyöz kemik greftleri, düşük dereceli kontamine ortamlarda ve osteomyelite bağlı kavitelelerin doldurulmasında sıklıkla kullanılmakla birlikte, en önemli dezavantajı vücuttan sınırlı miktarda greft elde edilebilmesidir.^{3,4,16} Ayrıca greft donör alanlarında ağrı, hipersensitivite ve parestezi oluşabilmektedir.^{17,18} Ayrıca, bu greft kitlesinin yük taşıyabilecek güce erişebilmesi için çok uzun zamana ihtiyaç vardır. Vasküler pediküllü serbest kemik greftleri ise genellikle altı cm'den büyük kemik defektlerinin tedavisi için kullanılmaktadır. Ancak teknik, cerrahi girişim ve immobilizasyon süresinin uzun olması ve kaynama sorunlarının oldukça sık görülmesi gibi bir çok ciddi sorunu da bünyesinde barındırmaktadır.⁵⁸ Allogreftler, tümöral defektlerin doldurulmasında başarıyla kullanılabilmelerine karşın, bunların kontamine ortamlarda kullanılabilmesi mümkün değildir.² Kemik bankasından alınan homolog greftler donor saha morbiditesi yaratmadan kullanılabilse ve fazla miktarlarda elde edilebilse de viral-bakteriyel enfeksiyon, alıcının muhtemel immün cevabı ve yüksek komplikasyon oranları nedeniyle tercih edilmemektedir.⁵⁸ Hidroksiapatit ya da diğer kalsiyum seramikleri kemik defektlerinin onarımında kullanımıyla elde edilen sonuçlar ile ilgili literatür bilgileri çelişkilidir. Ayrıca bu materyallerin osteoindüktif olmamaları geniş kemik defektlerinin onarımında kullanılmalarını engellemektedir. Kemik defektlerinin onarımında karşılaşılan tüm bu güçlüklerden dolayı bu defektlerin onarımında distraksiyon osteogenezis hala önemini korumaktadır.^{2,3}

1905 yılında Alessandro Codivilla tarafından başlatılan distraksiyon osteogenez ile ilgili çalışmalar, Ilizarov'un çalışmalarıyla yeni bir ivme kazanmıştır. 1950'li yıllarda Gavril Abramovich Ilizarov tarafından uygulanmaya başlayan distraksiyon osteogenez'de teknik, periost ve vasküler yapıyı koruyarak kortikotomi yapılması ve birkaç günlük kısa bir bekleme süresini takiben, sirküler eksternal fiksator sistemi ile yapılan distraksiyonla ossifikasyonun uyarılması prensibine dayanmaktadır.⁹ Ilizarov, distraksiyonun etkilerini açıklayan *Gerim-Stres Teorisi*'ni açıklamıştır. Bu teoriye göre sürekli traksiyon, canlı dokuların birçoğunda aktif büyümeyi stimüle eden stresler oluşturur.^{9,19} Yavaş ve sürekli traksiyon sonucu dokular metabolik olarak aktif hale gelir. Bu aktivasyonun başlıca nedeni, dokuya gelen kan miktarının artması ve fonksiyonel kullanım ile verilen ağırlığın stimülatör etki göstermesidir.

Distraksiyon osteogenez, kemik yapının mekanik olarak uyarılması sonucu, hızlı bir şekilde canlı, lamellar kemik oluşumunu sağlaması sayesinde klasik kemik greftleme tekniklerine alternatif bir yöntemdir.^{2,19,44} Bu şekilde, anatomik bölgeye uygun kemik rejenerasyonu oluşmakta ve kemik grefti uygulamalarında karşılaşılan %20-40 oranındaki kemik grefti kaybı riski de ortadan kalkmaktadır.¹⁵ Ayrıca distraksiyon osteogenez kemiğin doğal büyüme prosesinin kullanımını ve native (primer) kemik oluşumunu sağlamaktadır, ardından primer kemik ortadan kaldırılır ve yerine lamelli sekonder kemik oluşturulur.⁶¹

Uygulama kolay ve etkilidir, hastanede kalma süresi minimaldir. Üç boyutta düzeltme yapılabilir ve fonksiyonel matriks teorisine göre kas, kemik ve yumuşak doku tedavi edilebilir. Greft kullanılmadan travma, hastalık veya genetik sebepli defektler tedavi edilebilir. Yüz kemikleri orijinal boyutlarının % 30'una kadar uzatılabilir. Maksillada ve mandibulada transvers ve antero-posterior düzeltmeler yapılabilir. Operasyon sonrası cerrahi travma, kanama ve şişlik daha az olur.⁵

Distraksiyon osteogenez 4 klinik evrede incelenmektedir:

1. Osteotomi evresi
2. Latent periyot evresi
3. Distraksiyon periyodu evresi
4. Konsolidasyon periyodu evresi

Osteotomi safhası, distraksiyon apareyinin yerleştirilmesi ve distraksiyon yapılacak bölgede kemiğin birbirinden ayrılmasını içerir.^{6,45,46} Latent periyot, osteotomi gerçekleştirildikten ve aparey yerleştirildikten sonra beklenen zamandır ve bu zaman içinde tamir kallusu oluşur. Kabul edilen latent periyot 3-7 gün arasındadır,⁵⁹ fazla beklemek (14-21 gün) prematür konsolidasyona neden olur.⁵⁹ Bu zamandaki histolojik görüntü kırık tamiri esnasındakiyle benzerdir.^{19,44} Endosteal ve periosteal osteogenik hücrelerin proliferasyonu ile birlikte iyi vaskülarize granülasyon dokusu oluşur. Osteogenik hücreler proliferer olur, hasar gören kan damarları tamir edilir ve revaskülarizasyon meydana gelir.⁶

Distraksiyon safhası tamir kallusunu gerilim altında bırakır. Distraksiyon kallus absorpsiyonuna neden olur, bu da iskeletsel büyüme faktörlerinin devamlı olarak aktivasyonunu sağlayarak prekapiller hücrelerin osteogenik hücrelere dönüşmesine yol açar. Yeni kemik oluşumundan sorumlu olduğu düşünülen *Gerim-stres etkisi*'dir. Distraksiyon safhasında aparey uygun oran ve ritimle aktive edilmeye başlanır. Oran; apareye uygulanan günlük aktivasyon miktarı, ritim ise apareye uygulanan günlük aktivasyonun kaç bölüm halinde yapılacağını gösterir.⁶

Dördüncü ve son safha konsolidasyondur. Bu safhada distraksiyon tamamlanmış ve istenilen kemik uzunluğu elde edilmiştir, kemik immobilizedir. Konsolidasyon periyodu fiksasyon periyodudur. Fiksasyon periyodu için kesin bir zaman yoktur ama Ilizarov en azından distraksiyon zamanı kadar fiksasyon yapılması gerektiğini söylemiştir.⁹

Distraksiyon osteogenezin en büyük dezavantajı olan uzun tedavi süresi ve buna bağlı olarak oluşabilen fibröz kaynama, kemiğin kaynamaması, kallus çöküşü, uzama kaybı ya da kemiğin yanlış kaynaması gibi komplikasyonlar^{12,42} nedeniyle

kallus formasyonunu hızlandırmak, konsolidasyon süresini kısaltmak ve daha kaliteli kemik elde etmek amacıyla çeşitli yöntemler uygulanmıştır. Bunların arasında en sık kullanılanlar; düşük enerjili ultrason²⁰, elektrik stimülasyonu^{21,24}, büyüme hormonları, prostaglandin E2⁶², kemik iliği ekstreleri^{63,64}, demineralize kemik matriksi⁶⁵, BMP7 (OP-1), ve TGF β gibi belirli bazı büyüme faktörleridir.²²⁻²⁵

Çalışmaların bazıları ümit verici olsa da bu çalışmaların hiçbirinin insanda etkili sonuçları olabileceği gösterilememiştir. Kullanılan bu yöntemlerin etkilerinin sınırlı ya da yetersiz olması nedeniyle distraksiyon osteogenez'de yeni kemik oluşumunu hızlandırmak amacıyla araştırmacılar, klinik ve deneysel çalışmalarda olumlu sonuçlar vermiş olan kök hücre ile onarım çalışmalarına yönelmişlerdir.²⁶ Kemik iliği, periost, kortikal ya da kansellöz kemikten elde edilen kök hücreler ile distraksiyon osteogenez çalışmaları yapılmıştır.^{10,66,67,122}

Ancak kemik iliği, elde edilmesi ağırlı, genellikle genel anestezi gerektiren ve sağlanan kök hücre miktarı yetersiz olan bir prosedürdür.^{27,38,39,47} Kemik iliği dışında mezenkimal kök hücre elde etmek için, kas³³, perikondrium³⁴, adipoz doku gibi erişkin dokular da^{35,36} kullanılabilir.

Adipoz doku, kemik iliği gibi gelişimsel plastisite özelliği taşıyan ve stromal bölge içerisinde yer alan multipotansiyel kök hücreleri barındırmaktadır.^{40,41} Adipoz kökenli hücreleri (AKH) diğer kök hücrelere göre daha avantajlı kılan özellikleri; dokudan izole edilmelerinin ve kültür ortamında çoğaltılabilmelerinin kolaylığı, yüksek sayılarda ve hızlı bir şekilde elde edilebilmeleri (kemik iliğinden 500 kat daha fazla)⁴⁷ ve dondurularak bankalandıkları zaman fenotipik ve genotipik özelliklerini kaybetmemeleridir.^{7,37}

Uygun farklılaşma koşulları sağlanarak yapılan hücre kültürlerinde, adipoz kökenli hücrelerin yağ, kas, kıkırdak, sinir ve kemik dokusu hücrelerine dönüştürülebildiği gösterilmiştir.⁸ Adipoz kökenli kök hücreler, bazal farklılaşma ajanları olan; askorbik asit, beta gliserolfosfat ve deksametazon'a maruz kaldıklarında osteoblastik özellikler kazanmakta^{8,42}, ekstrasellüler matriks içerisinde kalsiyum hidroksiapatit depolanmasını indüklemekte, osteokalsin, osteonektin, osteopontin, kemik morfojenik proteinleri, tip I kollajen ve alkalen fosfataz gibi

osteojenik proteinleri salgılamakta ve dolayısıyla osteoplastik özellikteki hücelere farklılaşmaları sonucunda kemik dokusu benzeri bir hücre kültürü elde edilebilmektedir.⁸

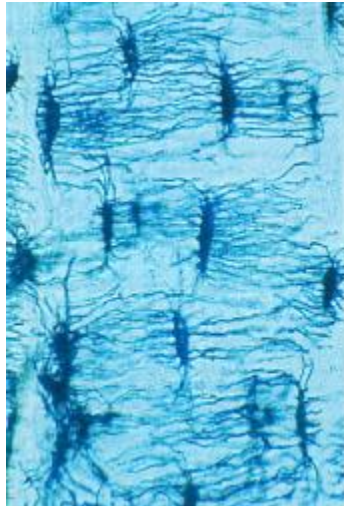
Normal kırık iyileşmesi pluripotent osteoprogenitör hücreler üzerinden yürümektedir ve kırık alanına gelen bu hücreler multipotansiyalite özellikleri sayesinde osteoplastlara dönüşerek kemik iyileşmesi sağlanmaktadır. Bu temel bilgilerden yola çıkılarak yapılan bu çalışma, distraksiyon osteogenez esnasında kırık ortamına dışarıdan hazır adipoz kaynaklı pluripotent kök hücre ve osteojenik yönde farklılaşmış kök hücre verilmesinin distraksiyon işlemi üzerine olan etkilerini araştırma amacı taşımaktadır.

4.GENEL BİLGİLER

Distraksiyon osteogenez işlemi aslında uzatılmış bir kırık iyileşmesidir. Distraksiyon osteogenezin karmaşık fizyopatolojisinin anlaşılabilmesi için kemiğin histolojik yapısının, hasarlanmaya verdiği biyolojik yanıtın ve kırık bölgesine verilecek olan kök hücrelerin moleküler biyolojik yapılarının iyi bilinmesi gerekmektedir.

4.1. Kemik Yapısı ve Organizasyonu

Organizmadaki diğer bağ dokularında olduğu gibi kemik dokusu da hücreler, lifler ve temel maddeden oluşmuş ancak yapısındaki kalsiyumdan ötürü sertleşmiş bir destek dokusudur.⁶⁸ Kemik son derece iyi organize olmuş bir dokudur. Sahip olduğu moleküler, hücresel yapı ve dokusal düzeni dökme demire yakın gerilme gücü sağlar. Bu özelliğinin yanında üç kat hafiftir ve vücut şeklini destekler. Kemik homojen değildir, matriksi organik ve inorganik yapılardan oluşan hücreler arası madde, hücreler ve kanaliküllerden oluşur.⁶⁰ Kemikler iskelet sisteminin en önemli yapıtaşlarıdır, kaslarla beraber vücut hareketini sağlarlar ve sertliğinden dolayı hayati önemi olan organların korunmasını da üstlenmiştir.⁶⁸ (şekil 1)



Şekil 1: Öğütülerek çok inceltilmiş kuru kemiğin mikroskopik fotoğrafı. Hava ile dolu, karanlık görünen laküna ve kanalcıklar, birbirleri arasındaki ilişkileri ve kan damarlarından alınan besin madde akışını gösteriyor.

Kemik dokusu beslenme, metabolik, endokrin ve mekanik koşullara çok duyarlı bir doku olması nedeniyle aktif doku olma özelliğini taşır. Kompakt ve spongiyöz olmak üzere iki ayrı formu olan kemik dokusu organik ve inorganik komponentlerden yapılmıştır.

Kompakt kemik, sıkı dizilimi olan boşluk içermeyen bir dokudur, spongiyöz kemik dokusunun ise gevşek, labirent veya bol boşluklu tarzda bir görünümü vardır (Şekil 2). Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Kemik dokusu kıkırdak dokusunun aksine bol damarlıdır ancak matriksinin sert olması diffüzyona elverişli değildir, dolayısıyla dokunun beslenmesi kanaliküllerle olmaktadır. Bu kanaliküllerin içinde kemik hücreleri yerleşiktir.⁶⁸



Şekil 2: A: Kortikal kemiği ve süngerimsi kemiğin trabeküler kafes yapısını gösteren kalın kemik kesiti. B: Tipik, gelişigüzel kollajen lif dağılımı sergileyen süngerimsi kemik kesiti

Kemik dokusu hücreler arası kalsifiye materyal olan kemik matriksi ve dört tür hücreden; mezenkimal kaynaklı mitoz yeteneği olan osteoprogenitör hücreler, matriks içinde laküna adı verilen boşluklarda bulunan osteositler, matriksin organik kısımlarının sentezini yapan osteoblastlar ile kemiğin absorpsiyonu ve yeniden modellenmesinden sorumlu olan çok çekirdekli osteoklastlardan oluşmuştur. (Tablo1)

Hücre Tipi	Özelliği	Liflerin Özelliği	Matriks Özelliği
Osteoprogenitör Hücre	Yassı şekilli, soluk boyanmış nükleuslu hücrelerdir, mitoz yaparlar	Tip I kollajenlerdir. Lifler belirli aralıklarla düzgün bir dizilim gösterir. Bu aralıklara hidroksiapatit kristalleri çökmüştür	Sert ve yoğun bir matriks vardır. Yapıya kalsiyum çökmüştür. Kanal sistemi çok iyi gelişmiş olup, burada damarlar yerleşiktir(Havers, Volkmann). Hücrelerin metabolizması kanalikül sistemiyle gerçekleşir. Kemik dokunun, Kompakt (sıkı dizilimli) ve Spongiyöz (trabeküllü veya boşluklu) olmak üzere iki formu bulunur
Osteoblast	Kübik veya piramidal şekilli, uzantılı hücrelerdir. Kemik yapımında rol oynarlar. Sitoplazma koyu bazofilik ve granüllüdür.		
Osteosit	Oval şekilli, lipid, glikojen ve pigment içeren hücrelerdir. Mitoz yapmazlar. Uzantılı hücrelerdir		
Osteoklast	Kemik yıkımını (rezorbsiyon) sağlayan hücrelerdir. Çok sayıda nükleus içerirler, sitoplazmada bol lizozom bulunur. Yıkım için kullanılan Kollagenaz ve proteolitik enzimleri salgırlarlar.		

Tablo 1:Kemik dokusu hücreleri ve özellikleri

Bütün kemiklerin iç ve dış yüzeyleri, kemik yapan ve tamir eden hücreleri içeren, iç yüzeylerde endosteum, dış yüzeylerde periost'un oluşturduğu doku tabakaları ile örtülüdür.⁶⁹

4.2. Kemik Matriksi

4.2.1 Organik bölüm

Bu yapının büyük bölümü kollajen liflerden (%90 Tip 1), protein, lipid ve glikozaminoglikanlardan oluşan temel maddeden (ground substance) yapılmıştır. Gelişmiş bir kemik dokuda lifler paralel ve belirli aralıklarla aralarında porlar bırakacak şekilde yerleşmiş olup aralarında hidroksiapatit kristalleri yerleşiktir.⁶⁸ Hidroksiapatit kristallerinin yüzeyindeki iyonlar su ile karışıktır ve kristalin etrafında

su ve iyon tabakası oluşturur. Hidratasyon kabuğu denilen bu tabaka kristaller ile vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırır.⁶⁹

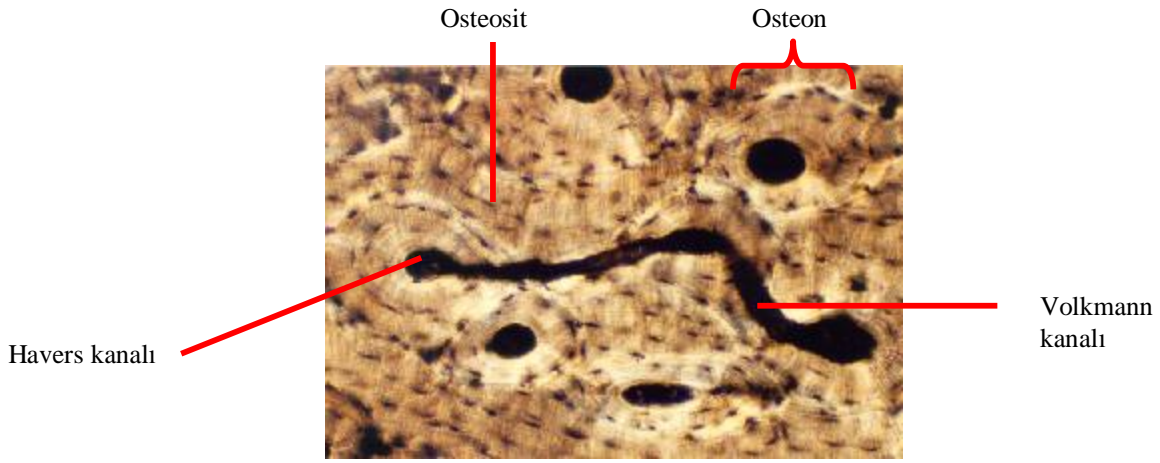
4.2.2. İnorganik Bölüm

İnorganik maddelerin başında kalsiyum, fosfat, sitrat, magnezyum gibi maddeler gelir. Kalsiyum ve fosfat hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kemik kollajenlerinin yanında amorf madde ile birlikte içiçe organize olmuşlardır. Hidroksiapatit kristallerinin ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_2$) kemikteki önemi, kollajenlerle beraber kemik sertliğini ve dayanıklılığını sağlamasıdır. İnorganik maddeler kemiğin kuru ağırlığının yaklaşık %65'ini oluşturmaktadırlar.⁶⁸

Minerallerin kollajen liflerle ilişkisi, kemik dokusunun sertliği ve direncinden sorumludur. Kemiğin kalsiyumu ortadan kaldırıldığında, şeklini korur, ancak tendon kadar esnek bir hale gelir. Çoğu kollajenden oluşan matriksin organik kısımları çıkarıldığında, kemik yine orijinal şeklini korur, ama kırılğan hale gelir, dokunulduğunda kırılır ve ufalanır.⁶⁹

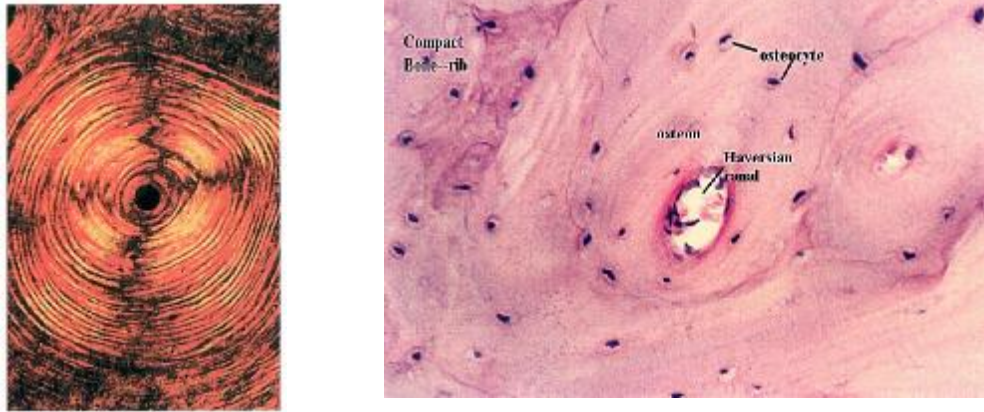
4.3. Kompakt (Kortikal, Dens) Kemik Dokusu ve Yapısı

Kompakt kemik küboid kemiklerde örtü gibi bulunur ve uzun kemiklerin diafizlerini oluşturur. Kortikal kemik bükülme, dönme ve kompresif güçlere maruz kalır.⁶⁰ Kortikal kemik dokusu içinde kemiğin uzun eksenine boyunca ve birbirine paralel olarak uzanan kanallar mevcuttur. Bu kanallara *Havers kanalları* denir (Şekil 3). Havers kanalları içinde bağ dokusu ile çevrili nörovasküler yapılar bulunur. Kompakt bir kemiğin mikroskopik incelemesinde dokunun Havers kanalları etrafında 3-7 µm kalınlıktaki lamellerden, hücrelerden ve sert bir matriksten oluştuğu görülür.



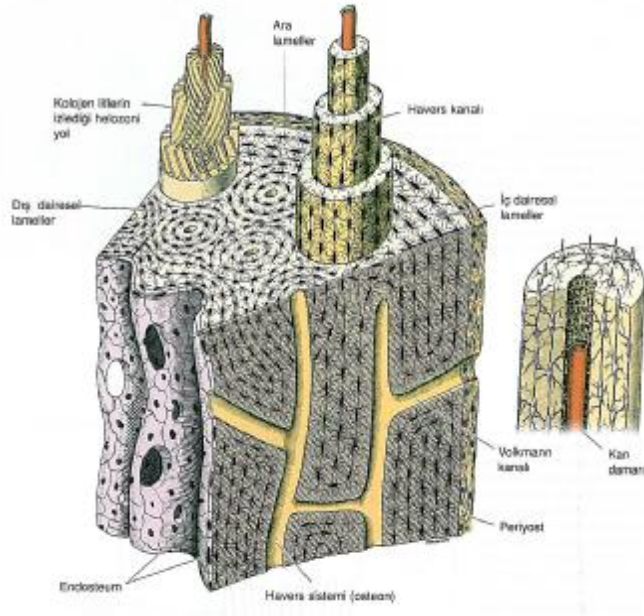
Şekil 3: Kemik dokusundaki kanallar sistemi

Bir Havers kanalıyla onun etrafındaki lamellerin tümüne birden kemiğin primer yapısal birimi olan osteon adı verilir (Şekil 4,5). Bir Havers kanalı yan dallarla kemik iliği ve periosteumla bağlantı kurar. Bu yan dallara Volkmann Kanalları adı verilir. Haversteki damarlar longitudinal tertiplenmiş olup yan dallarıyla da komşu damarlarla temastadırlar. Havers kanalı 20-100 µm çapındadır ve 1-2 adet damar içerir.



Şekil 4,5: Havers sistemi (osteon) kesiti

Damarlar genellikle kapiller, postkapiller venül veya seyrek olarak arteriol olabilir. Sert bir matrikse sahip olan kemik dokusunda diffüzyon olanağı olmadığından kanal ve kanaliküllerle kemiğin dışından içine kadar ilişki kurulur ve bu şekilde metabolizma için gerekli maddeler damar ve kanaliküllerle hücrelere kadar ulaşır (Şekil 6).⁶⁸



Şekil 6: Kemiğe ait lamelleri gösteren uzun kemik diyafiz duvarının şematik çizimi

4.3.1 Periosteum

Bağ dokusundan yapılmış olan bu tabaka eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreler. Periosteumun kemiğe desteklik yapmasında, beslenmesinde, gelişiminde ve tamir olaylarında büyük önemi vardır. Yapısında kollajen ve elastik lifler bulunur. Ayrıca *Sharpey lifleri* adı verilen kollajenler de matris içine doğru ilerleyerek periosteumu kemiğe bağlamaktadır. Bunlar dış esas lameller ile ara lamellere kadar uzanabilirler. Periosteum bol damar içerir ve 2 tabakası bulunur:

A- Dış tabaka daha çok sıkı bağ dokusu yapısındadır.

B- İç tabaka gevşek bağ dokusunda olup hücreden zengindir.

Tabakaların her birinin ayrı fonksiyonları vardır. Dış tabaka kollajen ve elastinlerden yapılmıştır, metabolizmada rol alan damarları (aynı zamanda lenfatikleri) içerir. İç tabakanın hücreleri ise özellikle kemik yaralanmasında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik dokuyu yapar ve o bölgeyi onarırlar. Onarım sırasında osteoblastların epiteloid hücreler şeklinde tabakalaşma yaptığı gözlenir. Bu nedenle

bu tabakaya osteojenik kat da denmektedir. Kemik onarımına katılan bu hücreler normal koşullarda aktif değildir.⁶⁸

4.3.2. Endosteum

Bu tabaka kemik iliği kavitesini ve kompakt kemiğin kanal sistemlerini çevreleyen ince bir retiküler bağ dokusudur ve periosteumdan incedir. Kemik içindeki bütün boşlukları astarlar ve tek tabaka halinde yassılaştırmış osteoprogenitor hücreler ile çok az miktardaki bağ dokusundan oluşur.⁶⁹ Bu tabakanın hem kemik doku hem de hemopoetik (kan hücresi yapımı) hücreleri yapabilme özelliği vardır.

4.4. Spongiyöz Kemik Dokusu (Trabeküllü Kemik)

Kemiğin bu formu da kompakt kemiğe benzemekle beraber trabeküller lamelden yoksundur. Buna karşılık bol boşluklu veya trabeküller oluşan adeta petek gibi bir dokusu vardır. Bu boşluklar kemik iliği ile doludur. Özellikle uzun kemiklerin epifizindeki spongiyöz doku basıncın veya kuvvetin geldiği yönde düzenlenmiştir. Böylece yapı çok daha sağlam bir hale gelmektedir. Trabeküller kemikler kural olarak uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinde ve vertebra gibi küboid kemiklerde bulunur. Trabeküller kemiğin iç hüzmeleri üç boyutlu olarak stres yönünde dizilim gösterir ve sayısı değişir. Böylece kemik maruz kaldığı strese karşı yeniden şekillenmiş olur. Bu olaya *Wolff yasası* denir.⁶⁰

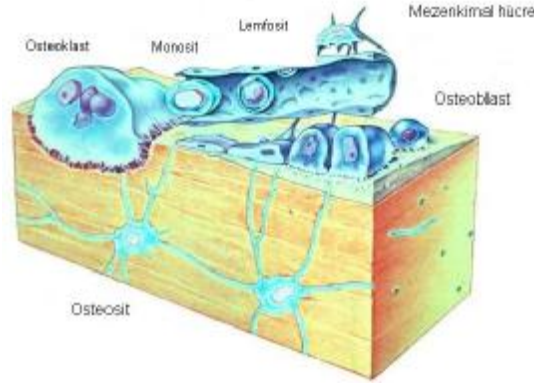
4.5. Kemik Dokunun Hücreleri

Kemik dokusunda 4 tip hücre ayırt edilir:

- Osteoprogenitör hücre
- Osteoblast
- Osteosit
- Osteoklast

4.5.1 Osteoprogenitör Hücreler

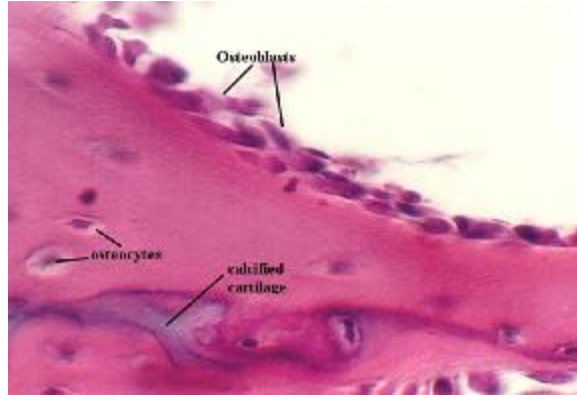
Kemiğin ana hücreleri olup mezenkimden kaynaklanırlar. Endosteumda, periosteumun iç katında ve Havers kanalları gibi bölgelerde bulunurlar. Osteoprogenitor hücreleri mitozla olgun kemik hücrelerine farklılaşmaktadır. Bu hücreler kemik büyümesinde, zedelenmesi veya kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünürler ve osteoblast hücrelerine dönüşürler (Şekil 7).



Şekil 7 : Osteoprogenitör hücrelerin farklılaşması

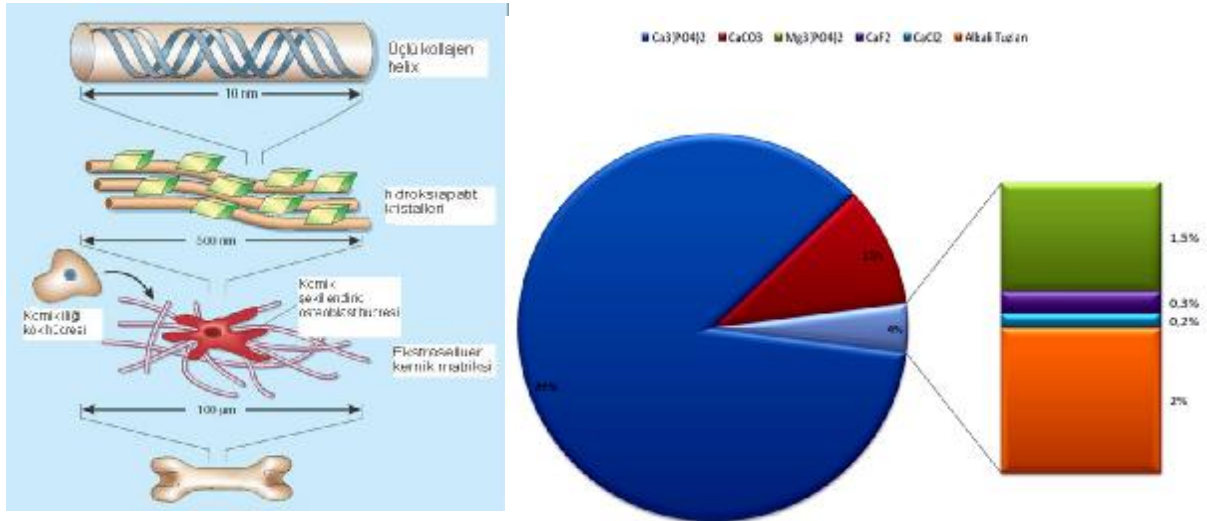
4.5.2. Osteoblastlar:

Osteoblastlar kemik matriksinin organik kısımlarının üretilmesinden (Tip I kollajen, proteoglikanlar ve glikoproteinler) sorumludurlar. Kemiğin inorganik kısımlarının çökebilmesi osteoblastların varlığına bağlıdır. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde, yan yana, tek katlı epiteli andıracak şekilde bulunurlar (Şekil 8). Bazı osteoblastlar yeni meydana gelmiş matriks ile kuşatılarak osteosit haline gelirler. Bu işlem sırasında laküna adı verilen boşluklar oluşur. Lakünaların içinde osteosit ve uzantıları ile az miktarda kalsifiye olmamış matriks vardır. Matriks elemanları, hücre yüzeylerinden salgılanarak osteoid adı verilen yeni ancak henüz kalsifiye olmamış matriks tabakasını oluşturur. Osteoid yapının içine kalsiyum tuzlarının çökmesi ile organik matriks sertleşir ve böylelikle mekanik direnç karşısında kemiğin dayanma gücü artar. Osteoblastlar tarafından salınan alkalin fosfataz enzimi, ara madde içinde birikerek kalsiyum tuzlarının fosfat grupları ile birleşmesine olanak sağlayarak kemiğin mineralizasyonu gerçekleşir.⁷⁰



Şekil 8: Yanyana dizilmiş osteoblast hücreleri

Kemiğin inorganik mineral fraksiyonu kalsiyum fosfat yapısında olup canlı kemik dokusunda hidroksiapatit kristalleri şeklinde yer alır (Şekil 9). İnorganik mineral fraksiyonun %85'i kalsiyum fosfat, %10'u kalsiyum karbonat, %1.5'u magnezyum fosfat, %0.3'ü kalsiyum florür ve %0.2'si kalsiyum klorür'den oluşur (Şekil 10). Alkali tuzların oranı ise %2 kadardır .

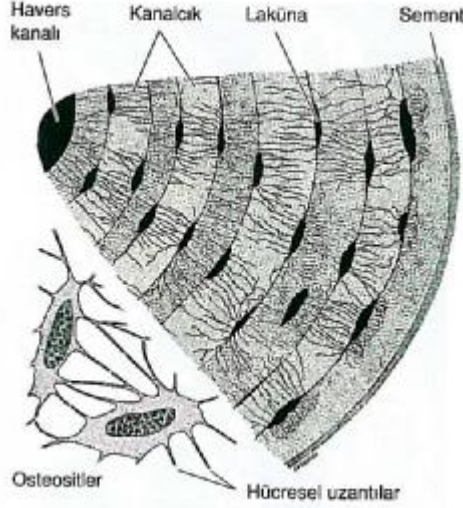


Şekil 9 : Hidroksiapatit kristalleri ile kemik formasyonu ve kemik mineral bileşenleri

4.5.3 Osteositler:

Kemiğin esas hücreleri olup, olgun kemik hücresi adını da alır. Gelişimlerini tamamlamış olduklarından sentez yapamazlar.⁶⁸ Osteoblastlardan türeyen osteositler matriksin arasındaki boşluklarda (laküna) (Şekil 10) bulunurlar. Her boşluk içinde bir osteosit bulunur. İnce silindirik matriks kanalcıkları, osteosit uzantılarını barındırır. Komşu hücre uzantıları hücreler arası bağlantılarla, birbirleri ile ilişkiyi

sağlar ve bu yapılar aracılığı ile moleküller hücreden hücreye geçer. Osteositler aktif olarak kemik matriksinin bakımından sorumludurlar ve ölümlerini takiben matriks erimesi görülür⁶⁹ (Şekil 11).



Şekil 10: İki osteosit ve Havers sisteminin şematik çizimi

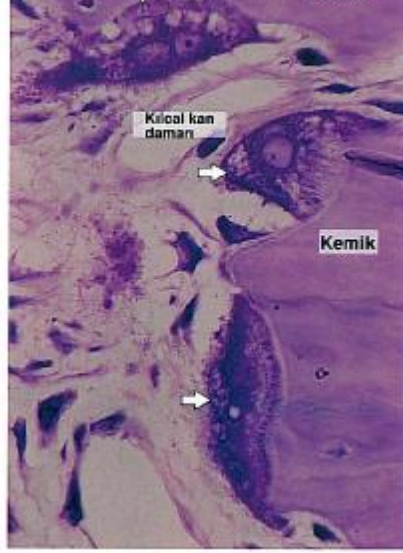


Şekil 11: Sitoplazmik uzantıları ile birlikte, kemik matriksinin sardığı bir osteositi gösteren kemik doku kesiti

4.5.4. Osteoklastlar

Osteoklastlar çok büyük, dallanmış, hareket edebilen hücrelerdir.⁶⁹ Osteoklastlar, kemikte *Howship lakünası* adı verilen boşluklarda yerleşmişlerdir. Kemikte yıkımı veya kemik rezorpsiyonunu gerçekleştiren hücrelerdir (Şekil 12). 20-100 µm çapında çok büyük hücrelerdir ve 2 den 50'ye kadar değişen sayılarda nükleusları bulunur. Fonksiyonlarından dolayı makrofaj türü hücre olarak da kabul edilirler. Ayrıca mononükleer fagositer sisteme dahil hücrelerdir ancak aktif fagositoz

yapmazlar. Osteoklastlar içerdikleri kollajenaz ve diğer proteolitik enzimlerle kemiği rezorbe etmektedirler. Eritici enzimlerle eritilen kemik dokusu uzantılarla hücre içine alınmaktadır.



Şekil 12: Kemik dokusunu sindiren üç osteoklast (oklar)

4.6. Kemik Türleri

Çıplak gözle kemik kesitlerine bakıldığında, boşluk içermeyen yoğun alanlar halinde kompakt kemik ve çok sayıda birbirine açılan boşluklar içeren süngerimsi kemik görülür. Ancak mikroskop altında, gerek kompakt kemik gerekse süngerimsi kemiğin boşluklarını ayıran kemik bölmelerinin histolojik yapısı temelde aynıdır.

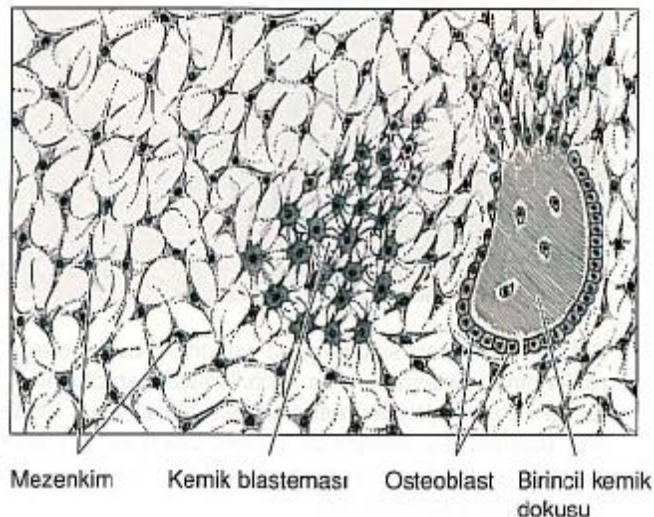
Uzun kemiklerde, epifiz olarak adlandırılan küresimsi uç kısımlar, ince bir tabaka kompakt kemik ile örtülü süngerimsi kemikten oluşur. Diyafiz, silindirik kısımdır, hemen hemen tamamı, kemik iliği boşluğuna bakan iç yüzeylerinde az miktarda süngerimsi kemik içeren, kompakt kemikten oluşur. Kısa kemikler, genellikle etrafı kompakt kemik ile çevrelenmiş süngerimsi kemik merkezine sahiptirler. Kafatasının üst kısımlarını oluşturan düz kemikler, plaka adı verilen iki tabaka kompakt kemik, *diploe* adı verilen süngerimsi kemik tabakası ile birbirlerinden ayrılmıştır.

Mikroskopik olarak iki tür kemik vardır: Birincil, olgunlaşmamış veya örgümsü (woven) kemik ile ikincil, yetişkin veya lamelli kemik.

Lamelli kemik doğumdan 1 ay sonra oluşmaya başlar. 1 yaş civarı aktif olarak örgümsü kemiğin yerini alır. Yaklaşık 4 yaşında tüm normal kemikler lamelli kemiktir. Kollajen, lamelli kemiğe anizotrop özellik kazandırır. Örgümsü ve lameller kemik yapısal olarak trabeküler (spongiyöz) ve kortikal (dens veya kompakt) olabilir.

4.6.1 Birincil Kemik Dokusu

Genellikle birincil kemik dokusu geçicidir ve yetişkinlerde vücutta birkaç yer, örneğin kafatası düz kemik eklemlerinin civarı, alveollerde ve bazı tendonların kemiğe girdiği yerler dışında ikincil kemik dokusu ile değiştirilir. Örgümsü kemik immatür, primitif kemiktir, embriyoda, yeni doğanda, kırık kallusunda ve büyüme sürecinde kemiğin metafizer bölgesinde bulunur. Bu durumların dışında kemikte normalde bulunmayan tümör dokusunda, osteogenesis imperfekta ve Paget hastalığında bulunur. Örgümsü kemik iri tanelidir ve kemik kollajen lifleri düzensiz, üniform olmayan şekilde bulunur. Lameller kemiğe göre aynı hacimde daha fazla hücre bulunur, mineral içeriği değişkendir. Nispeten düzensiz kollajen dizilimi izotropik mekanik karakter sağlar ve test edildiğinde örgümsü kemiğin mekanik davranışı maruz kaldığı strese bağlı olarak değişmez. Kollajen liflerinin düzensiz sıralanışına ilave olarak, daha az mineral içerik ve ikincil kemiğe nazaran daha fazla osteosit içermesi, birincil kemik dokusunun diğer özelliklerindedir (Şekil 13).⁶⁹



Şekil 13: Birincil kemik dokusu oluşumu

4.6.2 İkincil Kemik Dokusu

İkincil kemik genellikle yetişkinlerde bulunur. Tipik olarak, ikincil kemik dokusu, kanalcıklar içindeki kollajen liflerin, birbirlerine paralel olarak veya bir damar kanalı etrafında dairesel olarak düzenlendiklerini gösterir. Kan damarlarını, sınırları ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanalın etrafını saran dairesel kemik kanalcıklarından oluşan Havers sistemi meydana gelir. Her Havers sistemini çevreleyen, amorf madde çökeltisinden oluşan, içinde az miktarda kollajen lif içeren minerallenmiş matrikse, sement adı verilir.

Kemik dokusu sürekli yeniden modellendiği için, Havers kanallarının çapları büyük değişkenlik gösterir. Her sistem ardı ardına, çevreden içeriye doğru lamellerin tortulanması ile meydana gelir, böylece henüz oluşmaya başlamış sistemlerin kanalları daha büyüktür. Yetişkin Havers sistemlerinde, merkezdeki kanala en yakın lamel, en yeni oluşmuş olanıdır.

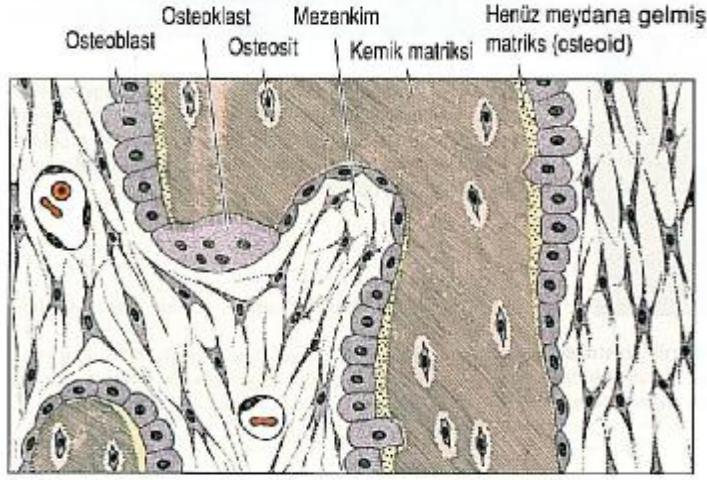
4.7. Kemik Histogenezi (Kemik Oluşumu)

İntramembranöz ve Enkondral olmak üzere iki tür kemikleşme vardır. Bunlardan intramembranöz kemikleşme bağ dokusu, enkondral kemikleşme ise kıkırdak dokunun katılımıyla oluşmaktadır. Kemikleşme hangi türde olursa olsun ilk oluşan kemik dokusu primer kemik yani olgunlaşmamış kemiktir. Oluşan bu primer kemik kalıcı olmayıp yerini esas yani olgun lamelli kemik dokuya bırakmaktadır.⁶⁸

4.7.1 İntramembranöz Kemik Oluşumu

Kemiğin bu şekildeki oluşumu bağ dokusu tarafından gerçekleştirilir. Organizmada kafatasını oluşturan frontal, pariyetal, temporal kemikler ile çene bu tür kemikleşmeyle oluşmaktadır. Bu kemiklere membran kemikleri de denmektedir. Kemiğin gelişmesi şu şekilde olmaktadır: Önce mezenkim hücreleri damarlar etrafında toplanırlar ve çoğalırlar, aradaki boşluklar sertleşmemiş matriks ve içindeki kollajen liflerce doldurulmuştur. Mezenkim hücreleri osteoblastlara dönüşebilen

hücrelerdir. Bu hücreler hücrelerarası madde ve lif sentezini de yaparak osteositlere farklılaşırlar. Bu bölgeye kemikleşme merkezi adı verilir (şekil 14).

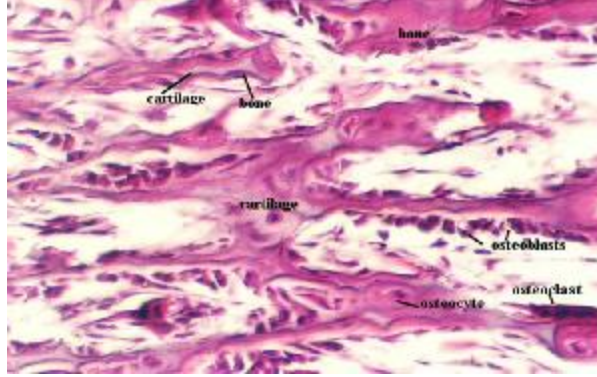


Şekil 14: İntramembranöz kemikleşme. Osteoblastlar hücreleri hapseden kıyı şeridi gibi bir matriks yaparak kollajen sentezler.

Oluşan kemik spongiyöz (trabeküler) yapıdadır ve lamel içermez. Araya henüz kalsiyum bileşikleri de çökmemiştir ve osteoid doku adını alır. Damar çevresindeki osteoblastların osteositlere dönüşerek boşalttıkları yerlere arkadan yeni hücrelerin gelmesiyle olayda devamlılık sağlamaktadır. Trabeküller büyür, çoğalır ve anastomozlaşarak spongiyöz kemik dokusu şekillenmiş olur. Bu tür kemikleşmede periosteum ve endosteum kemikleşmeye katılmayan bağ dokusu tarafından yapılmaktadır. Trabeküllerarası boşluklardaki bağ dokusu da kemik iliğinin miyeloid veya hemapoetik dokusuna dönüşmektedir.⁶⁸

4.7.2 Kondral Kemikleşme

Bu tür kemikleşme intramembranöz kemikleşmeden biraz farklıdır. Kemikleşme hyalin kıkırdak hücreleriyle oluşmaktadır. Bu nedenle intrakartilaginöz kemikleşme de denmektedir (Şekil 15). Organizmanın uzun ve bazı kısa kemikleri böyle gelişir. Kondral kemikleşme perikondral ve enkondral olmak üzere iki tiptir.



Şekil 15: İntrakartilaginöz kemikleşme

4.7.2.1 Perikondral Kemikleşme

Kıkırdak yüzeyindeki mezenkim kaynaklı hücreler osteoblastlara dönüşerek bu bölgede tabakalaşma yaparlar ve ara maddeyi salgılayarak osteosit haline dönüşürler. Bu olayı kalsifikasyon izler, sonuçta ise diyafizin ortasında ve daha sonra da uçlara doğru gelişen ve kıkırdağı çevreleyen bir perikondral kemik dokusu ortaya çıkar. Kemikleşme tamamlandıktan sonra perikondrium periyosteum adını almaktadır. Bu kemik kompakt yapıdadır ve bu yolla kemiğin enine büyümesi sağlanır.

4.7.2.2 Enkondral Kemikleşme

Bu tür kemikleşmede kıkırdak hücreleri önemli rol almaktadırlar. Özellikle uzun kemiklerin şekillenmesi bu yolla olur. Bu tür kemikleşme esas olarak kıkırdak hücrelerinin özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgesinde birtakım değişimleri şeklinde olmaktadır. Diyafizdeki kemikleşme primer kemikleşmedir ve bölge tamamen kemikleşinceye kadar devam eder. Bunu epifiz bölgesindeki kemikleşme izler ve sekonder kemikleşme merkezi adını alır. Epifizdeki eklem kıkırdağı ise kemikleşmeye katılmaz (şekil 16).

4.8. Kemiğin Hasarlanmaya yanıtı (Kırık İyileşmesi)

Diştan veya içten gelen zorlamalarla strese maruz kalan kemiğin anatomik bütünlüğünün bozulmasıyla kırık meydana gelir. Fizyolojik reaksiyonlar, bozulan kemik bütünlüğünün yeniden sağlanmasına yöneliktir. Kemik, skar dokusu oluşturmaz ve yeniden yapılanmayla iyileşir. Kırık iyileşmesi, kırık olduğu andan itibaren başlar, düzenli kemik doku ile kırık uçları birleşinceye kadar devam eder.⁷¹ Kırık iyileşmesi, temelde bir bağ dokusu iyileşmesi şeklindedir, yumuşak dokudan farklılığı, osteoblast ve osteoklastların aktiviteleri ile özelleşmiş kalsifiye kemik dokusu oluşumudur.

Yaralanan dokunun yerini fibröz skar dokusunun aldığı yumuşak doku iyileşmesinin tersine, kemik dokusundaki iyileşme yeni kemik dokusu oluşumu ile sonlanır. Eğer kemik dokusunun iyileşmesi sonucunda fibröz doku oluşmuşsa, bu olay kırığın iyileşmemiş olduğunu gösterir. Kırık iyileşmesi olayı makroskopik olarak 19. yüzyıl sonlarına doğru, mikroskopik olarak ise 20. yüzyıl ortalarına doğru aydınlatılmaya başlanmıştır. Ancak günümüzde gelinen son noktada dahi tam olarak açıklık kazanmamış bölümler mevcuttur.⁶⁰

Birincil kırık iyileşmesi, rijit internal fiksasyon sonra görülen bir olaydır. Belirli bir dış kallus oluşmadan sadece iç kallusla devam eden kontakt iyileşmesidir. İkincil kırık iyileşmesi, kırık kapalı yöntemle, ameliyatsız tedavi edilirse meydana gelir. İkincil kırık iyileşmesi uygun bir şekilde evrelere bölünebilir.

De Palma' ya göre kırık iyileşmesi dört fazda incelenir:⁷¹(Şekil 18)

1- Birincil hücresel kallusun oluşum fazı

a-Hematom fazı

b-Birincil hücresel kallusun oluşumu

2- Hücresel kallusun damarlanma fazı

3- Hücresel kallusun kemikleşme fazı

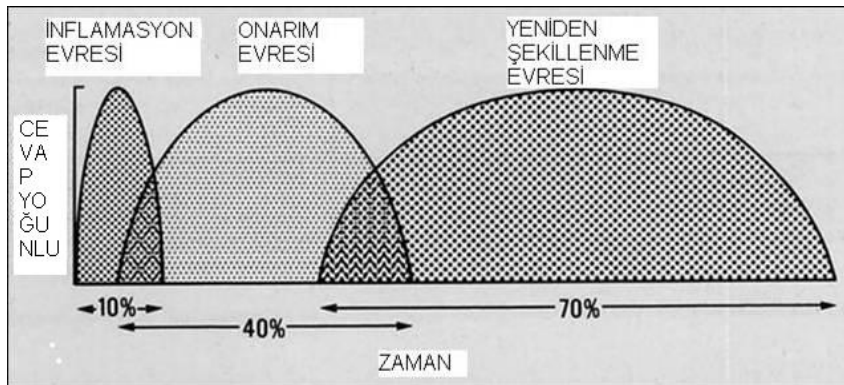
4- Kemiğin yeniden şekillenme fazı



Şekil 18: Kırık iyileşmesi süreci

Cruess ve Dumont' a göre ise ikincil kırık iyileşmesinin 3 evresi vardır:⁷¹(Şekil 19)

- 1- Yangı (Enflamasyon) evresi,
- 2- Onarım (Reperasyon) evresi,
- 3- Yeniden şekillenme (Remodeling) evresi.



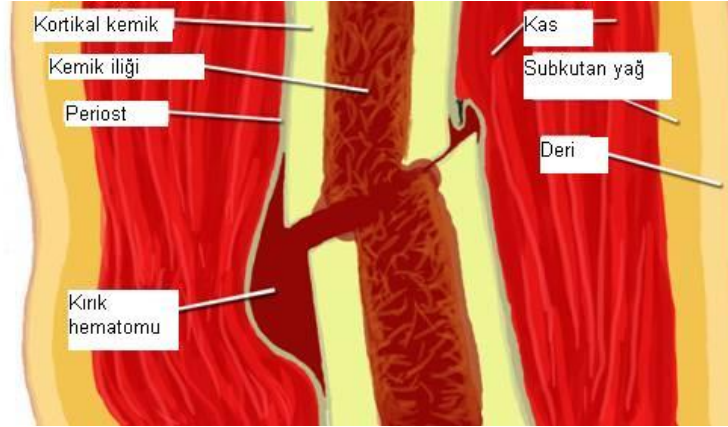
Şekil 19: Kemik onarım evreleri

Bu evreler birbiri ile ilişkilidir ve geçici olarak birbiri ile içiçe girebilir.^{3,72}

1-Yangı(Enflamasyon) Evresi (1-4 gün)

Bir kemik kırığı matrikste hasara, hücrelerde ölüme, periosteum ve endosteumda yırtıklara ve kırık kemik uçlarında yer değişimine neden olur. Tüm doku travmalarında, dolayısıyla kırıklarda, ilk verilen yanıt *enflamasyon* yani *yangı*'dir.

Travmanın şiddetine bağlı olarak, kırık uçları komşuluğundaki periost ve çevre yumuşak dokular yırtılarak, damarlar yaralanır. Kırık uçlarını karşılıklı çaprazlayan kan ve lenf damarlarının yaralanmasıyla bu uçlar arasındaki kemik iliğinde ve etrafında kan ve lenf sıvısı toplanır. Bu sıvı birikerek periostu kaldırır (Şekil 20). Kanamanın durmasını ve pıhtılaşmayı sağlamak için trombosit ve trombotik faktörlerin toplanmasıyla moleküler aracılar yaralanma bölgesine salınır. Kanamanın pıhtılaşması ile kırık uçları arasında, periost altında ve periost yırtılmışsa bunun etrafında hematom oluşur.



Şekil 20: Kırık Hematomu

Hematoma sağlam yumuşak dokular tarafından sarılır. Kırık hematoma ikincil kırık iyileşmesinde önemli bir rolü vardır. Hematomun basıncı kırık uçlarının bir arada tutulmasına yardım eder. Açık kırıklarda kırık hematoma dışarıya boşalması ile kırık iyileşmesi gecikir veya hiç olmaz. Deneysel olarak hematoma organize olduktan sonra çıkarıldığında osteojenik uyarının büyük bir kısmının yok olduğu öne sürülmüştür.

Olasılıkla, kırık hematomu onarım hücrelerinin gücünü kolaylaştıracak fibrinden bir yapı iskeleti sağlamaktadır.⁷³ Ayrıca kırık hematomu ortamındaki trombositler ve hücrelerden büyüme faktörü ve diğer proteinler salınır. Bunlar, kırık onarımında yeri olan hücre göçünde, periosteal hücre çoğalmasında ve onarım dokusu matriksinin sentezinde aracıdır.⁵ Bu matriks daha sonra mineralize olarak örgümsü kemiği oluşturur.⁷³ Kırık olduktan sonra geçici bir arteriyoller daralmayı arteriyol, kılcıl damar ve venüllerin genişlemesi izler. Bunun nedeniyse dokudaki mast hücrelerinin kırık bölgesine histamin salgılamasıdır. Ayrıca kılcıl damar zar geçirgenliği artar. Vazodilatasyon ve plazma eksudasyonuna bağlı olarak, kırık bölgesinde ilk 24 saat içinde ödem oluşur. Polimorf çekirdekli lökositler, monosit ve lenfositleri içeren akut yangı hücreleri, ödemli bölgeye doğru göç eder.

2-Onarım (Reperasyon) Evresi (2-40 gün)

Onarım evresi kırık iyileşmesinde en önemli kısımdır. İlk basamağı hematoma organize olmasıdır. Lokal aracılı mekanizmalarla hassaslaşan öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri ve diğer hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya ve düzenlenmeye başlar. Kırık hattındaki hücrelerin aktivitenin başlaması için gerekli uyarım karmaşıktır. Kimyasal , elektriksel ve mekanik faktörler söz konusudur. Tamir için gerekli hücre çoğalmasının oluşumu, muhtemelen travma bölgesindeki elektriksel akımla başlamaktadır. Bu akım kırık alanında en yüksektir ve daha sonraki 2-3 hafta içinde yavaş yavaş azalır.

Onarım evresi, kırık oluşumundan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi 7-12 gün sürer. Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler mezenkimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücrelerdir. Çoğunlukla kırık bölgesindeki granülasyon dokusunun içinden, ayrıca periosteumun osteojenik tabakası ve daha az olarak da endosteumdan köken alırlar. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk değişikliğe uğrayan hücreler, kılcıl damarlarla hematoma içine giren *fibroblastlar*'dır. Üçüncü günde karşı kırık uçlarında yoğun mezenkimal hücre mevcudiyeti vardır. Bu hücreler kırık parçaları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur. Periosteal ve endosteal osteojenik hücrelerle, fibrin matriksteki fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla, bu granülasyon dokusu oluşur.

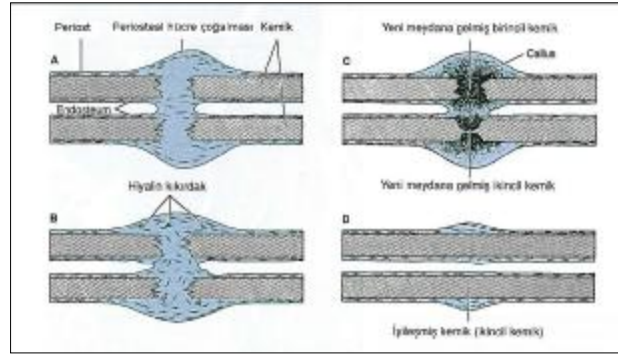
Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoid salgırlar. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içediği kollajen kapsamıyla yakın ilişkilidir. Kallusun boyutu kırığın hareket derecesiyle doğru orantılıdır. İleri yaşlarda bu hücrelerin farklanma kapasiteleri azalır. Periosteumun hasar görmesi ya da ortamdan uzaklaştırılması kırık iyileşmesini yavaşlatır.⁷ 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 mikroskopik düzeyde görünür hale gelirler ve 1. haftada belirginleşirler.

Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosteal damarlar, geç dönemdeyse besleyici (nutrisyen) damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Fakat kılcal damar gelişimi osteojenik hücre çoğalması kadar hızlı olmadığından, beslenmenin daha iyi olduğu kemiğe yakın seviyedeki hücreler, osteoblastlara dönüşür.

Kemiğe yakın olmayan, yakalığın orta kısmındaki hücreler dolaşım yönünden fakirdir. Bu bölgedeki kılcal damarların gelişim hızı, hücre çoğalmasının hızına uyum gösteremediğinden, hücreler kondroblast ve kondrosite farklanarak kırık dokuyu oluşturur. Osteoblast haline gelen kanlanmanın yeterli olduğu bölgelerdeki hücrelerse trabekülleri oluşturur. Böylece en dış tabakada kırık dokunun üstünü örten periostun derin tabakasından çoğalan osteojenik hücreler, orta tabakada kırık doku, daha derinde ise kemik trabekülleri bulunur. Zamanla her iki kırık parçası da ucunda oluşan yakalık tarzındaki kitle birleşerek, kırığa bütünlük sağlayan dış kallusu oluşturur. Dış kallusun devam eden gelişimi esas olarak kemik hücrelerinin çoğalmasına ve kırık dokudaki (orta tabakada) interstisyel büyümeye bağlıdır. Aynı şekilde ilik boşluğunda da aynı olaylar birbirini takip eder.

Endosteum ve iliğin osteojenik hücresinden gelişen trabeküllerle, iliğin köprülenmesi oluşur ve iç kallus meydana gelir. İlk 7- 12 günün sonrasında yumuşak kallus kitlesi (prokallus), fibröz doku ve kırıkdaktan oluşmuştur ve kırık dokusunu çevreler.^{5,7} Kırık kemik uçları, iç ve dış kallus gelişimiyle çok sağlam bir yapıya kavuşur. Sert kallus oluşumu, yetişkinlerde çocuktan ve kompakt kemikte trabeküler kemikten daha yavaş meydana gelir. Yaralanmadan sonra kallus oluşması ve

mineralizasyonu 4-16 hafta arasında zaman gerektirir. Kallus oluşumuyla beraber kaynamanın olduğu söylenebilir (Şekil 21). Bununla beraber, kaynama henüz son noktasına ulaşmış değildir, onarım evresinin ortasında, kallusun gereksiz ve etkisiz kısımlarının geri emilimi ve trabeküler kemiğin stres çizgileri boyunca uzanması ile yeniden şekillenme evresi (remodeling) başlar.



Şekil 21: Periosttan ve endosteumdan hücre çoğalması ile yeni bir kemik dokusunun oluşumu sayesinde kırık bir kemiğin onarılması

3- Kemiğin Yeniden Şekillenme (Remodeling) Evresi (25-100 gün)

Kemiğin şekillenmesi en uzun evre olup, aylar yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür. Onarım evresinin ortasında başlayıp, normalde insanlarda 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam edebilir.

Yeniden şekillenme evresinde 4 olay gerçekleşir:

- 1- Kalsifiye kırıkta, osteoid dokuyla değişerek bir çeşit birincil trabeküler doku oluşur.
- 2- Lameller kemik bu dokunun yerini alır.
- 3- Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur.
- 4- İlik kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından geri emilir ve boşluklar yeniden düzenlenir.

1892'de Wolf iskelet sistemi yapısının, bu sistemin mekanik ihtiyacına uygunluk gösterdiğini, daha sonra kendi adıyla anılan kanun ile tanımlanmıştır. Wolf, işlev yani stres arasındaki ilişkiyi ortaya koymuştur. Bu kanuna göre kemiğin işlevsel durumundaki değişiklik, dokuda yapısal değişikliklere yol açmaktadır. Bu kanun günümüzde de kemiğin yeniden şekillenmesinde temel bir kural olarak kabul edilmektedir.

Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü ise negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin hakim olduğu konveks yüzde geri emilim ve osteoblastik aktivitenin hakim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani, "kırığın konkav tarafında kemikleşme, konveks tarafında geri emilim" olur. Bu evreden sonraki kemiğin tıraşlanıp yeniden eski haline döndüğü *şekillenme evresi* 1-2 yıl sürer ve yalnız çocuklar ve adolesanlarda görülür.

4.9.Kırık İyileşmesinin Regülasyonu:

Kırık oluşumu sırasında osteoblast ve osteoklastlar iyileşme için yeterli miktarlarda değildir. Bu dönemde kırık iyileşmesi öncü ve destek hücreleri, kılcal damar, lenf ve sinir sistemi ve yerel aracılı mekanizmalarla sağlanır. Kırık sahasında yerel olarak üretilen ya da kan dolaşımıyla gelen, bölgesel seviyelerde kemik dengesini koruyabilen kenetleyici faktörlere ihtiyaç vardır. Bu faktörler arasında prostaglandinler ile kemik uyarıcı faktörler sayılabilir.

4.9.1-Prostaglandinler:

Hücre membranında bulunan araşidonik asitten meydana gelen yağ asitlerinden türeyen lipid bileşikleridir. Araşidonik asitten siklooksijenaz enzimi yardımıyla herbiri doymamış bağlantıya sahip iki yan zincirle birlikte bir veya iki halka yapıdan meydana gelen değişik PG'ler oluşur. Hücre duvarının onarımı ve kollajenin yaranmalarında sentezlenir. İnflamatuar hücrelere kemotaktik etkiye sahiptir ve akut iltihabi reaksiyonun önemli araçlarıdır.

Güçlü vazodilatatördürler, hücre çoğalmasını hızlandırırlar. Lenfositlerin antikor yapımını düzenlerler. Hücre içine ve dışına Ca^{+} hareketini kolaylaştırır. PGE2

ve PGI₂'nin rezorbsiyon gücü fazladır. PGE₁ ve PGE₂ yeni kemik yapımını artırır. PGF₂ α , kondrogenezis ve kondroliziste etkilidir. Kemik geri emiliminde yer alan ajanlardan EGF, TGF- α , PDGF, bradikinin ve trombin etkilerini PGE₂ aracılığıyla göstermektedir. PGF'nin de kemik gelişimini hızlandırdığı hakkında görüşler vardır.

4.9.2-Kemik Uyarıcı Faktörler:

Farklanmamış mezenkimal hücrelerin mitozunu destekler ve yeni kemik hücrelerinin oluşumuna yol açarlar. Bu uyarıcılar; büyüme faktörleri, sitokinler ve hormonlardır.

TGF β : Dönüştürücü büyüme faktörüdür. İnflamasyon ve doku onarımından sorumludur. Tüm hücreler moleküler formlarının birinde TGF β oluştururlar ve tüm hücreler bu faktörün reseptörüne sahiptir. En önemli kaynağı kemiğin hücre dışı matriksi ve trombositlerdir. TGF β kondrosit ile osteoblastlarda sentezlenir ve enkondral kemikleşme sırasında hücre dışı matrikste birikir. Onarım zincirinde rol almak üzere trombositlerden de salınır. Makrofajlardan salınan en güçlü kemotaktik ajandır. Hücrenin integrin reseptörlerini uyarmak yoluyla hücre dışı matriks bileşenlerinden olan kollajen , fibronektin ve proteoglikanların oluşumunu artırır. Bağ dokusunda hasara yol açan proteolitik enzimleri baskılar. Sonuç olarak granülasyon dokusu oluşumuna etki eder.

BMP: Yaralanan kemik kaynaklı morfojenetik proteindir. Mitojenik ve dönüştürücü bir faktördür. Mezenkimal hücrelerin kıkırdak ve kemik hücrelerine farklılaşmasına, ektopik kemik uyarımının artmasına neden olduğu ileri sürülmüştür. BMP 1-10 olmak üzere 10 alt grubu vardır. Bunlardan BMP- 1, TGF β ailesinin alt grubuna bağlı değildir. BMP- 7 osteojenik protein 1, BMP-8 ise *osteojenik protein 2* olarak bilinir.

FGF: Fibroblast kaynaklı büyüme faktörüdür. Kıkırdak ve fibroblastlar için mitojeniktir. Kıkırdak oluşumu aşamasında kallusu genişletir. Yüksek dozda kemik gerilimini artırır.

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörüdür. Fibroblast ve kemik hücreleri için mitojeniktir. Kırık sahasında yerel olarak bulunabildiği gibi kan dolaşımında da

bulunmaktadır. Bağ dokusunda kollajen sentezini artırır. Fibroblast çoğalmasını, mezenkimal hücre mitozunu, monosit ve makrofajların kırık bölgesine göçünü arttırır. PDGF uygulamasıyla kallus yoğunluğu ve hacmi artmıştır. İnterlökinler: Makrofaj ve monosit kökenlidir. IL-1 fibroblast çoğalması, kollajenaz ve PGE2 üretimiyle ilgilidir. Ayrıca osteoklastlar üzerine etkiyle kemik geri emilimini de etkiler.

IGF: Kollajen ve matriks sentezini ayrıca osteoblast sentezini uyandır,

Plazma Fibronektini: Yeni damar oluşumu için mitojeniktir.

Somatomedin C: İskelet sistemi üzerinde büyüme hormonunun arasındadır. Kondroblastların bölünme ve farklılaşmalarını, ayrıca kemik matriksi oluşumunu hızlandırır.

EGF: Epidermal büyüme faktörüdür. Kemik geri emilimini hızlandırır.

CDGF: Kondroblast kökenli büyüme faktörüdür. İki tipi vardır ve Tip II kollajen ve hiyaluronik asit için düzenleyicidir.

MDGF: Makrofaj kaynaklı büyüme faktörüdür. Sıçanlarda osteoblast benzeri hücreler ve kondrositler için mitojeniktir.

ECGF: Epidermal hücre kaynaklı büyüme faktörüdür. Kıkırdak ve kemik için mitojeniktir.

ECDGF: Endotelial hücre kaynaklı büyüme faktörleridir. Yeni damar oluşumu için mitojeniktir.

Östrojen: Reseptör aracılı mekanizma ile kemik iyileşmesini uyandır. Spesifik IL-1 inhibitörü salınımını modüle eder.

Tiroid Hormonları: Osteoklastik kemik rezorpsiyonunu stimüle eder.

Glukokortikoidler: PTH'ı arttırarak barsaklardan Ca⁺ absorpsiyonunu inhibe ederler, dolayısıyla osteoklastik kemik rezorpsiyonunu arttırırlar.

Paratiroid Hormon: Aralıklı salınımı osteoblastları ve kemik formasyonunu stimüle eder.

Büyüme Hormonu: IGF-1 (Somatomedin-C) üzerinden etki eder. Kallus formasyonu ve fraktür gücünü arttırır.

Vasküler Faktörler:

Metalloproteinler: Damar invazyonunu sağlayabilmek için kemik ve kırıkdaıkları delerler.

Anjiyojenik faktörler:

VEGF: Yeni damar oluşumunu stimüle eder.

Anjiyopoetin: Daha büyük damarları ve dallanmalarını kontrol eder.

4.10. DİSTRAKSİYON OSTEOGENEZ TANIMI VE GELİŞİM SÜRECİ

Kallus distraksiyonu, kallotazis, osteodistraksiyon olarak da adlandırılan distraksiyon osteogenez iskelet deformiteleri onarımında, kemik defektleri onarımında ve kemik uzatmada kullanılan cerrahi bir işlemdir.^{20,74}

Büyük kemik defektleri genellikle ateşli silah yaralanması veya trafik kazası gibi yüksek enerjili travmalarla oluşan Gustilo tip III açık kırıklarda görülür.⁷⁵ Kemik kaybı, travma sırasında oluşabileceği gibi, yapılan debridmanlar esnasında da oluşabilir. Bunun dışında enfeksiyon, tümöral nedenlerle yapılan eksizyonlar ya da konjenital sebepler de kemik defektlerinin ortaya çıkmasında rol oynayabilirler.²

Geniş kemik defektlerinin günümüzdeki tedavi yaklaşımı temelde greft dışı onarım teknikleri (distraksiyon osteogenez) ve greft ile onarım teknikleri (biyomateryal implantlar kullanılarak otolog, homolog ya da heterolog kemik greftleri) olarak iki gruba ayrılabilir.⁵⁸

Distraksiyon osteogenez, aşamalı traksiyon tekniği ile birbirinden dereceli olarak ayrılan kemik segmentleri arasında meydana gelen yeni kemik formasyonuna ait biyolojik bir olaydır. Ayrılan kemik segmentleri arasında, distraksiyon kuvveti uygulanması ile bir iyileşme kallusu oluşumu sonucu başlar ve doku uzayana kadar devam eder. Kemiğe uygulanan distraksiyon kuvvetinin çevre dokularda tansiyon oluşturmasıyla beraber distraksiyon biyogenezi olarak adlandırılan adaptif değişiklikler görülmeye başlar. Distraksiyon boyunca oluşan rejenerasyon, *Gerim-stres etkisi* olarak adlandırılır (Şekil 22).⁷⁶



Şekil 22: Ilizarov tipi distraktör

Dereceli distraksiyon ile meydana gelen tansiyon streslerinin etkisi altında deri, fasya, kas, tendon, kıkırdak, kan damarları ve periferik sinir gibi farklı tip dokularda aktif histogenez meydana gelmektedir. Distraksiyon osteogenez kemik uzatılması, deformite düzeltilmesi ve geniş defektlerin doldurulması gibi ortopedik cerrahi işlemler ile tanınmış ve güncel bir tedavi haline gelmiştir.⁷⁷

Tıpta kemik fragmanlarının mekanik manipulasyon prensipleri eski zamanlardan beri üzerinde durulan bir konu olmuştur. Hipokrat 2000 yıl kadar önce kızılıcak ağacından yapılmış dört adet kısmen bükülmüş çubuk ile birleştirilmiş iki adet halkadan oluşan eksternal bir apacey kullanmıştır. Kemik segmentlerine uygulanan tansiyon kuvveti çubukların bükülme miktarları ile kontrol edilmiştir.

Kemik kırıklarına yönelik ilk devamlı traksiyon Guy de Chauliac'ın 14. yüzyıldaki çalışmaları ile ortaya çıkmıştır. 1826'da John Barton, kemiğin ilk defa cerrahi olarak ayrılması ve osteotomi işlemini uygulamıştır.(77)

O dönemde antibiyotikler ve aseptik cerrahi teknikler mevcut olmadığı ve enfeksiyon riski çok fazla olduğu için osteotominin rutin bir prosedür haline gelmesi

biraz daha gecikmiştir. Eksternal iskeletsel fiksasyonun tarihçesi ise Joseph Malgaigne ile başlar. Araştırmacının basit eksternal çerçevesi, deri içinden patella fragmanlarına yerleştirilip bir vida ile birleştirilen iki çift kancadan oluşmaktadır. Bu aparey kemiğe direkt olarak tatbik edilen ilk apereydir ve mekanik bir kuvvetin iskelet sistemine direkt olarak aktarılmasını sağlamaktadır.

Bu noktadan itibaren eksternal iskeletsel fiksasyon gözle görülür bir aşama kaydetmiştir.⁷⁷ 1905 de Alessandro Codivilla femura yaptığı oblik bir osteotomi sonrası eksternal iskeletsel traksiyon amacıyla ilk defa ekstremitte uzatma tekniğini uygulamıştır.^{59,77,152} Yıllar geçtikçe birçok cerrah osteotomi tekniği, distraksiyon protokolü veya kemik fiksasyon apereylerini modifiye ederek Codivilla'nın "*devamlı ekstansiyon*" prosedürünü modernize etmiştir.

1908 yılında Paul Magnusson köpeklerde yaptığı deneysel çalışmalarla periost ve endosteumun biyolojik potansiyelini ortaya çıkarmıştır.⁷⁷ Akut kemik uzatmasının ardından oluşan spontan kemik iyileşmesi üzerine çalışmıştır.⁵⁹ Eksternal fiksatörü ekstremitte uzatılmasında ilk kullanan Ombredanne'dir (1912).⁵⁹ Oblik osteotomi ile uyguladıktan sonra 5 mm/gün olacak şekilde 8 gün distraksiyon uygulamış ancak cilt nekrozu ve enfeksiyon komplikasyonları oluştuğunu bildirmiştir.

1921'de Vittorio Putti femuru uzatmak için tek taraflı fiksator olan *Osteoton*'u dizayn etmiştir. Putti yavaş distraksiyon uygulamıştır. Otuz gün, günde 2-3 mm distrikte etmiştir, yayınladığı on vakalık seride savaş yaralanması olan hastalarda 8-10 cm'ye varan kemik uzatmaları gerçekleştirmiştir. Leroy Abbott "U" şekilli osteotomi ile kombine olarak ekstremitenin her iki tarafında çerçeveye tutturulmuş pinler kullanmıştır.⁷⁷

Kemik formasyonunu uyarmak için latent periyot kavramını ilk kez Abbott belirtmiştir (1927). Abbott uzatma miktarının toplam 5 cm, günlük miktarın da 3 mm'den fazla olmaması gerektiğini bildirmiştir. 1920'ler boyunca distraksiyon osteogenez prosedüründe ileri modifikasyonlar ve gözle görülür gelişmeler sağlanmıştır. 1932 yılında Edward Haboush ve Henry Finkelstein yeni bir osteotomi tekniğinden bahsetmişlerdir. Bu iki araştırmacı cerrahi kemik seperasyonunun yapıldığı

seviyede periostu sağlam bırakmışlar ve bu alanda kemik fiksasyonunun daha çabuk olduğunu görmüşlerdir. 1942'de Brockway ve Fowler Abbott tekniğini kullanarak tedavi ettikleri 105 hastalık uzun dönem sonuçlarını yayınlamışlardır. Tedavi süresi her santimetre için yaklaşık 3-4 ay sürmüştür.⁵⁹

Klasik kraniyofasiyal distraksiyon ise ilk olarak iki alman cerrah tarafından uygulanmıştır. Rosenthal 1927 de mikrognatili hastanın mandibulasında kemik uzatmasını gerçekleştirmiş ve Wassmund 1926 da maksiller hipoplazili hastada distraksiyon osteogenezisi uygulamıştır. Bu başarılı sonuçların ardından ortopedik cerrahinin yanısıra *Pierre Robin sendromu* gibi birçok kraniyofasiyal deformitede, *Nager sendromu*'nda, TME ankiloz'da, tümör rezeksiyonu cerrahisi sonrası, posttravmatik büyüme geriliği, midfasiyal ve zigomatik hipoplazide de kullanılmaya başlanmıştır.²⁶ Snyder 1972 yılında köpek mandibulasına distraksiyon uygulamıştır. Aytemiz 1978 yılında eksternal mandibular distraktör ile klinik çalışmalar yapmıştır. 1989'da McCarthy sendromik insan mandibulasında distraksiyon osteogenez ile başarılı sonuçlar elde etmiştir.⁷⁸

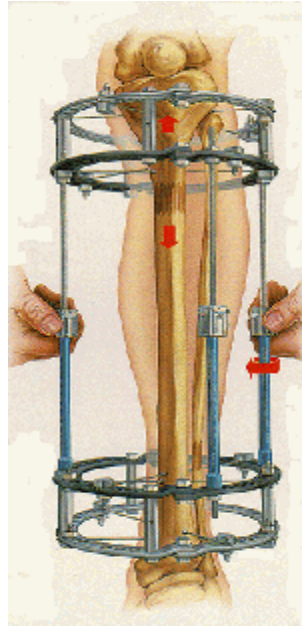
Gecikmiş iyileşme, birleşememe, deformiteler ve çerçevenin çıkarılması sonrası fraktür oluşumu gibi kemiğe ait ve sinir zedelenmesi ve eklem daralması gibi yumuşak doku ile ilişkili olaylar, olası distraksiyon osteogenez komplikasyonları olarak kaydedilmiştir. Bu komplikasyonlar distraksiyon osteogenezin yayılmasını kısmen de olsa önlemiş ve osteotomi tekniği, distraksiyon protokolü ve uygulama dizaynı ile ilgili daha fazla gelişmeye ihtiyaç duyulmuştur.

Distraksiyon osteogenezin ilerlemesinde en somut adım Rus cerrah Gavriel Ilizarov tarafından atılmıştır (Şekil 24). Ilizarov 1951 yılında kemik fiksasyonu için yeni bir aparey geliştirmiştir. Bu aparey üç veya dört adet vidalı çubuk ile birbirine bağlanmış iki metal halkadan oluşmaktadır. Her bir kemik segmenti, doğru açı ile kemiğe yerleştirilmiş iki adet ince, gergin tel ile halkalara tutturulmuştur. Codivilla'nın tekniği ile ekstremitelerde 3 ila 8 cm'lik bir kazanç elde edilirken, Ilizarov yaptığı çalışmalarla bu miktarı 18 cm'ye kadar çıkarmıştır.⁷⁷



Şekil 23: Distraksiyon osteogenezin popülarite kazanması Ilizarov'un başarılı klinik çalışmaları neticesinde olmuştur

Ilizarov, bu sistemi, kompresyon uygulayarak, başlangıçta sadece osteosentez amacıyla kullanmıştır. Ancak, bir hastanın yanlışlıkla sistemde kompresyon yerine distraksiyon yapması ile kırık uçları arasında yeni kemik oluşumunun başladığını gözlemleyerek, distraksiyon osteogenezis ile ilgili çalışmaya başlamıştır. Ilizarov, hayvanlar üzerindeki ilk distraksiyon çalışmaları ile, distraksiyon kuvvetlerinin varlığında, kemik ve yumuşak dokuda rejenerasyonun olabileceğini ortaya koymuştur.⁷⁶



Şekil 24: Distraksiyon osteogenez işlemi

İlizarov'un fiksasyon tekniğinin diğer yöntemlere göre iki major avantajı bulunmaktadır. Bunlardan ilki stabil olmasıdır ama kemik segmentlerinin aksiyal yönde hareketlerini sağlayacak kadar rijit olmayan bir fiksasyon sağlar ve ekstremitenin fizyolojik fonksiyonu ile ağırlık taşınmasına izin verir. İkincisi ise boyut, şekil veya anatomik lokalizasyonu ne olursa olsun kemik segmentlerinin manipülasyonunda tam kontrol sağlamasıdır.

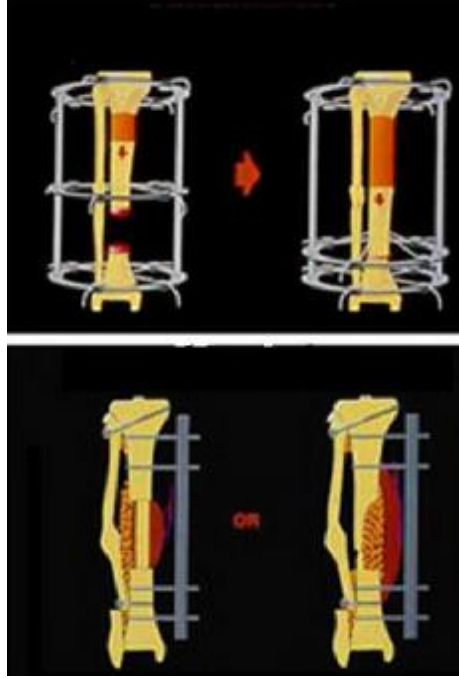
İlizarov daha sonra kortikotomi denilen düşük enerjili perkutanöz osteotomi tekniğini geliştirmiştir. Kemik korteksinin üçte ikisini dar bir osteotom ile ayırmış ve kortikotomiyi rotasyonel osteoklazi ile tamamlamıştır. Bu teknik ile periost ve kemik ilişkisine minimal travma uygulanmaktadır. İlizarov'un uzatma protokolü 5-7 günlük bir latens dönem ve günde dört kez 0,25'er mm olmak üzere günde 1 mm'lik distraksiyondan oluşmaktadır

İlizarov klinik tecrübeleri doğrultusunda distraksiyon osteogeneze ait iki biyolojik prensipten bahsetmiş ve bunları İlizarov etkileri olarak isimlendirmiştir. Bunlar dokuların büyüme ve gelişiminde tansiyon stresin etkisi ile kemik ve eklemlerin şekline kanlanmanın etkisidir. Birinci İlizarov prensibi yaşayan doku üzerine uygulanan dereceli traksiyonun, rejenerasyon ve aktif büyümeyi stimüle edip idameyi sağlayacak streslerin oluşumuna sebep olduğunu, ikinci prensip ise kemik ve eklemlerin şekil ve kütlesinin mekanik yükleme ve kanlanma arasındaki etkileşime bağlı oluştuğunu ifade etmektedir. İlizarov yalnız distraksiyon osteogeneze ait bu biyolojik prensipleri tanımlamakla kalmamış ayrıca bu prensiplerin klinik pratikte uygulanabilmesi için gerekli parametreleri de karakterize etmiştir.^{77,78}

İlizarov eksternal fiksatörü; ekstremitenin kapalı (metafizler, diafizler ve özellikle de epifizler) kırıklarında, konjenital ve travmatik psödoartrozların tedavisinde, kaynamama (nonunion) ve kötü kaynama (malunion) durumlarında, komşu eklemlerle ilişkili ya da ilişkisi olmayan açık kırıklarda, geniş kemik, damar ve yumuşak doku kayıplarında, greft uygulamasına ihtiyaç duyulmadan tedavi edilen olgularda, eklem artrodezinde, eklem kontraktürlerinin giderilmesinde, uzun kemiklerin ve eklem deformitelerinin düzeltilmesinde, kemik tümörü rezeksiyonundan sonra ekstremitede oluşan defektin uzatma ile giderilmesinde, mandibula

hipoplazilerinin sağaltımı için maksillofasiyel cerrahide, kırık uçlarının kompresyon veya distraksiyonunda ayrıca vasküler ve osteojenik aktiviteyi artırarak, enfeksiyonun giderilmesinde endikedir .⁷⁶

İlizarov eksternal fiksatorü, diğer eksternal fiksatorlerle (Unilateral Hoffman, Wagner, Oxford ve Orthofix gibi) karşılaştırıldığında, torsiyonel ve anterio-posterior bükülmelerde daha fazla stabiliteye sahip olurken, lateral bükülmelerde daha az stabilite gösterir. Aksiyel stabilite ise diğer lineer eksternal fiksatorlerden % 80 daha azdır. Bununla birlikte İlizarov fiksatorleri, uniplanar ve biplanar fiksatorlere oranla % 75 daha az aksiyel dirence sahiptirler (Şekil 25).



Şekil 25: İlizarov tipi distraktörün (üstte) unilateral distraktör ile (altta) karşılaştırılması

İlizarov'un tanımladığı Gerim-stres teorisine göre, sürekli traksiyon, canlı dokuların birçoğunda aktif büyümeyi stimüle eden stresler oluşturur. Yavaş ve sürekli traksiyon sonucu dokular metabolik olarak aktif hale gelir. Bu aktivasyonun başlıca nedeni, dokuya gelen kan miktarının artması ve fonksiyonel kullanım ile verilen ağırlığın simülatör etki göstermesidir. Distraksiyon aralığındaki yeni kemik oluşumu, distraksiyon kuvvetlerine paralel bir gelişim gösterir. Gerim-stres kuvvetlerinin etkisi altındaki kemikte rejenerasyon zonu ortasında bulunan büyüme bölgesinde fibroblast benzeri hücrelerin gerim yönünde dizilen kollajen fibrilleri oluşturduğu ve

osteoblastların bu temel üzerine osteoid dokuyu örerek proksimal ve distale doğru yeni kemik büyümesini sağladığı gösterilmiştir. Sinüzoidal kapillerlerin etrafına yerleşen yüksek biyolojik aktiviteli bu hücrelerin, kondroiden çok osteoid dokuya benzediği de araştırmalarla ortaya konmuştur. Ilizarov'un yaptığı histolojik çalışmalar, distraksiyon osteogenezin primer olarak intramembranöz ossifikasyon ile oluştuğunu göstermiştir.²

Distraksiyon, yalnızca longitudinal planda değil transvers olarak da yapılabilir. Transvers distraksiyon, çift kemikli ekstremitelerdeki kemik defektlerinin tedavisinde, ekstremitte kalınlaştırılmasında ve dolaşım bozukluklarında neovaskülarizasyon amacıyla kullanılmaktadır. Transvers distraksiyon sırasında, yönü split fragmanın gerim vektörü boyunca uzanan yeni damarlanmalar gösterilmiştir. Yedinci günden itibaren, distraksiyonun büyüme zonu içinde iki tip kapiller ağı oluşmaya başlar. Bunlardan birincisi, geniş lümenli ve endotelinde kapakçıklar olan sinüzoidal kapiller ağı; ikincisi ise, dar lümenli ve endoteli devamlılık gösteren transport kapiller ağıdır. Yeni oluşan kapillerlerin büyümesi o denli aktiftir ki, distraksiyon hızını aşarlar ve vasküler endotelin luminal yüzünde kıvrımlar oluştururlar. Gerim-stres etkisi altında oluşan ve oryantasyonu longitudinal olan bu neovaskülarizasyon sadece kemikle sınırlı kalmayıp, yumuşak dokularda ve hatta canlı olmayan greft dokularında da izlenir. Ayrıca ciltte de distraksiyonun yirminci gününden itibaren aktif bir angiogenezis gözlenmektedir.²

Gerim-stresi etkisini yalnızca kemik üzerinde değil, yumuşak dokular üzerinde de gösterir. Ondört günlük distraksiyon sonrasında, iskelet kası mitokondriyumlarının hipertrofiye olduğu, multipl kristalar oluşarak, kas volümlerinin genişlediği saptanmıştır. Ancak Aronson yaptığı çalışmalarla, kortikotomi hattını geçen kaslardaki uzamanın kemiğe oranla daha yavaş olduğunu, bu nedenle de femoral veya tibial uzatmalarda eklemlerde kıkırdak harabiyetleri oluşarak, hareket kısıtlılıklarının ortaya çıktığını saptamış ve ekstremitenin %30 oranında uzatılmasının eklem kıkırdağında dejenerasyon ve hareket kısıtlılığına neden olduğunu göstermiştir.²

4.10.1 Osteotomi kuralları ve osteotomi seviyesinin belirlenmesi:

Kemik remodellingi sırasında distraksiyondaki aktif osteogenez görevini aktif hematopoeze yönelten kemik iliğinin, kortikotomi sırasında korunması gerekmektedir. Kortikotomiye takiben yapılan distraksiyonun ikinci haftasından itibaren kemik iliği hücrelerinin eritrosit, eritroblast ve monosit prekürsörleri salgıladığı görülmüştür. Ayrıca, kortikal kemiğin beslenmesinin 2/3'ünün kemik iliğindeki nutrisyonel, 1/3'ünün ise periosteal arterler tarafından sağlandığı da bilinmektedir. Bu nedenlerden dolayı, kortikotomi sırasında kemik iliği ve periostun korunması ve yalnızca kompakt kemiğin kesilmesi gerekmektedir. Yüksek enerjili kesiciler, kemik ve yumuşak dokularda nekroza neden olacakları için kesme işlemi, gigli testeresi veya osteotomla yapılmalıdır. Kortikotomi yapılırken aşağıdaki kurallara uyulması gerekir.²

1. Besleyici arterler özenle korunmalıdır.
2. Kortikotomi için metafizer bölge kullanılmalıdır.
3. Kortikotomi, eklemde 6-7 cm uzaktan yapılmalıdır.
4. Kortikotomi hattı nedbelere uzak olmalıdır.
5. Kortikotomi, 0.5-1 cm'lik osteotomla ve korteks yelpaze tarzında kesilerek yapılmalıdır.

Klasik kortikotomi, perkutanöz ve subperiostaldır. Son yıllarda yapılan çalışmalar, kortikotomi sırasında endosteal arterin sağlam kaldığını ve defektin giderilmesinde periostun medüller yapılardan daha önemli bir rol oynadığını ortaya koymuştur. Yine bu çalışmalarda kortikotomi ile transvers osteotomi arasında klinik ve radyolojik olarak farklılık saptanamamış; hatta, osteotominin daha güvenli ve kolay uygulanabilir bir teknik olduğu belirlenmiştir. Çünkü kortikotomide özellikle korteksin manipülasyonla kırılması sırasında vasküler yapılar kolaylıkla yaralanabilir. Yaralanan vasküler yapıların bir hafta gibi kısa sürede yeniden rekanalize olduğu gösterilmiş olmasına rağmen, periost korunarak yapılan transvers osteotominin en güvenilir yol olduğu bildirilmiştir.⁷⁹

Osteotomi seviyesinin saptanmasında aşağıdaki kriterler göz önünde tutulmalıdır:

1. Deformitenin tipi
2. Fiksasyonun tipi
3. Yapılması planlanan osteotominin fizis, eklem ve yumuşak doku ile ilişkisi
4. Kemiğin osteotomi seviyesindeki kalitesi.

Operasyondan hemen sonra başlanan distraksiyon, kallus oluşumunda duraklamaya neden olur. Bu konuda yapılan çalışmalar, en iyi kemik iyileşmesinin 7-10. günlerde başlatılan distraksiyon ile elde edildiğini göstermiştir. Bu sayede, kortikotomi sırasında intramedüller damarlar zedelense bile, bunlar distraksiyon öncesindeki bu bekleme süresinde iyileşebilmektedirler. Bekleme süresi üzerine etkili olan diğer faktörler ise hastanın yaşı ve kemiğin kalitesidir. Genç hastalardaki tibia ve femur gibi uzun kemiklerde distraksiyon öncesindeki en uygun bekleme süresi 7-14 gün iken, küçük tübüler kemikler için en uygun süre 21 gün olarak belirlenmiştir.⁷⁹

Damarsal yapıların korunduğu en uygun uzatma ritmi 12 saatte 0,35-0,7 mm'dir. En uygun uzatma oranı ise günde 0,7-1,4 mm'dir. Ilizarov yaptığı çalışmalar sonucunda, günde dört kez 0,25 mm'lik uzatmayı önermiş, en iyi sonucun ise otodistraktör ile 60x0.0085 mm'lik uzatmada alındığını bildirmiştir.² Hayvan çalışmaları 2 mm/gün ve üzerindeki distraksiyon hızlarında kemikte gecikmiş birleşme veya birleşememe gibi durumlar oluştuğunu göstermektedir. Aksine 0,3–0,5 mm/ gün gibi yavaş hızlarda ise prematür birleşme olmaktadır. Tavşanlarda yapılan bir çalışmada ise 0,7 mm/gün hızla yapılan distraksiyonun hücre proliferasyonu ve kemik formasyonu için uygun hız olduğu belirtilmiş, 1,3 mm/gün' den daha hızlı distraksiyonun ise kemik formasyonu ortamını engellediği gösterilmiştir.⁷⁷

4.10.2 Distraksiyon Osteogenezin Biyolojik Temeli

Fizyolojik kuvvetler, iskeletsel sistemin büyüme ve idamesinde anahtar rol oynarlar. Distraksiyon osteogenezini (DO), büyümeyi, gerilim kuvvetleri uygulayarak yapar. Başarılı DO'de, fiksasyonun stabilitesinin günlük distraksiyon miktarının, lokal yumuşak doku kılıfının korunmasının ve damar miktarının rolü olduğu saptanmıştır. Bununla beraber distraksiyon ile ilgili biyomekanik, histolojik ve ultrastruktural

değişiklikler de tanımlanmıştır. Distraksiyon osteogenezi osteotomi safhası, latent periyot, distraksiyon periyodu ve konsolidasyon periyodu olmak üzere 4 periyottan oluşur.⁸⁰

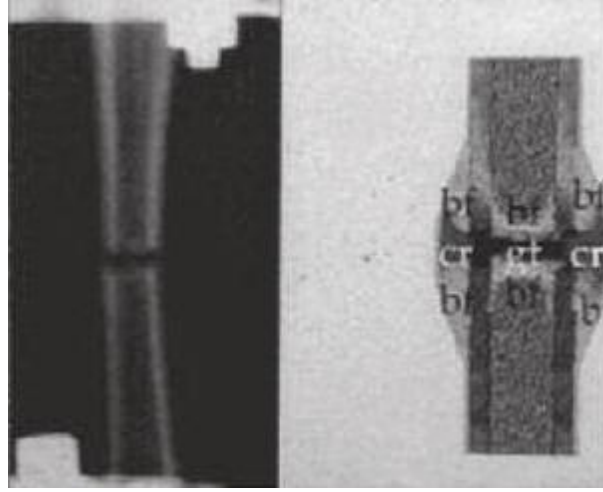
1- Osteotomi safhası

Osteotomi safhası, distraksiyon osteogenezi uygulanacak bölgede kemiğin birbirinden ayrılarak fragmanların oluşturulmasını ve distraksiyon aparatının yerleştirilmesini içermektedir. Kemikte meydana gelen bir kırık veya uygulanan bir osteotomi kemik rejenerasyonunu başlatmaktadır. Bu işlemi takiben tamir işlemini düzenleyen iskeletsel büyüme faktörleri aktive olmaktadır. Bu büyüme faktörleri etkisi altında primitif hücreler önce preosteoblastlara sonra osteoblastlara dönüşmektedir.

2- Latent Periyot:

Latent periyot, osteotomi yapıldıktan ve aparat yerleştirildikten sonra beklenen iyileşme süresidir. Latent döneme ait histolojik olaylar fraktür iyileşmesine benzerdir. Geleneksel olarak fraktür iyileşmesi dört fazdan oluşmaktadır. Bunlar inflamasyon, yumuşak kallus oluşumu, sert kallus oluşumu ve remodeling olarak sıralanabilir. Distraksiyona ait rejenerat formasyonu da aynı fazlar takip edilerek değerlendirilmektedir. Kemiğin cerrahi olarak iki segmente ayrılması sonrası bir dizi olay meydana gelmektedir.^{2,81}

Başlangıçta vasküler devamlılığın bozulması ile yaralı kemik sonlanımı ve çevre kemik segmentleri arasında hematoma oluşur. Hematom zamanla pıhtıya dönüşür ve fraktür segmentlerinin uç kısımlarında kemik nekrozu oluşmaya başlar. Sonrasında kanlanmanın tekrar sağlanabilmesi için vazofomatif eleman ve kapillerlerin gelişimi ile aşırı biçimde hücresel proliferasyon meydana gelir. Pıhtı kısa bir süre içinde inflamatuvar hücreler, fibroblastlar, kollajen ve kapillerler içeren granülasyon dokusu ile yer değiştirir (Şekil 26).



Şekil 26: Osteotomi ve Latent Periyot. Granülasyon dokusu, fibröz dokuya dönüşür. Kapiller ağ oluşur ve osteojenik hücreler kapillerlerin terminalinde lokalize olur. (bf: kemik fragmanı, cr: kırıldak rekodelasyonu gt: granülasyon dokusu)

İnflamasyon sürecinin 1-3 gün sonrasında kallus formasyonu başlar. Yaklaşık üç hafta süren yumuşak kallus safhası sırasında, granülasyon dokusu, fibroblastlar tarafından fibröz dokuya dönüştürülür.

Yeni oluşan kapillerlerin terminal kısımlarında, kallus içerisinde yer alan mezenkimal kök hücreleri ve serbest dolaşan kök hücreleri görülür. Yumuşak kallus aşaması boyunca granülasyon dokusu kırıldak dokusu ile de yer değiştirir. Bu olay merkezden ziyade fragmanlar arası boşluğun periferinde meydana gelir. Normal fraktür iyileşmesinde yumuşak kallusa ait bu fibrokartilojen doku, kırıldak rezorpsiyonu ve yeni kemik formasyonu ile sert kallusu oluşturan immatür örgü kemiğe dönüşür. Kapillerler kırıldak içerisine invaze oldukça kırıldak kalsifiye olur. Kalsifiye kırıldak matriksi de rezorbe oldukça bu rezorpsiyon boşluklarına osteoblastlar gelerek yeni kemik sentezlerler. Sert kallus aşaması birçok kırıkta 3 ila 4. ayda sona erer ve bunu örgü kemiğin rezorbe olarak yer değiştirme olayı ile beraber yavaş yavaş lamellar kemiğe dönüşmesi olayı takip eder.

3- Distraksiyon periyodu:

Distraksiyon periyodu dereceli traksiyonun uygulandığı ve yeni kemik veya distraksiyon rejeneratının oluştuğu dönemdir. Distraksiyon osteogenez boyunca fraktür iyileşmesine ait normal süreç yumuşak kallusa dereceli traksiyon

uygulanması ile kesintiye uğrar. Yumuşak kallusun fragmanlar arasındaki dokularına tansiyon streslerinin uygulanması ile dinamik bir mikro çevre meydana gelir. Bu çevre yeni doku formasyonunun traksiyona ait vektöre paralel olmasını sağlar. Mekanik tansiyon doğal büyüme ve gelişimde morfogeneze ait temel faktörlerden birisidir. Bu fenomen Ilizarov'un distraksiyon osteogenez tekniklerinde de yararlandığı ve Ilizarov etkilerine ait bulgulardan birisi olarak ortaya koyduğu bir fenomendir.

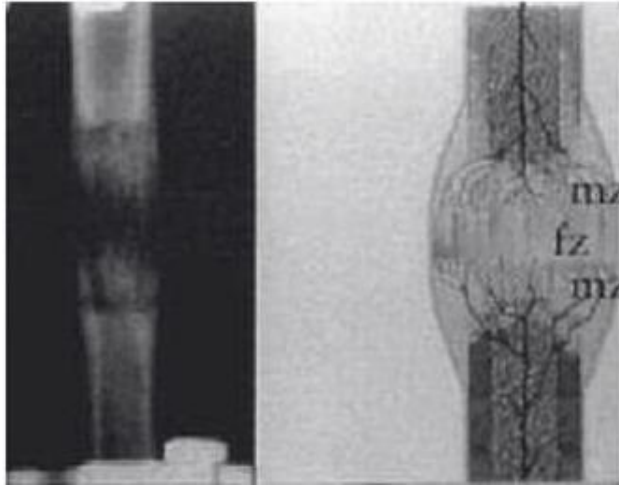
Distraksiyonun başlaması ile beraber yumuşak kallusa ait fibröz doku distraksiyon aksına paralel olarak oriyante olur. Kollajen lifler arasında lokalize olan iç şekilli fibroblast benzeri hücreler de distraksiyon yönüne paralel olarak yerleşir. Kollajen liflere ait bu hücreler fragmanlar arası dokuların distal ve proksimal sonlanımlarındaki hücreler olarak iki gruba ayrılır. Distraksiyonun 7. ve 9. günleri arasında fibröz dokulara doğru kapiller büyümesi olur. Bu olay vasküler ağın yalnızca boşluğun merkezine değil komşu kemik segmentlerinin medüller kanallarına da yayılmasını sağlar.

Yeni oluşan *kapiller loop*lar birbirine ve distraksiyon aksına paralel yer almaktadır. Sıklıkla distraksiyon rejeneratı içerisinde yeni gelişen damarlar spinal bir yol izlerler ve birçok sirküler kıvrıma sahiptir ki bu da distraksiyondaki damar gelişim hızının normal fraktür iyileşmesinde yaklaşık on kat fazla olduğunu göstermektedir. Kapiller terminaller fibroblast, kondroblast veya osteoblasta dönüşme potansiyeline sahip az farklılaşmış hücreler sağlayarak fibröz dokuları aktive ederler.

Distraksiyonun ikinci haftası boyunca primer osteonlar oluşur. Kollajen lifler arasında lokalize olmuş osteoid meydana getiren osteoblastlar bu lifler üzerinde osteoid doku sentezlerler ve kollajen ve osteoidin sirkumferansiyel apozisyonu sonucu kemik speküllerinin genişlemesiyle beraber zarf içerisine alınırlar. Mevcut kemik duvarlarından osteogenez başlatılır ve osteogenez, distraksiyon boşluğunun merkezine doğru ilerler. İkinci haftanın sonunda ise osteoid mineralize olmaya başlar. Bu dönemde distraksiyon rejeneratı spesifik bir zon yapısına sahiptir. Distraksiyon boşluğu içerisinde az mineralize olmuş, radyolusent, fibröz bir ara zon yer alır ki bu zonda tansiyon streslerinin etkisi maksimumdur. Yine aynı zon matriks boyunca lokalize olmuş, organize, longitudinal yerleşimli ve iç şekilli fibroblastlar ile

farklılaşmamış mezenkimal hücrelere sahip paralel kollajen demetleri içermektedir. Ara zon fibroblastik proliferasyon ve fibroz doku formasyonunun merkezi olarak fonksiyon görür (Şekil 27).

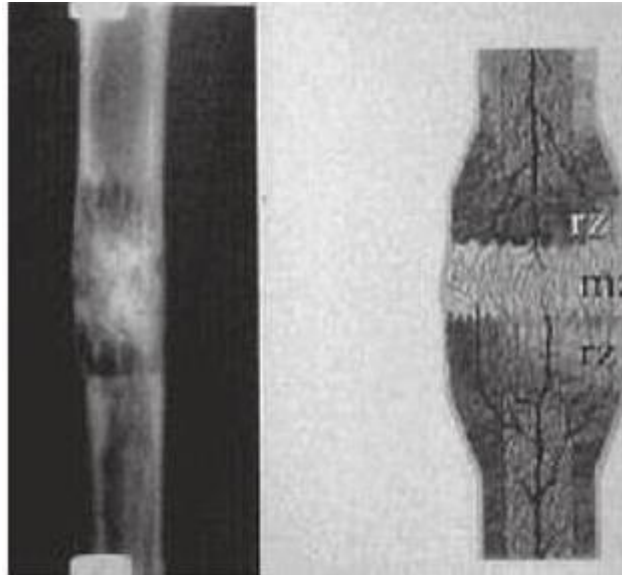
Günlük distraksiyon kollajen lifleri, gelişmekte olan damarları ve longitudinal kompartmanlara yerleşen perivasküler hücreleri kanalize edecek konuma getirir. İnvaze olan damarlar periosteal zarf ve kemik sonlanımlarındaki medüller sistemden çıkar. Bu fibröz ara zonun periferinde osteoblastlara ait bir tabaka ile örtülü ve birbirine doğru büyüyen, longitudinal yerleşimli, silindirik primer osteonlardan oluşan iki zon bulunmaktadır. Tansiyon vektörü boyunca oluşan kemik formasyonu distraksiyon periyodu süresince açık kalan primer osteonlara ait gelişmekte olan uç kısımlar tarafında idame ettirilir. Bu yüzden bu alanlar distraksiyon rejeneratının elongasyon periyodu boyunca aktif osteogenezi sağlayan büyüme zonları olarak fonksiyon görürler. Rejeneratın elongasyonu ve boyu distraksiyonun özellikle erken evrelerinde hızla büyüyen primer osteonların gelişmesine bağlıdır. Distraksiyon boşluğu büyüdükçe kemik sütunları da uzar ve kalınlaşır. Distraksiyon rejeneratındaki yeni oluşan dokuların bölgesel yayılımı distraksiyon periyodunun sonuna kadar sürer. Son olarak rejeneratın birleşim yeri ve konakçı kemik segmentlerinde iki adet ilave primer osteon remodeling zonu belirgin hale gelir.



Şekil 27: Distraksiyon alanının ortasında radyolüsent fibröz interzonlar oluşumu (fz: kırık alanı, mz: mineralizasyon alanı)

4- Konsolidasyon (Pekiştirme) Periyodu:

Konsolidasyon periyodu traksiyon kuvvetlerinin durdurulması sonrası rejeneratın matürasyon ve kortikalizasyonuna izin verilen dönem olarak bilinir. Distraksiyon tamamlandıktan sonra fibröz ara zon dereceli olarak kemikleşir ve belirgin bir örgü kemik zonu, boşluğu tamamlar. Distraksiyon rejeneratı predominant olarak intramembranoz kemikleşme ile form alır. Rejeneratın bulunduğu alanda kırıldak adacıklarına da rastlanabilir. Rejenerat olgunlaştıkça primer osteonlara ait zonlar belirgin biçimde azalır ve sonunda tamamen rezorbe olur. İlerleyen aylarda, başlangıçta oluşan kemik iskeleti paralel fibriller ve lamellar kemik gelişimi ile kuvvetlendirilir. Hem kortikal kemik hem de ilik kavitesi restore edilir. Kortikal rekonstrüksiyonun son aşaması olarak kemik yapısı havers sisteminin remodelingi ile normal haline gelir. Distrakte edilen kemiğin maturasyonu yani yeni oluşan kemiğin eskiden mevcut olan kemik ile aynı yapıya kavuşması yaklaşık 1 yıl veya daha fazla sürer (Şekil 28).^{77,80,129}



Şekil 28: Konsolidasyon periyodu (rz: remodelasyon alanı, mz: mineralizasyon alanı)

4.10.2.1 Distraksiyon histogenezi

Distraksiyon kuvvetleri kemiğe uygulansa da gerilim kuvvetleri yumuşak doku çevresinde yaratılır. Dokularda adaptasyon değişiklikleri sırasıyla başlar, ki bu distraksiyon histogenezi olarak adlandırılır. Distraksiyon sonucu üretilen gerilim stresinin etkisi altında farklı dokularda deri, fasya, kas, tendon, kıkırdak, kan damarları ve periferal sinirlerde aktif histogenezis meydana gelir. Distraksiyon osteogenezi klinik pratiğinde uygulandığında, her ne kadar tüm yumuşak dokular etrafında normalden fazla lokal gerilim kuvvetleri olsa da kaslar ve sinirler primer limit faktörleridir. (80,77)

Morfolojik olarak farklı dokular, farklı yollarla reaksiyon gösterir. İki primer adaptasyon mekanizması vardır; (1) Gerim-Stres sonucu neohistogenezis ve büyüme stimülasyonu ve (2) Aşırı gerilme sonucu reversible reaktif değişiklikler, dejeneratif değişiklikleri takiben olası rejenerasyon.^{80,129}

4.10.3. Distraksiyon Osteogenezde Olası Komplikasyonlar:

Distraksiyon osteogenez esnasında oluşabilecek komplikasyonlar en iyi D.Paley tarafından tanımlanmıştır.⁸² D.Paley kemik uzatma sırasında oluşabilecek zorlukları; *sorun*, *engel* ve *komplikasyon* olarak sınıflamıştır. “Sorun” cerrahi müdahale gerektirmeden çözülebilecek problemleri temsil ederken, “Engel” ise cerrahi müdahale gerektiren problemleri temsil etmekteydi. Cerrahi sırasında oluşan tüm yaralanmalar ise komplikasyon olarak değerlendirilmekteydi. Kemik uzatma sırasında oluşabilecek problemler şunlardır; kas kontraktürleri, eklem luksasyonu, aksiyal deviasyon, nörolojik yaralanma, vasküler yaralanma, prematür konsolidasyon, gecikmiş konsolidasyon, kaynamama, pin dibi problemleri ve distraktör aleti ile ilgili sorunlar.

Geç komplikasyonlar arasında refraktürler ve aksiyal deviasyon sık rastlanır, uzamada gecikme ya da kallus çökmesi de komplikasyonlar arasındadır.⁸³ Ayrıca kallus çökmesini etkileyebilecek diğer faktörler; dinamik ağırlık binmesi, çerçeve çıkarıldığında yetersiz kemik iyileşmesi, hastanın yaşı, etiyoloji, uzama miktarı, kallus çapı olarak sıralanabilir.⁸³

Komplikasyonlar distraksiyon yerleştirilmesi sırasında ya da uzun dönemde oluşabilir:

A- İmmediat dönem

1. Osteotomi sonrası vida deliklerinin bulunamaması
2. Distraktor plağı veya vidasının kırılması

B- Erken dönem

1. Enfeksiyon
2. Distraktörün gevşemesi
3. Parestezi-paralizi
4. Uyumsuzluk

C- Geç dönem

1. Hatalı kuvvet vektörü
2. Relaps
3. Prematür kemik birleşmesi
4. Sinir zedelenmesi
5. Atipik ağrılar
6. Distraktor yaralanması
7. Fibroz birleşme
8. Paralizi
9. Fonksiyon kaybı⁷⁷

Distraksiyon Osteogenez esnasında karşılaşılan klinik sorunlar maddeler halinde Őöyle sıralanabilir:

- 1- Rejenere kemigin maturasyon ve ossifikasyonunda gecikme
- 2- Hedef bölge kaynama yetersizliği
- 3- Ekstremitte uzunluk eşitsizliği

- 4- Eklem kontraktürleri
- 5- Cilt ve tel sorunları
- 6- Cilt kıvrılması
- 7- Cihaza uyum sorunu
- 8- Refraktür
- 9- Prematür konsolidasyon
- 10- Aksiyel deformite oluşumu⁷⁹

Başarılı bir distraksiyon osteogenez gerçekleştirmek için gerekli başarı kriterleri ise şunlardır:⁸⁴

1- Osteojenik dokuların korunması: Özellikle osteotomi sırasında önemlidir. Osteotomi ile kemik iliği kanlanması kesintiye uğratıldığı için hareketli segmentin canlılığı distraksiyon osteogenezde en kritik noktadır. Bu aşamada kemiğin kanlanması için en önemli kaynak periosttur.⁸⁵ Bu yüzden cerrahi sırasında periostun zarar görmemesi esastır.⁴⁴

2- Distraksiyon apareyinin stabilizasyonu: Apareyin gevşemesi durumunda segmentin kaybedilmesi, enfeksiyon veya nadiren relaps gibi durumlar ortaya çıkabilir. Bunun için Ilizarov uzun kemiklerde halka şeklinde bir distraktör kullanılmasını önermiştir.⁵³

3- Uygun latent periyot: Osteotomi prosedüründen, apareyin yerleştirilerek distraksiyon prosesinin başlamasına kadarki süre olarak bilinir. Bu periyot hareketli segment ile onun ayrıldığı kemik arasında fibrovasküler bir köprü oluşmasını sağlar. Literatürde çeşitli bilgiler yer alsa da 5-10 günlük bir latent dönem yeterli görülmektedir.^{53,86}

4- Uygun distraksiyon hızı: Kemik segmentlerinin hareket ettirildiği mesafe olarak bilinmektedir.

5- Uygun distraksiyonun ritmi:

6- Uygun konsolidasyon periyodu

4.11. KÖK HÜCRE TANIMI, ÖZELLİKLERİ VE ELDE EDİLMESİ

Kök hücreler, uzun süreyle bölünebilme ve kendilerini yenileyebilme kapasitesine sahip, kendilerinden başka hücrelere kaynaklık edebilen (farklılaşabilen) ve hasarlı dokuya nakil sonrasında kaynak dokuyu işlevsel olarak çoğaltabilen hücreler olarak tanımlanmışlardır. Farklı sınıflamalar olmakla birlikte kök hücreleri buldukları dokuya göre embriyonik kök hücreleri ve erişkin kök hücreleri olmak üzere iki genel gruba ayrılabilir. Farklanma potansiyellerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılırlar (Tablo 2).⁵⁶

İsim	Hücre Tipi	Farklanma Potansiyeli	Progeni
Embriyonik KH	Morula aşamasındaki hücreler, Blastosistin iç hücre kitlesindeki hücreler	Totipotent Pluripotent	Embriyon ve embriyon dışı hücreler Embriyo gövdesi (tüm somatik ve germ hücreleri)
Embriyonik KH	Gastrula aşamasındaki epiblast tabakasındaki hücreler	Pluripotent	Endoderm, mezoderm, ektoderm
Embriyonik KH	Ektoderm, mezoderm ve endoderm hücreleri	Pluripotent	Bütün somatik hücreler
Dokuya özgü kök hücre	Dokulardaki özgün hücreler	Multipotent	Bulunduğu dokuya göre bir veya daha çok türdeki hücre (örn; hematopoetik hücre)
Dokuya özgü kök hücre	Belli bir dokudaki yerleşik hücre	Unipotent	Tek bir hücre türü (örn; kas dokusundaki satelit hücre)

Tablo 2: Kaynağına, farklanma yeteneğine ve köken verişlerine göre kök hücrelerin sınıfları.

1) Totipotent kök hücreler :

Sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme özelliğinde olan kök hücrelerdir. Bu hücreler embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar ile embriyo dışı membranların ve organların kaynağını oluşturan kök hücre türleri olarak tanımlanırlar. Bu hücreler embriyo, bütün embriyo sonrası doku ve organlar ile embriyo dışı membranları ve organları veren kök hücrelerdir.

2) Pluripotent, multipotent kök hücreler.

Organizmada birçok dokunun oluşmasına kaynak oluşturan kök hücrelerdir.

3) Unipotent kök hücreler.

Multipotansiyel kök hücresi ve bu hücrelerin bölünmeleri sonucu oluşan ve tek bir yönde farklılaşmak üzere programlanmış bulunan hücrelerdir⁸⁷ (Tablo 3).

Kısaltılmış Biçimi	Anlamı	Örnek
Toti	Bütün	Embriyon
Multi	Birçok	Hematopoetik
Pluri	Çok	Hematopoetik
Oligo	Az	GIS hücreleri
Quadri	Dört	GIS hücreleri
Tri	Üç	Bronş epiteli
Bi	İki	Safra kanalı
Uni	Tek	Prostat

Tablo 3: Kök hücre tanımlamalarında kullanılan kısaltmalar ve anlamları

4.11.1. Embriyonik Kök Hücreler

Kök hücreler birden fazla hücre tipine farklılaşabilirler. Bunun en iyi örneğini döllenmiş yumurta hücresi ya da zigottan itibaren görebiliyoruz. Vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilecek potansiyele sahip bu ilk embriyonel hücreye “*totipotent*” hücre denmektedir. Bu hücreler sınırsız farklılaşma ve farklı yönlere gidebilme yeteneğine sahip kök hücrelerdir. Erken embriyoner dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttir. Fertilizasyonun yaklaşık 5. gününde bu hücreler “*blastokist*” denilen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşürler. Blastokistin

iç hücre kitlesindeki hücreler (embriyoblastlar), endoderm, ekdoderm ve mezodermden köken alan çok farklı hücre çeşidine (yaklaşık 250 çeşit) farklılaşabilirler.⁵⁶ Bu özelliğe sahip hücelere “pluripotent” hücreler denir. İnsan embriyonel kök hücreleri blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler ve pluripotenttirler. Embriyonel kök hücreler yüksek seviyede telomeraz aktivitesi içerirler, hücre replikasyonu ile aktivasyonda azalma gözlenmez, bu nedenle sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler. Bu aşamada embriyon gövdesi dışına çıkarıldıklarında deneysel yolla farklılaşmaları ve dokulardaki hücelere benzer hücelere dönüşebildikleri birçok kez gösterilmiştir. Ancak yüksek telomeraz enzimi etkinliği sonucunda kontrolsüz çoğalmayla tümör hücresine dönüşme olasılığı da yüksektir.¹⁰⁷

Gelişimin ilerleyen dönemlerinde (fetal hayat), hücreler biraz daha özel görevlere sahip olup erişkin tip kök hücelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreleri tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. Kemik iliği (Kİ) kök hücreleri en iyi örnektir. Biraz daha özelleşmiş bu hücelere “multipotent” hücreler denir.

Erişkin kök hücrelerinin hücre esaslı tedavilerde kullanılabilme potansiyelleri üzerinde yoğun çalışmalar devam ederken, 1998 yılında ABD’li bilim adamı James Thomson ve ekibi, ilk defa “insan embriyonik kök hücrelerini” laboratuvarında embriyondan ayıştırdılar ve çoğalttılar. Bu oldukça önemli bir gelişmeydi, çünkü bu hücrelerin çoğalma ve farklılaşma potansiyelleri erişkin bir insandan elde edilen kök hücelere (kemik iliği kök hücreleri gibi) oranla çok daha fazlaydı. Ancak embriyonik kök hücrelerin doku reddi sorunu, klonlanırsa da legal sorunları mevcuttur.⁵⁷

Embriyonel kök hücreler sadece tıp doktorlarının değil aynı zamanda biyologlar, media, etik, din, hükümetler ve politikacıların da ilgi alanıdır ve aynı zamanda implantasyondan hemen önceki insan embriyolarından elde edildiği için tartışma konusudur. Bu “süper hücrelerin” doku tamiri, çoğu sakatlık durumunun giderilmesinde, organ fonksiyonlarının yerine konmasında yeri olduğu gözükmektedir. Diabetes mellitus, Parkinson hastalığı, inme, artrit, multiple skleroz, kalp yetmezliği, spinal kord lezyonları, kemik yenilenmesi hedef hastalıkları oluşturmaktadır. Embriyonel kök hücreler tüm somatik dokuları oluşturabildiği halde,

plasenta ve membranları gibi gelişim için gerekli olan diğer tüm ekstra-embriyonik dokuları oluşturmaz, böylece tam yeni kişiyi oluşturması mümkün değildir.^{56,57,88}

4.11.2. Erişkin Kök Hücreler

Erişkin bir kök hücresi, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup, bu hücre kendisini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerinin yaşayan organizmadaki esas görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır.⁵⁴ Bazı bilim adamları, erişkin kök hücresi yerine artık “somatik kök hücresi” terimini kullanmaktadır.

Postnatal (adult) kök hücreler totipotent değil pluripotent'tir. Bu hücrelerin geniş bir farklılaşma kapasitesi olsa da embriyonik kök hücreler kadar değildir. İlk başlarda erişkin kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerini sınırlayanın köken aldıkları doku olduğu düşünülürdü ancak yapılan çalışmalar gösterdi ki köken aldıkları dokudan bağımsız olarak bu kök hücreler mezodermal ektodermal ve endodermal farklılaşma gösterebilmektedir.⁵¹

Kök hücre bir yandan kendi yedeğini meydana getirirken, bir yandan da yenilenecek dokunun gereksinimi olan ve farklılaşma yönünde ilerleyecek hücrelere dönüşür. Yetişkinde kök hücreler çeşitli organ ve dokularda bulunurlar, örneğin olgun kan hücreleri kemik iliğinde yer alan hematopoetik kök hücrelerinden köken alırken bağırsak epitelinin her üç-dört günde bir yenilenen hücreleri bağırsak kriptalarının dibinde yer alan kök hücrelerden çoğalarak ve farklılaşarak oluşurlar (Tablo 4). Günümüzde kanser hücrelerinin de kök hücrelerin çoğalması ve ileri farklılaşması sürecindeki dengesizlikten kaynaklandığı konusunda somut veriler bulunmaktadır. Dolayısıyla kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasını kontrol eden mekanizmaların ortaya çıkarılması, kanserin fizyopatolojisini ortaya koymanın yanı sıra metabolik, dejeneratif ve immünolojik hastalıkların hücre ve genlerle tedavisinde yeni bir dönemin açılmasına öncülük edecek güçtedir.¹⁰⁷

Kök Hücre	Kaynak	Üretilen
Hematopoetik	Kemik İliği	Kan, endotel, hepatosit, kas hücreleri
Nöral	Beyin	Nöronlar, astrositler, oligodendrositler, kan hücreleri
Epitelyal	Barsak, epidermis	Epidermal katlardaki tüm hücreler
Mezenkimal	Kemik iliği, yağ, kıkırdak	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, ilik stroması, nöral hücreler
Embriyonik	Primordial germ hücreleri, blastokist hücreleri	Bütün hücreler

Tablo 4: Kök hücre kaynakları ve üretilen hücreler

Erişkin kök hücreleri kendilerini yenileme özelliklerine sahiptirler ve ihtiyaç halinde farklılaşma göstererek doku ve organların tamirini, yenilenmelerini ve yaşamlarını devam ettirmelerini sağlamaktadırlar. Son yıllarda araştırılan birçok dokuda bu kök hücreler bulunmaktadır. Erişkin kök hücreler ile ilgili ilk çalışmalar hematopoetik kök hücreler ile yapılmıştır.¹¹¹

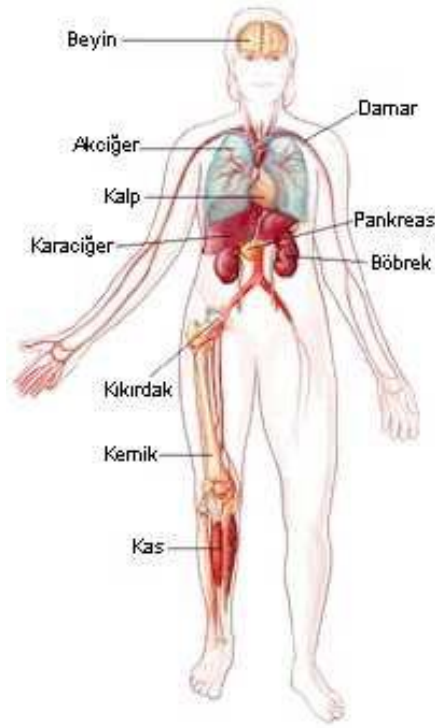
1924'de rus asıllı morfolojist Alexander A. Maximov farklı kan hücrelerine dönüşebilen öncül hücreler tanımlamıştır. 1960'larda Ernest A. McCulloch ve James E. Till, Kİ hücrelerinin klonal özelliğini ilk olarak ortaya çıkardılar.¹⁰⁰ 1970'lerde Friedenstein ve arkadaşları, multipotent Kİ hücrelerinin klonojenik özelliğini ex vivo çalışmalarla gösterdiler.¹⁰¹

Friedenstein 1976'da ilk kez MKH'lerin kendini yenileyebildiğini, değişik bağ doku elemanlarına farklılaşabileceğini ve fibroblastlara benzer yapıları olduğunu göstermiştir. Ashton ve arkadaşları 1980'de tavşan Kİ stromal hücrelerini izole edip başka hayvanlara intraperiton implante ederek kemik ve kartilaj oluşumunu göstermişlerdir. Kültürde Kİ fibroblastlarından gelişen osteosit ve kondrositler, in vivo iskelette bulunan hücrelerden ayırt edilemez.

Castro-Malaspina insan Kİ'den MKH'leri izole edip in vitro özelliklerini karakterize etmişlerdir. Bu özellikler; adherent oluşu (plastığe yapışma), monositlere benzer ama fagositik olmamaları, faktör VIII üretmedikleri için endotelial hücrelerden ayrılabilir olmaları ve sitokin üretebilme özellikleridir.

1970 yılından günümüze malign ve malign-olmayan hastalıkların tedavilerinde başarıyla uygulanan kök hücre nakli'nde erişkin türde hematopoetik kök hücreler kullanılmaktadır. Erişkin kök hücreler kemik iliğinde, periferik kanda, kan damarlarında, iskelet kasında, diş dokusunda, miyokardium içinde, karaciğerde, gastro-intestinal sistemde, over epitelinde, testislerde, akciğerlerde, meme dokusunda, adipoz dokuda, deride, beyinde, medulla spinaliste, tükrük bezlerinde ve paratiroid bezlerde gösterilmiştir. Erişkin kök hücreler aynen hematopoetik kök hücreler için gösterilmiş bulunan "*Kök Hücre Niş*"lerine ait dokular içinde (beyin, kemik iliği, periferik kan, kan damarları, iskelet kasları, deri, karaciğer, akciğer, göz, pankreas, kulak, burun, sindirim kanalı) oturarak uykuda (dormant) beklemekte veya ihtiyaç sinyali aldıktan sonra aktive olarak bölünmektedirler. Fakat bu hücreleri yerlerinde etkinleştirecek çevresel uyarıların, normalde çok düşük ya da eksik olduğu düşünülmektedir. Nitekim bazı hastalık durumlarında vücudun kendini tamir etme girişiminin engellendiğine inanılmaktadır. İşte, bu gibi durumlarda erişkin kök hücrelerinin tedavide kullanılmasına ilişkin farklı seçeneklerin kullanılması gündeme gelmiştir.⁵⁴

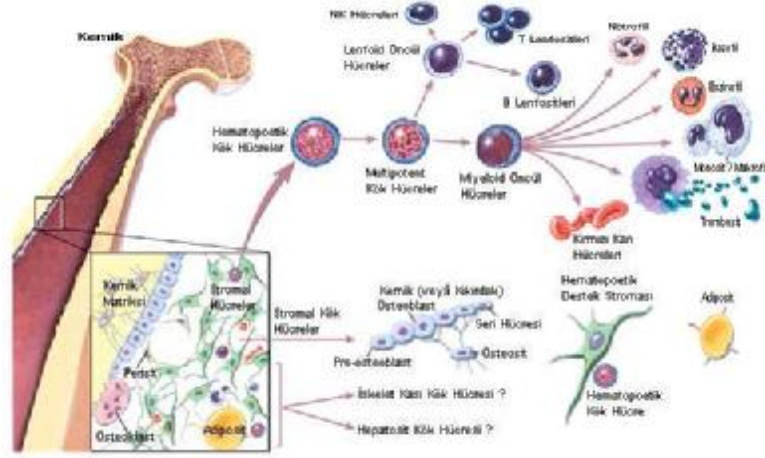
Dokular içindeki erişkin kök hücreler bölünme yeteneklerini kaybederlerse hasarlı veya hastalıklı dokuların tamiri ve yenilenmeleri imkânsız hale gelir. Erişkin kök hücreler biyolojik, genetik ve moleküler özellikleri ile kendilerinden sonraki dokuya özgül hücrelere farklılaşarak dokuyu yenilemektedirler.¹¹¹ 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 (Şekil 29).



Şekil 29: Bazı erişkin kök hücrelerin vücutta buldukları yerler

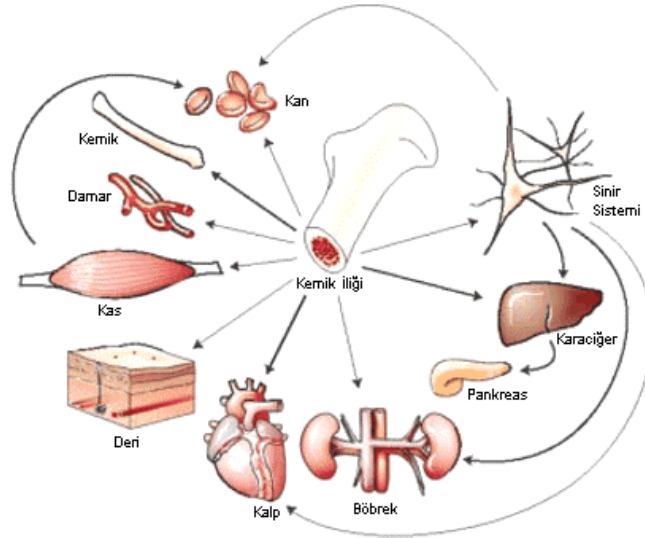
Olgun bir dokudaki hücrelerin çoğu, kendi buldukları çevreye uyum sağlamış, belirli fenotipik özellikleri olan farklılaşmış hücrelerdir. Dolayısıyla, bir organın yenilenme kapasitesi, yaşla birlikte ve etkin bir şekilde bölünebilen kök ve öncül hücrelerin sayısı ile orantılı olarak azalır. Bu sınırlamalarla birlikte vücut, dokuların yerine konulması ve yenilenmesi için iki büyük strateji geliştirmiştir. Birinci yolda, farklılaşmış ve işlev gören hücrelerdeki çoğalma kapasitesi söz konusudur. 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.⁵⁴

İkinci yolda ise, bölünebilen kalıntı kök hücrelerden gelen yeni nesil hücreler, farklılaşmış hücrelerin yerini alır. Bu kategoriye hizmet eden prototip hücre grubu kan hücreleridir. Hematopoetik kuşağın bütün hücreleri, kendisini yenileyebilen, sınırlı sayıdaki çoğalma potansiyeline sahip hücrelerden türerler ve bu hücreler, olgun kan hücrelerine farklılaşmayı kontrol eden uygun sitokinlerin ve büyüme unsurlarının etkisi altındadır (Şekil 30).



Şekil 30: Hematopoetik ve stromal kök hücre farklılaşması .

Kan hücrelerine kökenlik eden hematopoetik kök hücrelerinin farklı embriyonik kokenli (ektoderm ve endoderm) hücrelere kaynaklık edebileceğinin ortaya çıkmasıyla, erişkin kök hücrelerine yönelik araştırmalar büyük ivme kazanmıştır (Şekil 31).



Şekil 31: Erişkin kök hücrelerin farklılaşması

Kök hücrelerin doku mühendisliğinde kullanımında iki önemli özellik dikkate alınmaktadır: 1) Hücrelerin yüksek sayıda ve kolay elde edilebilmesi, 2) Uygun in vitro ve in vivo şartlarda istenilen hücre ve doku yapısına kolayca ve yüksek oranda dönüşebilmeleri. Kemik iliği ve kordon kanından elde edilen hücreler her ne kadar ikinci özelliği verimli olarak sağlayabilse de elde edilme ve alındıktan sonra sayıca çoğaltma konusunda zorluklar yaşanmaktadır.⁵⁵

Adipoz doku kaynaklı kök hücreler (AKKH) lipoaspirasyon sonrasında veya abdominal subkutan yolla alınmış yağ dokusunun mekanik ve enzimatik yollar ile ayrıştırılması ile elde edilen ve in vitro şartlarda farklanmadan büyüme özelliğine sahip hücrelerdir. İnsanda ilk kez 2001 yılında Zuk ve arkadaşları⁸, tarafından ayrıştırılarak tanımlanan ADKK hücreleri, diğer yetişkin kök hücre kaynaklarıyla karşılaştırıldığında düşük verici morbiditesi ve yüksek oranda elde edilebilme özellikleri nedeniyle doku mühendisliği uygulamaları için uygun hücre kaynağı olarak görülmektedir. Günümüze kadar farklı gruplar tarafından gerçekleştirilen birçok çalışmada bu hücrelerin in vitro gelişimleri ve farklı hücre ve dokulara dönüşümleri incelenmiş, uygun şartlarda ADKK hücrelerin mezoderm kaynaklı kemik, kıkırdak, kas, kalp kası, hücrelerine dönüşebildiği gösterilmiştir^{35,89,90} (Tablo 5). ADKK hücrelerinin kemik/kıkırdak defektlerinin tamirinde kullanımı konusunda sınırlı in vivo çalışma bulunmaktadır.⁵⁵

Kemik İliği	Adiposit Astrosit, nöron Kardiyomiyosit Kondrosit, Osteoblast, Kas Hepatosit Mezenkiyal Hücre Stroma Hücresi (fibroblast)
Kas Dokusu	Adiposit Endotel hücresi Nöron Kondrosit, Osteosit
Spongiyöz Kemik	Adiposit, Kondrosit, Osteoblast
Dermis	Adiposit, Kondrosit, Kas, Osteoblast
Adipoz Doku	Kondrosit, Kas, Osteoblast, Stroma Hücresi (fibroblast)
Periosteum	Kondrosit, Osteoblast
Perisit	Kondrosit, Osteoblast
Periferik kan	Adiposit, Fibroblast, Osteoblast, Osteoklast

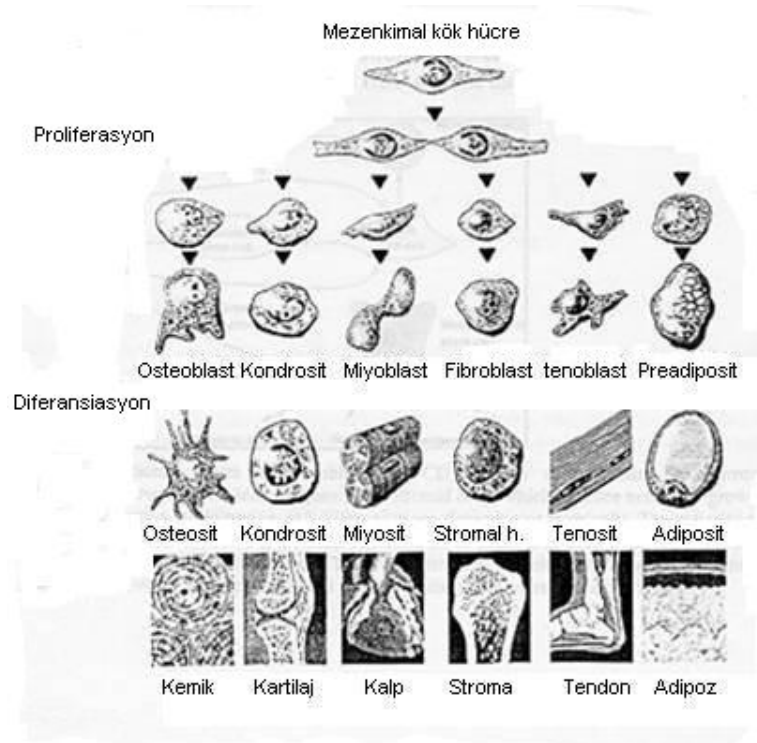
Tablo 5: Yetişkinde MKH kaynaklarına örnekler

4.11.2.1 Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler (MKH), erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeniyle genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MKH’lerin tıbbın bir çok alanında kullanım potansiyeli taşımasının temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matris ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeniyle içinde buldukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar.⁹¹

Mezenkimal kök hücreler bağ (konnektif) dokunun ana hücreleridir. Yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament gibi hücrelere farklılaşabilir (Şekil 32). Bunun yanı sıra tüm dokularda destek hücreleri olan stromal hücrelerin de kökenini teşkil etmektedirler. Bu hücreler ilk kez 1976 yılında Fridenstein tarafından tanımlanmışlardır.¹¹² Fridenstein, fetal buzağı serumu (FCS) kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren, morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir. Yıllar sonra yapılan çalışmalarda bu hücrelerin hematopoetik özellikte olmayan (non-hematopoetik) pluripotent kök hücreler olduğu, her üç germ yaprağından köken alan hücrelere farklılaşma yeteneği bulunduğu ortaya konmuştur. Önceleri, CFU-F (*Colony forming unit fibroblast*) ve “Kemik iliği stromal fibroblast”ları denilen bu hücreler daha sonra mezenkimal kök/stromal hücre olarak tanımlanmışlardır. Araştırmacılar arasında, mezenkimal kök hücrelerin tipik özelliklerini tanımlamada bazen çelişkiler yaşanmaktadır. Birçok laboratuvar, birbirinden çok da önemli farklılıklar içermeyen protokolleri izleyerek MKH izolasyonu ve bu hücrelerin çoğaltılması, farklılaşmaya yönlendirilmesi için çeşitli metotlar kullanmaktadır. Farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özelliklere sahip MKH’ler izole edilebilmektedir. Ancak yine de hücrelerin farklılaşma ve immünomodulatuvar özellikleri, in vivo etkinliği gibi konularda hücrelerin geliştirildiği çevre koşullarına bağlı değişiklikler olduğu bildirilmektedir. Bu hücrelerin, “kök hücre” olarak isimlendirilmek yerine “mezenkimal stromal hücre” (MSC) veya “multipotent mezenkimal stromal hücre” (MMSC) olarak adlandırılmaları önerilmiştir. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalarda, hücrelerin, konnektif dokular yanında endodermal ve ektodermal kökenli farklı hücrelere

dönüşebilme özelliklerinin de gösterilmiş olması, bu hücrelerin halen birçok araştırmacı tarafından “mezenkimal kök hücre” olarak bahsedilmesine neden olmaktadır. MKH tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan başlıca özellikler; plastik yüzeye yapışması (plastik adherens), stromal karakterde yüzey antijenlerinin ekspresyonu ve multipotent farklılaşma potansiyelidir.¹¹²



Şekil 32: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşma kapasitesi

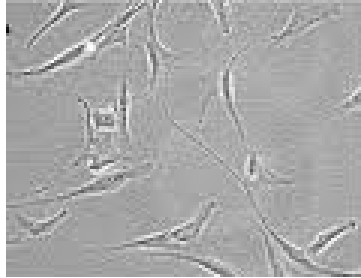
Mezenkimal kök hücrelerin karakteristik özellikleri:

- 1- Fibroblastoid, çubuk şeklinde
- 2- Cam, plastik gibi yüzeylere tutunabilir
- 3- MKHlerin toplamının yaklaşık %10 kadarı hücre döngüsünün S, G2, M fazlarında prolifere olurken %90'ı G0/G1 fazında bekler.
- 4- Kemik iliğindeki 1 milyon mononükleer hücreden 2-5 tanesi MKHdir.
- 5- Sitokin sentezi yapabilirler.

4.11.2.2 Mezenkimal Kök Hücre Kaynakları

Organizmanın en zengin kök hücre kaynaklarından biri olan kemik iliği, MKH'ler için ana kaynak sayılmaktadır. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök hücreler bulunmaktadır. 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 birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. Solid dokulardan hücre izolasyonunda enzimatik yöntemler kullanılmaktadır. Kemik/ periost, kas dokusu, diş pulpası ve maksillofasial dokular, karaciğer, lipoaspirasyon materyalleri, kordon kanı, kordon stroması, plasenta, amniyon sıvısı, sinovial sıvı, hatta periferik kandan da adezyon özellikleri nedeniyle ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür.

Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokudan bağımsız olarak plastik doku kültür kaplarına yapışabilme, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi birçok özellikleri vardır. Bu özellikler büyük ölçüde benzerlik gösterir. Ancak farklılaşma kapasitesi ve fonksiyonel özelliklerinde, köken alınan doku tipine göre bazı değişiklikler olabildiği de gösterilmiştir. Buldukları mikroçevreye ve organizmada ihtiyaç duyulma haline bağlı olarak, MKH'lerin biyolojik özellikleri ve fonksiyonlarında önemli değişiklikler olduğu da gösterilmiştir. Bununla ilişkili olarak da spesifik bir dokunun onarımı için, o bölgeden elde edilen kök hücrelerin kullanımının avantajları olacağı gündeme gelmiştir.



Şekil 33: İnsan mezenkimal kök hücreleri

Fiziksel Özellikler ve In Vitro Çoğaltılma

Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği de dahil olmak üzere dokularda çok az sayıda bulunmaktadır. Ayrıca adeziv özelliklerine bağlı olarak buldukları dokulardan yeterli sayıda elde edilmelerinde zorluklar vardır. Gerek klinik uygulama, gerekse temel bilim araştırmalarında yeterli hücre sayılarına ulaşabilmek için in vitro ortamda çoğaltılmaları gerekmektedir. Bu hücrelerin in vitro çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücreler oldukları, kültürde proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini korudukları bilinmektedir. Kültür ortamında çoğaltılan MKH'ler ışık veya faz kontrast mikroskopi ile incelendiğinde hücrelerin iğ şeklinde olduğu ve fibroblast benzeri hücre toplulukları oluşturdukları dikkati çekmektedir. Hücreler, düşük konsantrasyonlarda kültür edildiğinde koloni formasyonuna meyil ederken, daha yüksek hücre yoğunluğunda ise koloni oluşturmak yerine yanyana dizilmiş hücre grupları halinde çoğaldıkları gözlenmektedir.¹¹²

In Vitro Kültür Şartları:

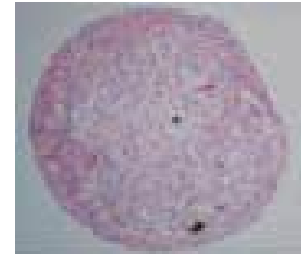
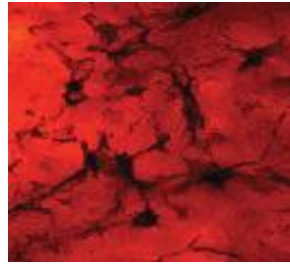
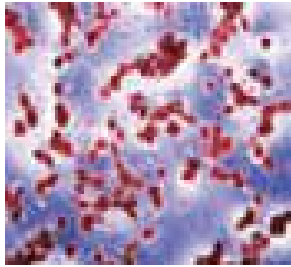
Hücrelerin in vitro kültür ortamında çoğalması için çok özel koşullar gerekmemektedir. %10 FBS içeren kültür ortamında plastik flask tabanına yapışma göstermiş olan hücreler, fenotipik ve farklılaşma özelliklerini koruyarak çoğalabilmektedirler. Pasaj sayılarının artmasıyla birlikte fazla manipüle edilmiş hücrelerde stres belirtileri ortaya çıkmakta ve bunların hücrelerin in vivo durumundan sapmalara yol açabileceği bilinmektedir. Birçok çalışmada ilerleyen pasajlarda MKH'lerde sitogenetik bozukluk, telomer kısalması geliştiği bildirilmiştir. Telomeraz aktivitesi MKH'lerde yüksek olarak bulunmaktadır. Bu da in vitro çoğalma kapasitelerini korumaları ile ilişkilidir. Hücrelerde bu istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasını önlemek amacıyla MKH'lerin ideal olarak üçüncü pasajdan sonra kullanılması tercih edilmemektedir. Bu durum özellikle klinik uygulamalarda önem taşımaktadır.

Farklılaşma Potansiyeli:

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği bu hücrelerin uygun mikroçevre koşullarında başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının

gösterilmiş olmasıdır. Çeşitli araştırmalar in vitro koşullarda uygun stimulanlarla osteojenik, adipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir. Mezenkimal kök hücreler, in vitro ortamda kolaylıkla farklılaşmaya yönlendirilebilmektedir. Adipojenik, osteojenik , kondrojenik farklılaşma özelliklerin in vitro gösterilmesinin MKH tanımlaması için şart olduğu bildirilmiştir. Çeşitli konsantrasyonlarda benzer veya farklı uyaranlara maruz bırakılarak günler içerisinde çok sayıda hücrenin farklı tipte hücreye dönüşüm gösterdiği birçok çalışmada gösterilmiştir.

Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan farklılaşma protokollerinden osteojenik farklılaşma protokolü şu şekildedir: % 50-60 oranında konfluent olana kadar geliştirilen MKH'ler üzerine, büyüme vasatı yerine, DMEM-LG içerisinde %10 FCS, 100 nM deksametazon, 10 nM betagliserofosfat ve 0.2 mM askorbik asit ile hazırlanan osteojenik farklılaşma vasatı konularak farklılaşma uyarılır, üç hafta sonra kültürdeki ekstraselüler matrikste kalsifikasyon, kalsiyum fosfat depoları belirgin olarak tespit edilir (Tablo 6).



Şekil 34: Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik farklılaşma

Medyum	Medya	Serum	Suplementasyon
Adipojenik	DMEM	FBS(%10)	0.5mM IBMX,1 mikroM deksametazon, 10 mikroM insülin, 200 mikroM indometazin, %1antibiyotik/antimikotik
Osteojenik	DMEM	FBS(%10)	0.1 mikroM deksametazon, 50 mikroM askorbat-2-fosfat, 10 mM B-gliserofosfat, %1 antibiyotik/antimikotik
Kondrojenik	DMEM	FBS(%10)	6.25 mikrog/ml insülin, 10 ng/ml TGFB1,50nM askorbat-2-fosfat, %1 antibiyotik/antimikotik
Miyojenik	DMEM	FBS (%10) HS(%5)	50 mikroM hidrokortizon, %1 antibiyotik/antimikotik
Nörojenik	DMEM	Yok	5-10 mM β -merkaptoetanol

Tablo 6: Mezenkimal kök hücrelerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri

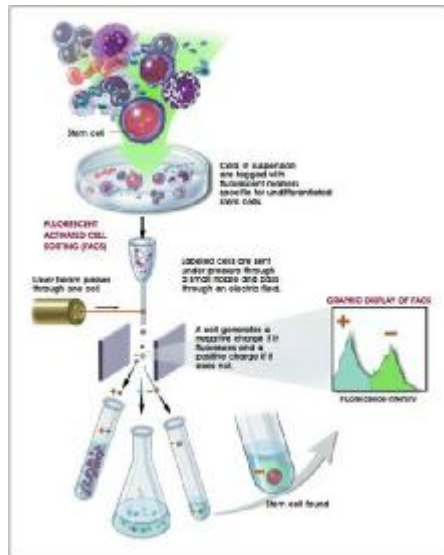
Osteojenik diferansiyasyonu göstermek amacıyla, Alizarin red boyasıyla ortam mineralizasyonunun gösterilmesi, alkalen fosfataz aktivitesi ölçümü, kalsiyum seviyesi ölçümü, spesifik gen ve protein saptaması yapılabilir.⁵¹

Farklılaşma çalışmalarında hedeflenen farklılaşmış hücrelere dönüşüm olup olmadığını göstermek için histokimyasal, immünhistokimyasal veya immünfloresan yöntemler kullanılarak özgül işaretler araştırılır. Mezenkimal kök hücrelerin, kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizilerine de farklılaşabilme niteliği, özellikle rejeneratif tıp ile ilgili dallarda çok ilgi uyandırmış, bu konuda çok sayıda çalışma yapılmış ve “kök hücre plastisitesi” adı altında toplanmıştır. Kök hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliğini tanımlamaktadır

Kök Hücrelerin Dokularda Takibi:

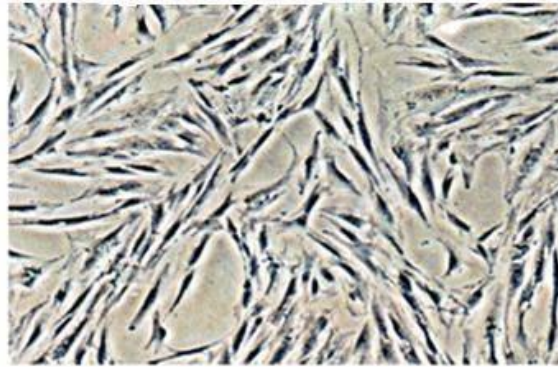
İn vivo uygulamalarda MKH infüzyonu veya dokuya implantasyonundan klinik yarar elde edilse de, bu hücrelerin verildikten sonraki durumu, hasarlı dokuya göç, yerleşim özellikleri, orada çoğalmaları, farklılaşma özellikleri, kısacası hücrelerin infüzyonu takiben kaderi detaylı incelenmemiştir. Çalışmaların çoğunda hücre infüzyonunu takiben hücrelerin, dokularda veya kanda tespitinde zorlukla karşılaşılmaktadır. Hücrelerin yeşil floresan protein ile transfekte edilmesi ve floresan hücrelerin dokularda takibi ise en çok uygulanan yöntemlerden biridir.^{94,95} Genetik işaretleme kalıcı olması yönünden tercih edilen bir yöntemdir. Kısa süreli deneysel çalışmalarda CFSE, Dil gibi geçici floresan işaretleme yöntemleri de kullanılabilir. Ancak bu tip uygulamalarda hücre bölünmesi ile floresansda azalma olacağı göz önünde bulundurulmalıdır

Birçok kök hücre tipi olduğu bilinmektedir, ancak bunların vücuttaki sayıları oldukça azdır. Ayrıca bu hücreler mikroskop altında incelendiklerinde diğer hücrelere benzemektedirler. Bu sayıca az ve diğer hücreler benzer kök hücrelerin saptanması amacıyla kök hücre belirteçleri (marker) geliştirilmiştir. Her hücrenin yüzeyinde o hücreye özgü yüzey reseptörleri vardır. Bu durum kök hücrelerde de aynı şekildedir. Bu yüzey reseptörlerinin floresan işaretleme yöntemleri ile işaretleme ve ardından sayılması (floresan yardımcı hücre sayımı (FACS)) ile mevcut kök hücre sayısı belirlenebilmektedir¹²¹ (Şekil 35).



Şekil 35: Floresan destekli hücre sayımı (FACS) mekanizması

Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre-hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu kısaca "CD" (Farklanma Kümeleri=Clusters of Differentiation) olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar. Örneğin; hematopoetik kök hücreler için en yaygın kabul gören CD belirteçleri, CD33 ve CD45'tir. Buna karşın mezenkimal kök hücreleri ayırt etmek için CD29, CD79, CD105 gibi belirteçler kullanılır^{93,121} (Şekil 36).



MKH Yüzey Belirteçleri

Pozitif	Negatif
CD13, CD29, CD44, CD49a, b, c, e, f, CD51, CD54, CD58, CD71, CD73, CD90, CD102, CD105, CD106, CDw119, CD120a, CD120b, CD123, CD124, CD126, CD127, CD140a, CD166, P75, TGFb1R, TGFbIIIR,	CD3, CD4, CD6, CD9, CD10, CD11a, CD14, CD15, CD18, CD21, CD25, CD31, CD34, CD36, CD38, CD45*, CD49d, CD50, CD62E,L,S, CD80, CD86, CD95, CD117, CD133, SSEA-1

Şekil 36: Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri

4.11.3 Klinik Uygulamalar

Mezenkimal kök hücreler ile in vitro ve in vivo deneysel araştırmalar çok sayıda olsa da, rapor edilen klinik uygulama sayısı az olup giderek artmaktadır. Ön çalışmalar, MKH infüzyonunun güvenli olduğunu düşündürmektedir.

4.11.3.1 Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Kullanım Açısından Avantajları

1-) Bağ doku kökenli olmaları nedeniyle stromal destek sağlayarak ilgili doku hücrelerinin gelişimine ve fonksiyonuna katkı sağlamaları,

2-) Farklılaşma yeteneklerinin fazla olması;

a) Kendi köken aldığı bağ doku hücreleri olan kas, yağ, kemik, kıkırdak, stromal hücreler, tendon, ligament gibi

b) Diğer doku hücrelerine farklılaşma özelliği (transdiferansiyasyon): Nöron, hepatik, pankreatik hücre gibi

3-) Hasarlı hücre ile füzyon yeteneği olması,

4-) Biyoaktif maddeler, çözünür faktörler (büyüme faktörleri, sitokin, kemokinler gibi) salgılayarak hasarlı hücre / doku tamirine katkı sağlaması,

5-) Migrasyon özellikleri sayesinde hasarlı dokuya ulaşabilmeleri,

6-) İmmüsupresif / non-immünojenik özellikte olmaları: Bu özellikleri nedeniyle MKH klinik kullanımı için HLA doku uyumunun şart olmadığı, haplo-idantik, hatta tamamen HLA uyumsuz bireylerden bile MKH tedavilerinin mümkün olduğu,

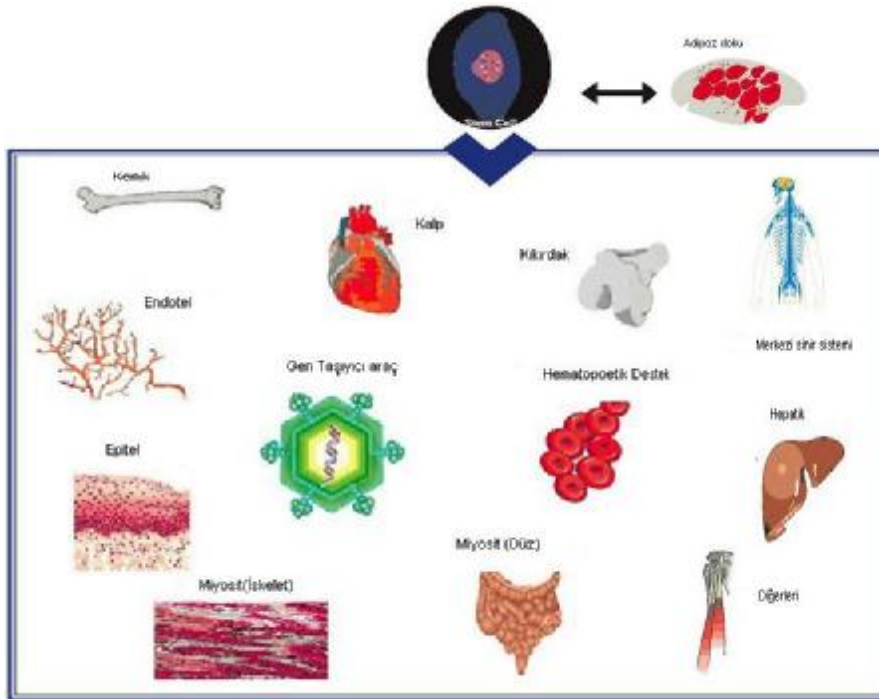
7-) Anjiyojenik, antiapoptotik, anti-inflamatuar özellikleri nedeniyle doku onarımına katkıları,

8-) Gen transferi kolaylığı ve dayanıklı olmaları nedeniyle gen tedavisi için uygun olmaları; bu nedenle kalıtsal hastalıklarda ve kanser tedavisinde kullanım potansiyeli bulunması,

9-) Enzimler salgılayarak kalıtsal hastalıklardaki enzim defektlerinin yerine konulabilme potansiyeli bulunması, hücresel tedaviler içinde MKH'lerin öne çıkmasını sağlamaktadır.

4.11.4 Adipoz Kökenli Kök Hücre:

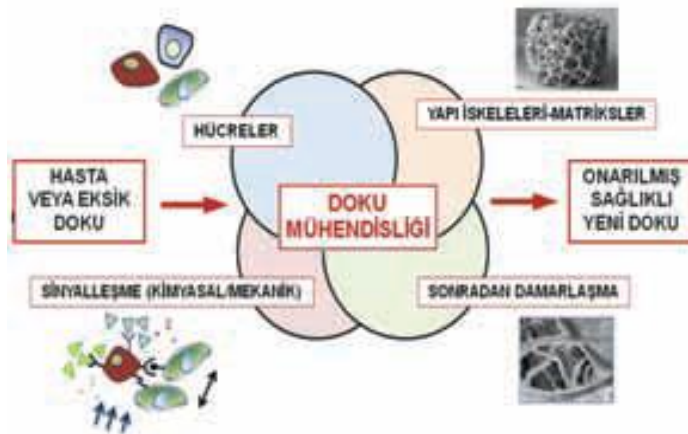
Yağ dokusu da KI gibi embriyonik mezodermden oluşur ve bir stroma içerir. Lipoaspirattan kısa süreli kollajenaz muamelesi ve santrifüj ile kolay elde edilmesi nedeniyle ilgi çekmektedir, elde edilen ürüne “*processed lipoaspirate=işlenmiş lipoaspirat*” (PLA) denilir. PLA’lar uygun stimuluslarla osteojenik, adipojenik, myojenik ve kondrojenik hücrelere diferansiye olur (Şekil 37) ve o diziye özel gen ve proteinleri içerir, bu da kök hücre fenotipini teyit eder. Bu nedenle bu doku mezodermal doku tamirinde kullanılabilir. Aspiratla elde edilen PLA fraksiyonu fibroblastik, endotelial hücreler, makrofaj ve düz kas hücreleri gibi heterojen bir gurubu içerir, seri pasajlarla MKH'lere benzeyen homojen fibroblastik bir popülasyon kalır. Bu geri kalan grubun % 80'inin vimentin ve fibroblastik marker AS02 ekspresyonu göstermesi ile bu grubun MKH olduğu anlaşılır. Uzun süreli kültürlerle PLA'ların büyüme kinetikleri ve diferansiyasyon kapasiteleri değişmez. Hücre yüzey markerleri kemik iliği kaynaklı MKH'lere benzer. Her ikisi de Stro-1, SH-3 içerirler, her ikisi de hematopoetik marker olan CD31 ve CD45 içermez.⁹³ In vitro kültürle CD34 gittikçe azalır. CD105/endoglin TGFβ reseptör tip III MKH'lerin TGFβ bağımlı kondrojenik diferansiyasyonunu gösterir. Böylece PLA ve MKH aynı hücre tipinin varyantları olarak bilinir.



Şekil 37: Adipoz kökenli kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri

4.11.5 Doku Mühendisliği

Doku Mühendisliği, kaybedilmiş veya hastalıklı doku ya da organların geri kazanılması/rejenerasyonu amacıyla yeni biyolojik eşdeğerlerinin geliştirilmesini hedefleyen disiplinlerarası bir rejeneratif tıp alanıdır. Bu hücresel tedavi ve indüklenmiş rejenerasyon yaklaşımı, izole edilmiş hücrelerin (genellikle kök hücrelerin) ex vivo şartlarda üç boyutlu hücre dışı matriks molekülleriyle benzerlik taşıyan yapı iskeleleri/matriksleri üzerinde özel düzenleyici şartlar altında yeniden farklılaştırılarak çoğaltılmaları ve organoid adı verilen yeni doku benzeri hibrit oluşumların hastaya geri nakledilmesi prensibine dayanmaktadır¹⁰⁶ (Şekil 38). Doku mühendisliğinin bir disiplin olarak doğuşu, transplant cerrahisi için gereken organ ve dokuların temininde karşılaşılan zorluklara bağlı olarak ortaya çıkmıştır. Kemik doku mühendisliği. Kemik rejenerasyonu alanındaki ilk klinik denemeler, kemik iliğinin adezyon yapabilen multipotent klonojenik alt grubu mezenkimal kök hücrelerin biyoseramik veya kompozit iskeleler üzerinde çoğaltılması yaklaşımıyla çene kemiği doku mühendisliğinde uygulanmıştır. Osteokondüktif özelliğe sahip bu iskeleler, geliştirilen yeni doku taslağı için gerekli mekanik dayanımı sağlamakta, ayrıca yapı içerisinde anjiogeneze izin vermektedir. Bu yaklaşım daha sonra, osteoblastların yeterince çoğalmalarını engelleyen, kemiklerin bükülmesi ve kolayca kırılması ile sonuçlanan genetik hastalık osteogenesis imperfecta'da denenmiş; bu amaçla ultraporöz beta-trikalsiyum fosfat yapı iskeleleri kullanılmıştır. Kemik tümör dokuları için de geçerliliği değerlendirilen bu işlemde, kazınan tümör dokusu, üzerinde mezenkimal kök hücrelerin çoğaltıldığı biyoseramik iskelelerle yer değiştirilmektedir.



Şekil 38: Temel doku mühendisliği prensibi

4.11.6 Histolojik Genel Bilgiler:

Mezenkimal Doku

Mezenkim ya da mezenkimal konnektif doku (bağ doku), embriyoda yerleşik, her üç germ yaprağından gelişebilen gevşek konnektif dokunun bir çeşididir. Mezenkim, retiküler fibril agregatları içeren “*ground substance*” (ana madde) matriksi ile karakterizedir. Bu hücrelerin konnektif doku kemik, kıkırdak, lenfatik sistem ve dolaşım sistemi hücrelerine dönüşebilme yetenekleri vardır. Mezenkimal kök hücreler; osteoblast, kondrosit, adiposit gibi birçok hücre tipine dönüşebilen multipotent kök hücrelerdir. Mezenkim mezoderm den gelişen ve hematopoetik ve bağ dokuya dönüşebilen embriyonik bağ dokusudur. Ancak mezenkimal kök hücreler hematopoetik hücrelere dönüşemezler.

Mezenkimal kök hücre ve kemik iliği kökenli kök hücre çoğunlukla birbiri yerine kullanılmaktadır. Ancak günümüzde kemik iliği dışında da multipotent mezenkimal kök hücre elde edilebildiğinden mezenkimal kök hücre yerine multipotent kök hücre denilmesi daha doğru olacaktır. MKH'ler mezodermal orijinlidir ancak endoderm ve ektoderm orijinli hücrelere transdiferansiye olabilirler.

Konnektif Doku (Bağ doku)

Konnektif doku, fibröz dokunun bir formudur. Klasik sınıflamadaki dört doku tipinden biridir. Diğerleri; epitel, kas ve sinir dokusudur. Kollajen konnektif dokunun esas proteini ve total protein içeriğinin %25 ini oluşturur.

Adipoz Doku

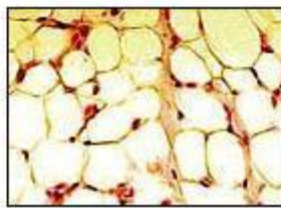
Adipoz doku ya da yağ dokusu adipositlerden oluşmuş olan gevşek bağ dokusudur. Adipoz doku lipoblastlardan oluşur ve asıl rolü yağ formunda enerji depolamaktır. Ayrıca vücudun destek ve izolasyonunu sağlar. Normal ağırlıktaki bir insanda, erkeklerde vücut ağırlığının % 15-20'sini, kadınlarda ise vücut ağırlığının % 20-25'ini yağ dokusu oluşturmaktadır. Farklı yerleşim, renk ve patoloji gösteren “uniloküler” ve “multiloküler” olarak adlandırılan iki tip yağ dokusu vardır.

Olgunlaşmış uniloküler yağ dokusu (sarı yağ dokusu) hücreleri, sitoplazmalarının ortasında bir tek sarı yağ damlacığı içerirler (Şekil 39). Multiloküler yağ dokusu (kahverengi yağ dokusu) hücrelerinin sitoplazmalarında ise çok sayıda lipid damlacığı ve kahverengi mitokondriyumlar mevcuttur.⁹² Bu da göstermektedir ki kahverengi adipositler kas hücreleri ile aynı kökenlidir. Bu köken benzerliği kahverengi hücrelerin bu farklı fonksiyonlarını anlamamıza yardımcı olur. Kahverengi rengi içerdiği çok sayıda kan damarları ve mitokondriyumlarındaki renkli sitokromlardan kaynaklanır. Multiloküler yağ dokusu vücudun her tarafına yayılmış uniloküler yağ dokusunun aksine vücudun belli yerlerinde toplanmıştır. Beyaz adipoz doku yağı depolarken kahverengi adipoz doku yağı yakar.¹⁰² 1551 de İsveçli doğa bilimci Konrad Gessner kahverengi yağ dokusunu ilk tanımlayanıdır. Gessner bu günden 450 yıl önce kahverengi yağ hücrelerini “*neither fat nor flesh but something in between*” diye tanımlamıştır.¹⁰² Adipoz doku leptin, rezistin, sitokin TNF α salgılayarak önemli bir endokrin organ olarak da işlev görür.

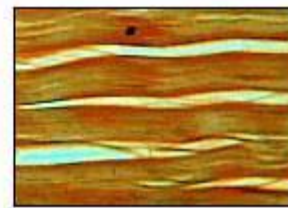
Adipoz dokunun; Enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma sağlaması, termogenezis fonksiyonlarına ek olarak, günümüzde adipositlerden ve adipoz stromal hücrelerden derive proteinlerin otokrin, parakrin ve endokrin etkiler ile hem lokal hem de sistemik etkileri olduğu gösterilmiştir. Adipositlerden sentezlenen sitokinlerin homeostaziste, immün cevapta, vazoregülasyonda ve steroid metabolizmasında rol yandığı bilinmektedir.



Areolar bağ doku



Adipoz doku



Fibröz bağ doku

Şekil 39: Bağ dokuların ve adipoz dokunun histolojik görünümü

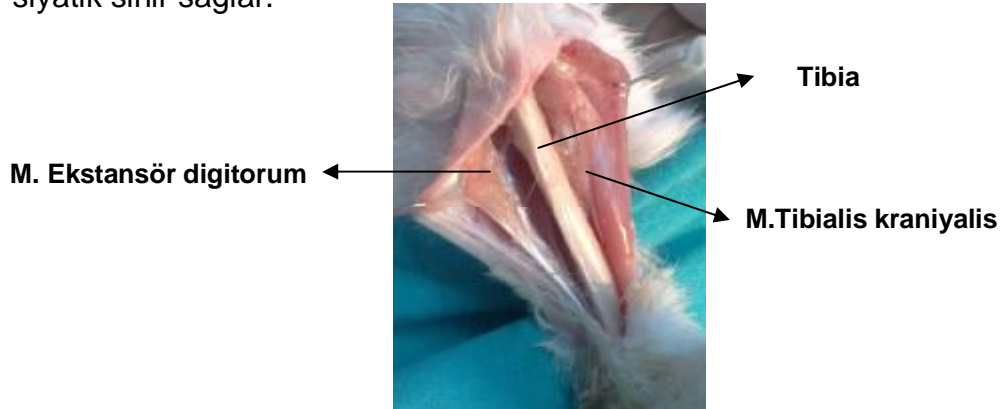
4.12. Deney Hayvanı (Tavşan) Bacak Anatomisi

Tavşan bacağı tibia, fibula ve bu kemikleri çevresel olarak sarmış birçok kastan meydana gelir. Tibia ile femur superiorda eklemleşirken inferiorda talus ile eklemleşerek tibiotalar eklemi oluşturur. Bacak kasları, anteromedial, lateral ve posterior grup olmak üzere üç kompartmanda incelenir.

Anterior grubun yüzeyel kas tabakası ilk karşılaşılan kas grubudur ve en önde tibialis kraniyalis kasını içerir (Resim 1). Bunun arkasında ekstansör digitorum longus kası bulunur. Medial bölümde ise ekstansör digiti II ve hemen üzerinde popliteus kası izlenir. Bacak lateralinde ise peroneal kaslar bulunur. En yüzeyel peroneus longusun altında peroneus brevis, peroneus tertius ve peroneus longus izlenir. En derinde ise ekstansör digitorum lateralis bulunur.

Bacak posteriorunda en yüzeyel kas olarak iki başlı gastroknemius izlenir (Şekil 41). Bu kas, tendonunun hemen altında bulunan soleus kasının tendonu ile birleşerek aşil tendonunu oluşturur. Bu iki kasın kesilmesi ile daha derinde yer alan fleksör digitorum longus izlenir.

Bacak kanlanması ise femoral arterin popliteada popliteal arter adını almasının ardından diz eklemi altında tibia ve peroneal arter olarak ayrılması ile devam eder. Tibial arter tibia gövdesinde birçok kas dalı verir. Mid-diafizel alanda ise tibiaya besleyici damar olarak bir arter girer. Ana kan desteği bu arter tarafından sağlanır. Distalde ise dorsalis pedis ve tibialis posterior dallarına ayrılarak devam eder. İnnervasyonunu anteriorda femoral sinirin devamı olan tibial sinir, posteriorda ise siyatik sinir sağlar.



Resim 1: Tavşan Tibiası ve ilişkili kaslar



- 1.M. Gluteus medius
- 2.M. Gluteus superficialis
- 3.M.Abductor cruris cranialis
- 4.M.Vastus lateralis
- 5.M.Biceps femoris
- 6.M.Semitendinosus
- 7.M.Semimembranosus
- 8.M.Adductor femoris
- 9.M.Gastrocnemius
- 10.M.Soleus
- 11.Tendo calcaneus communis
- 12.Tuber calcanei
- 13.M.Flexor digiti longus I
- 14.M.Extensor digiti IV
- 15.M.Extensor digiti V
- 16.M.Peroneus longus
- 17.M.Peroneus brevis
- 18.M.Extensor digitorum longus
- 19.M.Tibialis kranialis
20. Retinaculum extensorum proximale
- 21.Genu
- 22.Spina iliaca ventralis cranialis
- 23.Aponeurosis M. Oblique externi abdominis
- 24.M. Gluteus medius
- 25.M. Gluteus superficialis
- 26.M.Abductor cruris cranialis
- 27.M.Vastus lateralis
- 28.M.Biceps femoris
- 29.M.Semitendinosus
- 30.M.Semimembranosus
- 31.M.Adductor femoris
- 32.M.Gastrocnemius
- 33.M.Soleus
- 34.Tendo calcaneus communis
- 35.Tuber calcanei
- 36.M.Flexor digiti longus I
- 37.M.Extensor digiti IV
- 38.M.Extensor digiti V
- 39.M.Peroneus longus
- 40.M.Peroneus brevis
- 41.M.Extensor digitorum longus
- 42.M.Tibialis kranialis
43. Retinaculum extensorum proximale
- 44.Genu
- 45.Spina iliaca ventralis cranialis
- 46.Aponeurosis M. Oblique externi abdominis

Şekil: 40,41: Tavşan arka bacak kasları

5.GEREÇ VE YÖNTEMLER

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanı araştırmaları etik Kurulu'na verilen tez projesinin onayının ardından DEÜTF bilimsel araştırma projesi (BAP) Koordinasyon Müdürlüğü'ne destek amacıyla başvuruldu. Projenin BAP desteğinin alınmasının ardından çalışma Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvar'ında yürütüldü.

Deney hayvanı:

Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından önerilen laboratuvar hayvanı kullanım kılavuzunda belirtilen şartlarda bakımı yapılan ve Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Laboratuvarı'ndan temin edilen 21 adet, dört aylık (2,5-3,5 kg), dişi Yeni Zelanda tavşanı kullanıldı

Laboratuvarlar:

Moleküler Biyoloji Laboratuvarı: Kök Hücre eldesi, işaretlenmesi, saklanması, diferansiyasyonu ve görüntülenmesi işlemleri İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji laboratuvarlarında gerçekeştirilmiştir

Deney Hayvanları Laboratuvarı: Deney hayvanlarının eldesi, bakımı, anestezisi ve cerrahi işlemleri Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Laboratuvarlar'ında yapılmıştır.

Deneyde Kullanılan Malzemeler:

Distraktörler ve Ekipmanları: Deney Hayvanının tibiasına uygun olarak tasarlanan distraktörler Ilizarov tipi iki halkalı ve üç barlıdır (Elektron Medikal–Ankara). Halkaların dişi çapı 7,5 cm iç çapı 5,5 cm, kalınlığı 0,5 cm ve distraktörün toplam ağırlığı 100 g dır. Halkaların üzerinde 5 mm çaplı 24 adet birbirlerine eşit mesafede delik bulunmaktadır. Üç adet barın kalınlıkları 4 mm olup yüzeyleri yivlidir (Resim 2). Deneyde kullanılan vidalar 4 mm çapında ve 13 mm uzunluğunda olup baş kısmı ile birleşme yerinde 1,2 mm çaplı K telinin geçeceğı delik bulunmaktadır.

Kullanılan pulların iç çapı 5 mm dış çapı 9 mm'dir. Somunların iç çapı 4 mm, dış çapı 7 mm'dir (Resim 3). Deneylede kullanılan K teli 1 mm çapında ve 30 cm uzunluğundadır.

Şarjlı Motor: K telinin tibiya ya perkutan geçirilmesini sağlayan Dremel Multipro marka hızı ayarlanabilir motor (model no: 780 devir hızı=5000-25000 rpm) (Resim 4).

Elektrikli motor: Osteotomi işlemlerinin yapıldığı sirküler uçlu hızı ayarlanabilir Performance Power marka elektrikli motor (model no: NLH200RTA devir hızı=8000-30000 rpm) (Resim 4).



Resim 2: Deneylede kullanılan 24 delikli 2 halkalı 3 barlı distraktör



Resim 3: Distraktörlerde kullanılan delikli vida, somun ve pul

5.1 Deney hayvanlarının bakımı:

Çalışmada kullanılan deney hayvanlarının bakımı Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanı Araştırmaları Laboratuvarı'nda yapıldı. Denekler standart tavşan yemi ve suyun yanında haftanın iki günü taze marul ve havuç ile beslendi. Tüm denekler kafeslerde tek başlarına tutuldu (Resim 5). Distraktör takılmasının ardından deneklerin yeme ve suya ulaşmalarında bir sıkıntı olmadığı görüldü. Cerrahi sonrası ilk bir hafta insizyon hattında hiperemi, ödem, enfeksiyon takibi açısından günlük pansumanlar ile izlenen deneklerin, pansumanlarının daha rahat yapılabilmesi ve distraktörlerin barlarının kafeslerdeki deliklere takılmaması amacıyla tavşan alt ekstremitesine özel çuvallar dikilerek pansumanın üzerinden geçirilerek ağzı bağlandı (Resim 6).



Resim 5: Deney hayvanlarının laboratuvar ortamı



Resim 6: Çalışma sırasında geliştirilen çuval pansuman

İzlem süresi:

Tüm denekler 10 mm'lik distraksiyonun tamamlanmasının ardından sekiz hafta süre ile izlendi. İzlem süresi içinde inguinal bölgede separasyon gelişen iki deneğe debridman uygulandı ve yeniden sütüre edildi. Bu deneklerin genel durumlarının iyi olması sebebiyle çalışma gruplarından çıkarılmasına gerek olmadığına karar verildi. Yağ alınma işlemi sonrası alt ekstremitte paralizisi gelişen bir denek çalışmadan çıkarıldı.

Deney Grupları ve Yapılanlar:

Çalışmada ikisi deney, biri kontrol grubu olmak üzere üç farklı grupta, her bir grupta yedişer tavşan olacak şekilde toplam 21 adet tavşan kullanıldı

Grup I (Kontrol):

Kontrol grubunda tüm deneklerin sağ tibialarına Ilizarov distraktör takıldı ve osteotomi uygulandı. Yedi günlük latent periyodun ardından 15 gün (0,7 mm/gün) distrakte edilerek 10 mm distraksiyon sağlandı.

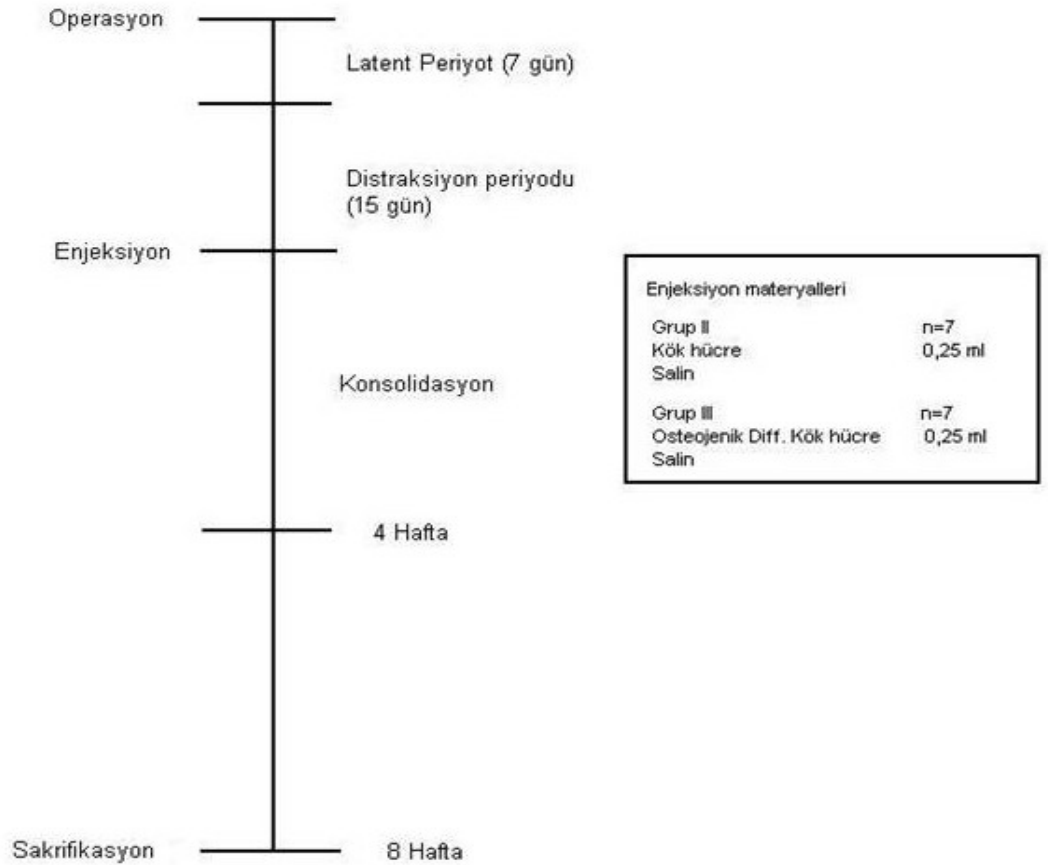
Grup II (Kök Hücre):

Grup II'de deneklerin her iki inguinal bölgesinden toplam 30'ar cc yağ dokusu alındı, moleküler biyoloji laboratuvarında bu yağ dokusundan erişkin pluripotent kök hücreler elde edildi. Bu hücrelerin yüzeyleri belirteçler (marker) ile işaretlendi ve bu işaretli hücreler akım sitometre (FACS) ile sayılarak elde edilen hücrelerin kök hücre oldukları doğrulandı. Ardından bu kök hücreler histolojik açıdan distraksiyon ortamında takiplerinin yapılabilmesi amacıyla yeşil floresan protein (GFP) ile işaretlendi. Deneklerin sağ tibialarına sirküler distraktör takıldı, distraksiyon periyodunun 15 gün içinde tamamlanmasının ardından konsolidasyon evresinin başlangıcında, yumuşak kallus alanına radyolojik görüntüleme altında beş milyon adet adipoz kökenli erişkin kök hücre enjekte edildi.

Grup III (Diferansiye (farklılaşmış) Kök Hücre):

Grup III'te de Grup II ile aynı olacak şekilde kök hücreler elde edildi ve GFP ile işaretlendi. Ardından bu hücreler moleküler biyoloji laboratuvarında osteojenik diferansiyasyon yolağına sokuldu. Alizarin red boyası ile oluşan kalsiyum depozitleri boyanarak osteojenik diferansiyasyonunu gerçekleştirdiği gösterilen hücreler yine beş milyon adet olacak şekilde osteotomi hattındaki yumuşak kallus alanına enjekte edildi.

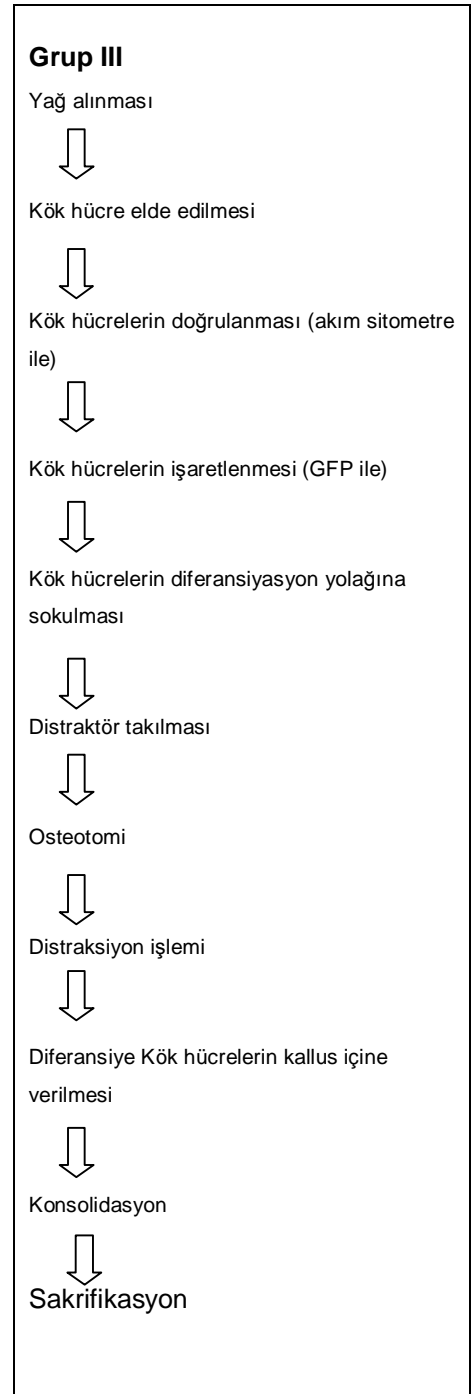
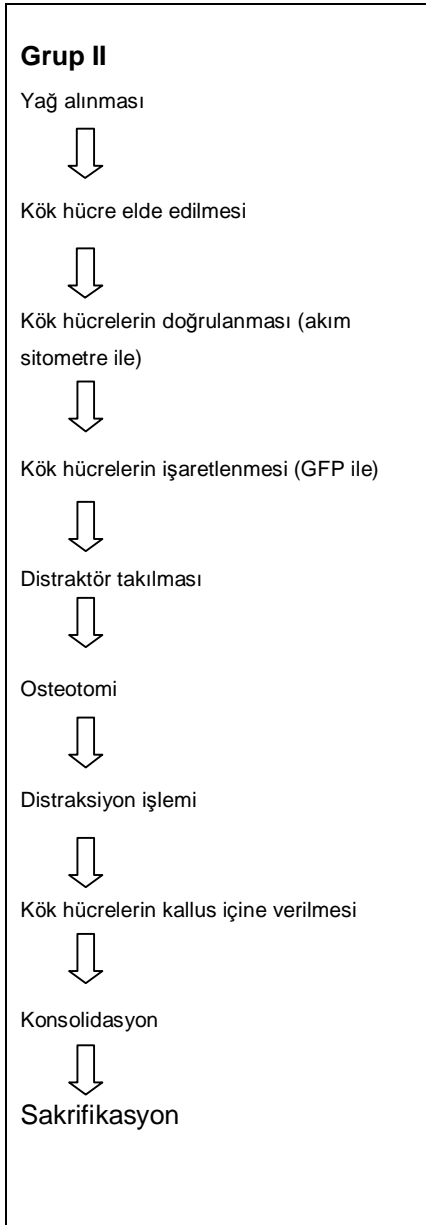
Kontrol grubuna distraktör takılmasının ardından osteotomi uygulanırken deney gruplarından kök hücre grubunda yağ alma işleminin ardından bir hafta sonra ve diferansiye kök hücre grubunda yağ alma işleminden iki hafta sonra osteotomi uygulandı ve distraktör takıldı. Her üç grupta da osteotomi işlemi distraktörlerin, deneklerin sağ tibialarına yerleştirilip fiksasyonunun sağlanmasının ardından uygulandı. Yedi günlük latent periyodun ardından 0,7 mm/gün olacak şekilde 15 gün distraksiyon uygulandı. (Tablo 8)



Tablo 8: Distraksiyon sürecinin şematik görünümü

Deneklerin tüm cerrahi girişimleri DEÜTF Deneş hayvanları Araştırma Laboratuvarları'nda yapıldı. Denekler cerrahi sonrası yedi gün süreyle olası enfeksiyon riskine karşı günlük pansumanlarla izlendi . Deneklerin sağ tibialarına uygun özel olarak hazırlanan bez torbalarla pansuman takibi kolaylaştırıldı, ayrıca bu yöntem ile distraktörün ve deneşin tibiasının zarar görmesi engellendi.

Deneklere distraksiyonun tamamlanmasının ardından haftalık X-Ray çekilerek kemiklerdeki uzama ve kemikleşme durumu gösterildi. Belirlenen konsolidasyon süresi olan sekiz haftanın ardından pentobarbütal sodyum (40 mg/kg) ile sakrifiye edilen denekler histopatolojik, biyomekanik, radyolojik incelemelerle değerlendirildi.



Tablo 9: Grup II ve Grup III için deneyin algoritmi

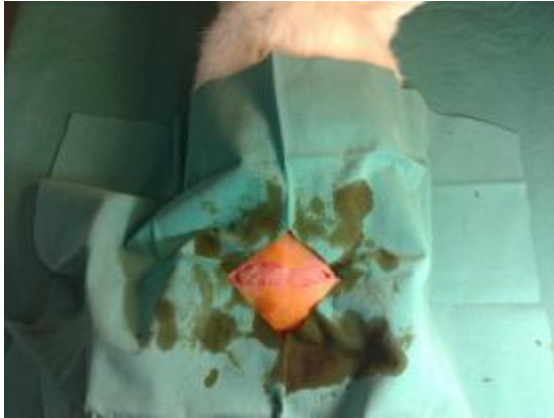
5.2 Cerrahi Yöntem:

5.2.1 Adipoz doku elde edilmesi:

Ketamin (Alfamine) 35 mg/kg im. ve Ksilazin klorür (Alfazyne) 5 mg/kg im. verilerek genel anestezi sağlandı. Her iki inguinal bölge klorheksidinli solüsyon ile temizlendi ve tıraş edildi ardından % 1'lik povidon iyodür (Batikon) ile yıkandı (Resim 7). Denek supin pozisyonda operasyon masasına yerleştirildi, steril operasyon örtüsü örtüldü, Cefazolin Na (Cefozin) ile profilaksi sağlandı. İnsizyon hattına 1mg/kg Citanest infüzyonu ile analjezi sağlanmasının ardından 15 numaralı bistüri ile horizontal 10 cm insizyon yapıldı (Resim 8). Cilt fleplerinin eleve edilmesinin ardından inguinal yağ yastıkları eksize edildi. Eksize edilen 30 cc yağ dokusu (Resim 9) steril serum fizyolojik ile yıkanmasının ardından steril kaba alındı, kanama kontrolü sağlandı. Cilt ciltaltı dokuların sutureasyonunun ardından insizyon alanına kelebek pansuman yapıldı (Resim 10).



Resim 7: Yağ alınma işlemi öncesi deneğin hazırlanması



Resim 8: Steril operasyon alanının hazırlanması ve insizyon



Resim 9: Elde edilen yağ dokularının serum ile yıkandıktan sonra steril kaba alınması



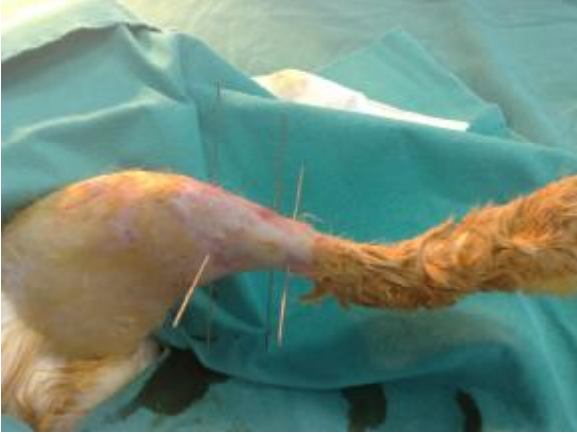
Resim 10: Kanama kontrolünün ardından insizyonun kapatılması.

5.2.2 Distraktör Takılması:

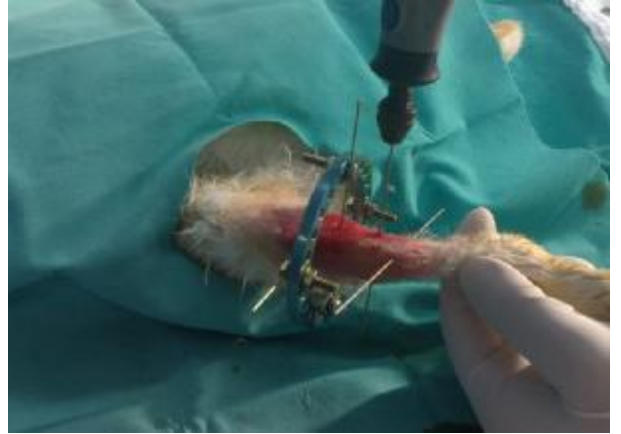
Ketamin (Alfamine) 35 mg/kg im. ve Ksilazin klorür (Alfazyne) 5 mg/kg im. verilerek genel anestezi sağlandı. Operasyon alanı klorheksidin solüsyon ile temizliğin ardından tıraş edildi. %1'lik povidon iyodür ile operasyon alanı yıkandı, denek supin pozisyona alındı ve sağ alt ekstremitisini açık bırakacak şekilde steril operasyon örtüsü örtüldü. 2 cc Citanest infüzyonu ile analjezi sağlandı. Cefazolin Na ile profilaksi sağlandı. Sağ tibiofemoral eklem bölgesinin 3,5 cm distalinden (Resim 11) 1 mm çapında 15 cm' ye kısaltılmış olan ilk K teli, tibiyanın anteriorundan hızı ayarlanabilir Dremel şarjlı motor ile perkutan olarak tibiaya 90 derece dik olacak şekilde yerleştirildi (Resim 12). İkinci K teli ilk tele dik olacak şekilde ilk telin 0,5 cm distalinden (distraktör halkası kalınlığı kadar) yine perkutan olarak yerleştirildi. İkinci telin 1,5 cm distalinden üçüncü K teli ve üçüncü telin 0,5 cm distalinden dördüncü K teli perkutan olarak Dremel şarjlı motor ile yerleştirildi. K tellerinin yerleştirilmesinin ardından ilk Ilizarov halkası üst iki K teli arasına yerleştirildi (Resim 13). Halkalar K tellerine, 0,5 cm çapında ve boyun kısımlarında K telinin geçebilmesi için 1,5 mm çaplı delik bulunan vidalar, pul ve somun yardımıyla gergin olarak yerleştirildi. Ilizarov halkalarının yerleştirilmesinin ardından her iki halkayı birbirine sabitleyecek 0,5 cm çaplı 6 cm uzunluğunda yivli üç adet bar eşit aralıklarla yerleştirildi (Resim 14).



Resim 11: K tellerinin geçirileceği alanların saptanması için yapılan ön çalışma



Resim 12: Tibiaya "K" tellerinin perkutan takılması



Resim 13: İlk halkanın üst iki "K" teli arasına yerleştirilmesi



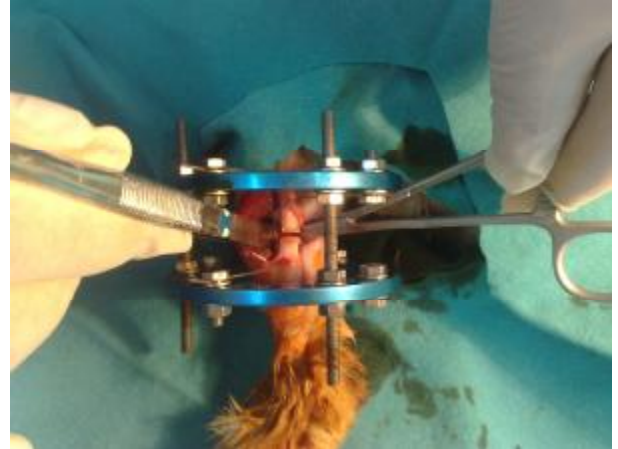
Resim 14: Distraktörün tibiaya yerleştirilmiş hali

Distraktör yerleştirilmesinin ardından osteotomi safhasına geçildi. İki halkanın ortasında tibia'nın anteromedialinden 15 numaralı bistüri ile 2 cm cilt insizyonu yapıldı

(Resim 15). Tibialis kranyialis ve ekstansör digitorum kasları arasından diseksiyon uygulanarak medial yüzden periosta ulaşıldı. Periost çizildi ve korunarak eleve edildi, osteotomi uygulanacak alan ortaya konuldu. Sonrasında dönüş hızı ayarlanabilir, dakikada 8000-30000 devir arasında çalışabilen elektrikli tur cihazına, dış çapı 2,5 cm. olan dairesel testere takılarak 2. ve 3. "K" tellerinin tam ortasından tibiofibular bileşkenin distalinden osteotomi uygulandı (Resim 16). Osteotomi yapılırken kemiğin yüksek ısıdan korunması için steril serum fizyolojik ile sürekli yıkama yapıldı. Osteotominin tamamlanmasının ardından periost ve yumuşak dokular 4-0 poliglaktin 910 cilt 4-0 polipropilen ile suture edildi. Povidon iyot ve mupirocin pomad uygulanarak kapalı pansuman yapıldı (Resim 17).



Resim 15: Distraktörün takılmasının ardından osteotomi bölgesinin saptanması



Resim 16: Deneğin osteotomi uygulanmış tibiası



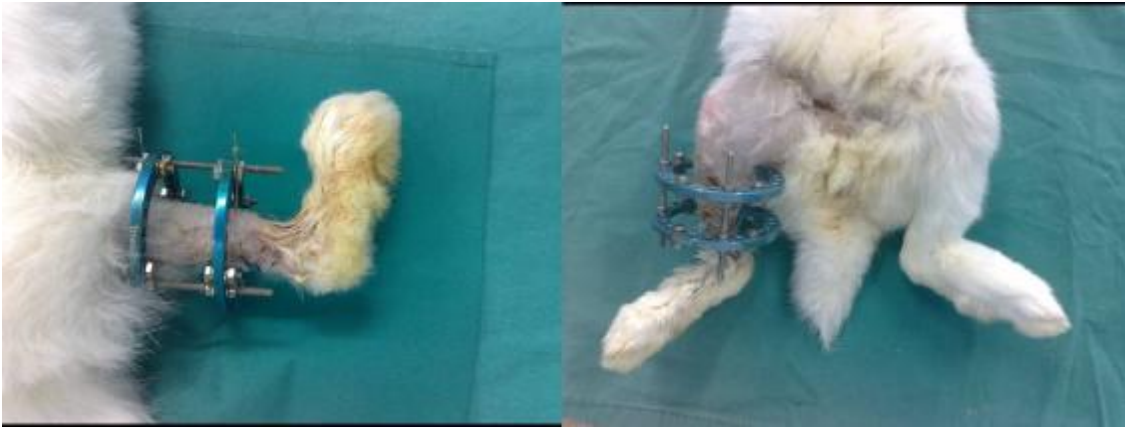
Resim 17: Distraktörün takılmasının ardından kapalı pansuman yapıldı.

5.2.3 Distraksiyon İşlemi:

Distraktörlerin takılmasının ardından yedi günlük latent periyot süresince her gün pansumanlarla takip edilen denekler latent periyodun tamamlanmasının ardından yedi numaralı anahtar ile günlük 0,7 mm distraksiyon uygulandı (0,7 mm'lik ilerleme, somunun bir tam turu ile elde edildi)(Resim 18-19).



Resim 18: 0,7 mm/gün olacak şekilde 15 gün distraksiyon uygulandı



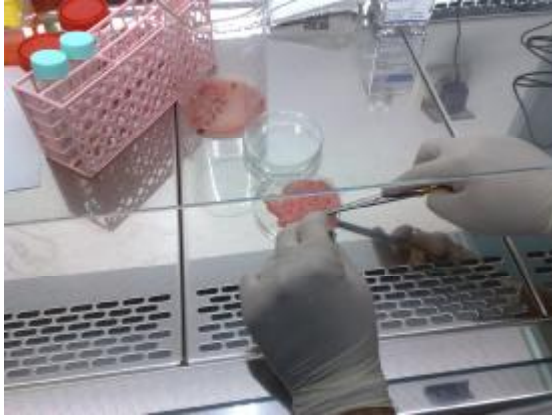
Resim 19: Distraksiyon sürecinde denekler

5.3 Kök Hücre Elde Edilmesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda deneğin inguinal bölgesinden alınan ve ağzı kapaklı steril kap içerisine yerleştirilen steril serum fizyolojik ile yıkanmış 30 cc adipoz doku 1 saat içerisinde İYTE moleküler biyoloji laboratuvarına ulaştırıldı. Mezenkimal kök hücre eldesi ile ilgili prosedür izlendi.

5.3.1 Tavşan Adipoz Dokusundan Mezenkimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Tavşanın inguinal bölgesinden elde edilen yağ dokusu ilk önce bir petri kap içerisine alındı. 5 ml PBS (%2 Penisilin-Streptomisin içeren) ile yıkandı. Dokular yıkandıktan sonra diğer petri kabına alınarak burada da 5 ml PBS (%2 Penisilin-Streptomisin içeren) ile iyice yıkandı. Bu arada %0,075'lik kollajenaz tip I 50ml PBS içerisine çözülerek 10 dakika boyunca 37°C çalkalamalı su banyosunda bekletilerek aktive edildi. Yağ dokularının yıkanmasından ardından dokudaki kanlı bölgeler küçük parçalar halinde kesilip atıldı (Resim 20). Ardından doku makasla mins edilerek küçük parçalar elde edildi ve bunların üzerine 10 ml kollajenaz tip I ilave edilerek mins işlemine devam edildi (Resim 21). Küçük parçalar haline getirilmiş olan yağ dokusu 50ml'lik tüp içerisine alındı üzerine 15ml daha kollajenaz ilave edildi ve 1 dakika boyunca vortekslendi (Resim 22). Ardından 37°C'de çalkalamalı su banyosunda 90-120 dk boyunca bekletildi (Resim 23). Bekleme süresi içerisinde her 15 dakikada bir örnekler vortekslendi. Bekleme süresinin sonunda homojenize olan örneklerin üzerine 15 ml PBS (%1 Penisilin-Streptomisin içeren) eklenerek 600 G'de 10 dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmında biriken yağ tabakası atıldı ve tekrar üzerine 15 ml PBS (%1 Penisilin-Streptomisin içeren) eklendi ve 600 G'de 10 dk tekrar santrifüjlendi. Santrifüj sonunda supernatan çok dikkatli bir biçimde çekilerek atılır ve üzerine tekrar 15 ml PBS (%1 Penisilin-Streptomisin içeren) eklenerek 600 G'de 10 dk santrifüjlendi. Supernatan tekrar dikkatli bir biçimde çekilerek atılır ve kök hücrelerin bulunduğu pellet (Resim 24) 15ml %15 FBS+%1 Penisilin-Streptomisin+0,02mM L-Glutamin içeren DMEM besiyeri içerisine çözüldü ve flasklara ekim yapıldı (Resim 25). Ekimden 24 saat sonra flaskın besiyeri çok dikkatli bir şekilde pipetle çekildi ve yerine taze besiyeri koyuldu böylece dokudan gelen istenmeyen maddeler arındırıldı. Kök hücrelerin konfluens olma durumlarına göre 4 günde bir pasaj yapıldı (Şekil 42).



Resim 20: Yağ dokusunun mins edilme işlemi



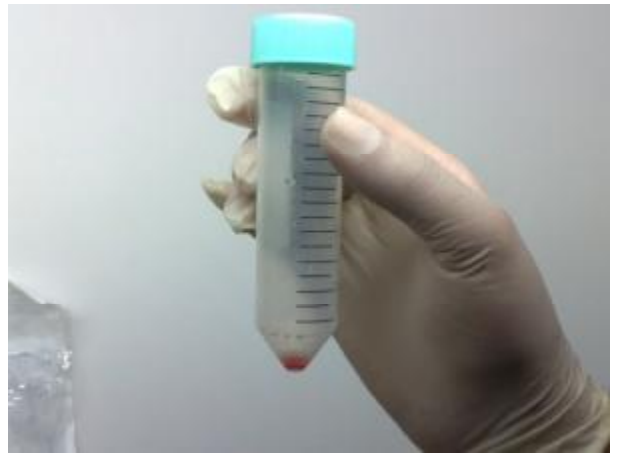
Resim 21: Yağ dokusunun petri kabı içerisinde küçük parçalar haline getirilmesi



Resim 22: Kollajenaz eklenmesinin ardından yağ dokunun vortekslenmesi



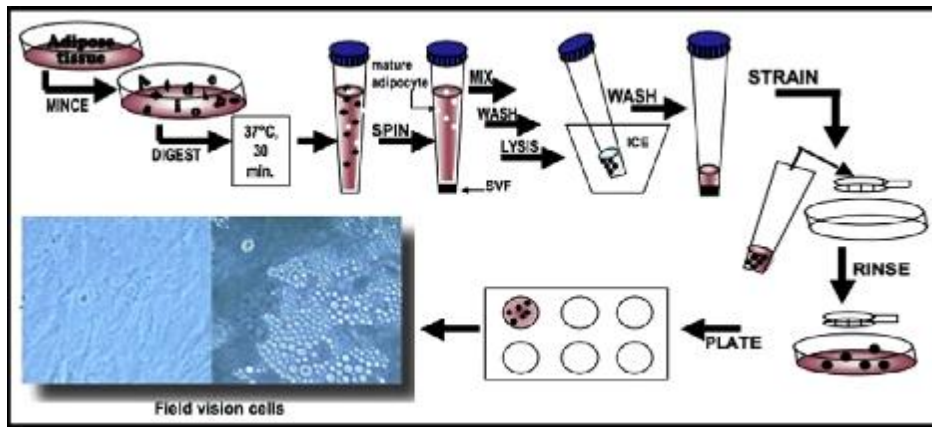
Resim 23: Çalkalamalı su banyosu



Resim 24: İşlemlerin sonucunda elde edilen pellet (flaska ekim öncesi)



Resim 25: Hücrelerin ekildiği flaskların inkübatörün içindeki görünümü

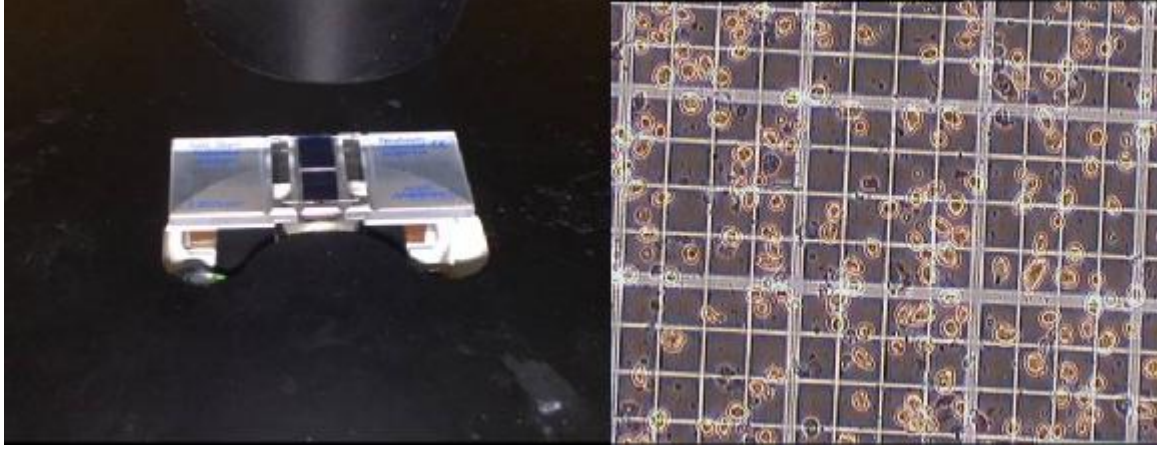


Şekil 42: Kök hücre elde edilmesi (Şematik görünüm)

5.3.2 Kök Hücrelerin Pasajlanması ve Sayılması

Kök hücreler flaskın yüzeyini tamamen kapladıktan sonra ya hücreler ölüme gider ya da üst tabakaya geçerek diferansiye olma eğilimine girerler. Bu nedenle hücreler konfluense ulaştıkları zaman pasajlama işlemi yapılır. İlk önce hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edilir. Hücreler 5ml PBS ile iyice yıkandıktan sonra flaskın yüzeyinde adhere olan hücrelere 5ml tripsin-EDTA eklenir ve 5 dakika 37°C %5 CO₂ inkübatöründe bekletilir. 5 dakika sonunda yüzeyden kalkan hücrelerin üzerine 5ml %15 FBS+%1 Penisilin-Streptomisin+0,02mM L-Glutamin içeren DMEM besiyeri eklenerek tripsin+EDTA inaktive edilir. Ardından hücreler 15ml tüp (flakon) içerisine alınarak 1000 rpm'de 10 dk santrifüjlenir. Santrifüj sonrasında supernatant atılır pellet 5ml içerisinde çözülür ve iyice homojen hale getirildikten sonra 1:1 oranında hücre ve *tripan blue* bir ependorf kabı içerisinde karıştırılarak hemositometreye 20µl eklenir ardından hücreler mikroskopta sayılarak mililitredeki sayıları hesaplanır

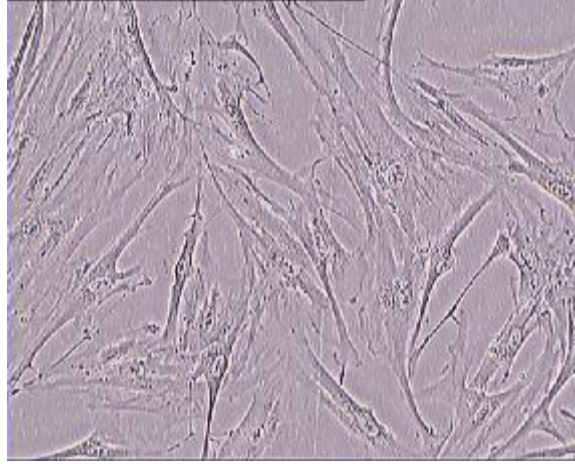
(Resim 26). Buna göre 1 milyon hücre flask içerisine alınarak 15ml'ye tamamlanır. Ardından 37°C CO₂ inkübatörüne alınarak konfluense ulaşıttan sonra 3-4 günde bir pasajlanır ya da besiyeri değiştirilir.



Resim 26: Hücrelerin hemositometre ile sayılması

5.3.3 Elde Edilen Kök Hücrelerin Görüntülenmesi

Tipik olarak yıldızlı uzantıları olan ve flaska yapışan kök hücreler ışık mikroskobu ile tanındı ve görüntülendi.

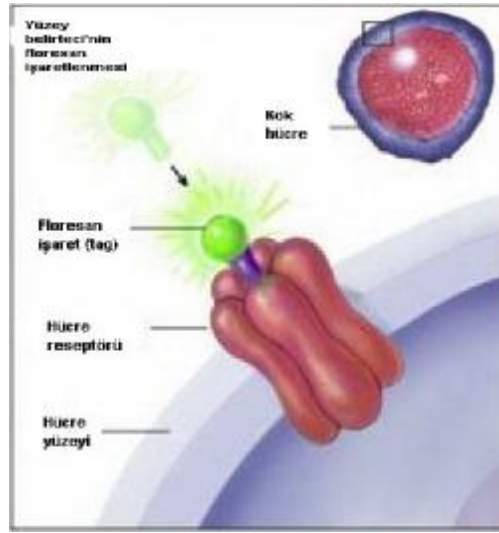


Resim 27: Işık mikroskobunda yıldızlı uzantıları olan kök hücrelerin görüntülenmesi

5.3.4 Kök Hücrelerin Akım sitometre (FACS) ile Sayılması:

Hücreler tripsinizasyon ile yüzeyden ayrıldıktan sonra CD45 APC H7 (Becton-Dickinson, Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD34 PE Cy7 (Becton-

Dickinson), NG2 PE (Beckman Coulter, Marsilya, Fransa), CD73 PE (Becton-Dickinson) ve CD105 FITC (Serotec, Oxford, UK)'ye karşı antikörler ile inkübasyon öncesi fosfat tamponlu salin ile yıkandı. Akım sitometrik analizler için iki tüp kullanıldı. İlk tüpte CD105/CD73/CD34/CD45 ikinci tüpte ise CD105/NG2/CD34/CD45 bulunmaktaydı. Her tüpe 5×10^5 mezenkimal kök hücre eklendi 50000 hücre/örnek ve 400 hücre/saniye akım hızında floresan histogramlar elde edildi. Deneyler FACS Canto II (BD Bioscience Pharmingen, San Diego, CA, USA) ile yürütüldü. Akım sitometrik veriler FACS DIVA yazılımı (Becton-Dickinson) ile analiz edildi.

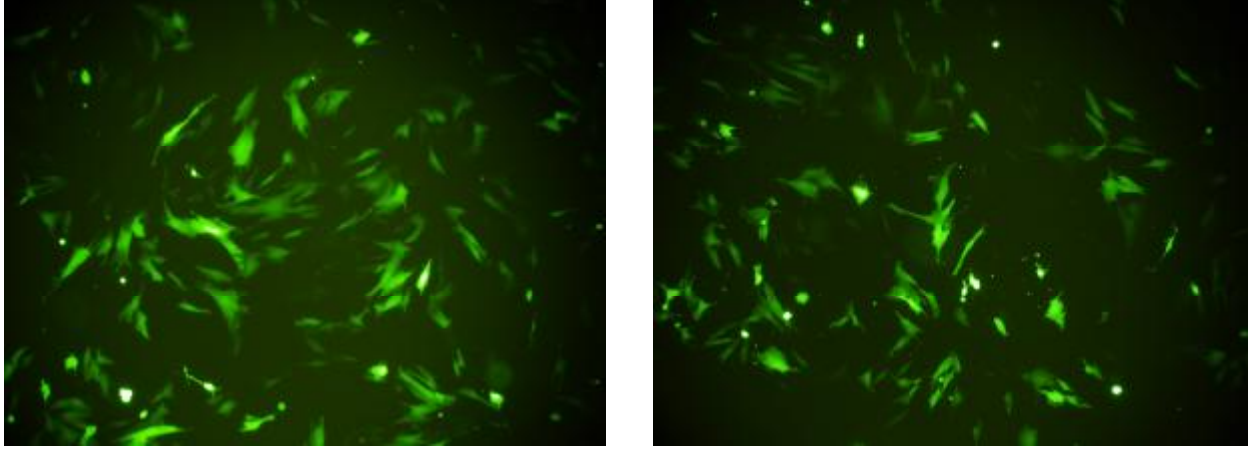


Şekil 43: Kök hücrelerin yüzey belirteçlerinin (*marker*) işaretlenip (*tagging*) sayılması

5.3.5 Kök Hücrelerin Yeşil Floresan Proteini (GFP) ile İşaretlenmesi

Mezenkimal kök hücreler yeterince kofluense ulaştıktan sonra hücreler *in vivo* takiplerinin yapılabilmesi için yeşil floresan protein içeren plazmid ile transfekte edilerek işaretlendi. Mezenkimal kök hücrelere (MKH) üçüncü pasajdan sonra “*Green Fluorescent Protein pMGFP*” vektör sistemi ve “Polyfect Transfeksiyon kiti” kullanılarak GFP içeren plazmid transfekte edildi Transfeksiyon işlemi, bir gün öncesinde 75cm^2 ’lik flasklara 5×10^5 MKH’lerin ekimi ile başlamıştır. Ertesi gün flask 4ml PBS ile yıkanır ve yapışmayan hücreler atılarak üzerine 7ml %15 FBS+2mM L-Glutamin+%1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM besiyeri eklenmiştir. Bu arada 4µg plazmid DNA’sı ile 25µl polyfect “*reagent*” karıştırılıp “*spin down*” yapılarak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında inkübe edilerek kompleks oluşumu sağlandı.

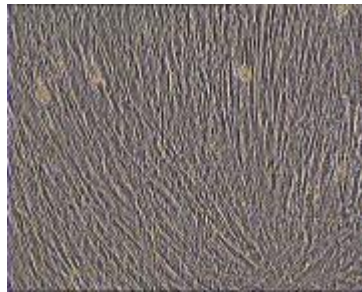
İnkübasyon sonunda 1ml %15 FBS+2mM L-Glutamin+%1 Penisilin-Streptomisin içeren DMEM besiyeri kompleks üzerine eklenerek 10 saniye vortekslenerek flaska yavaşça eklendi ve 72 saat bekletilerek GFP proteinin yazılması sonucu oluşan ışımaya immunofloresan mikroskobu altında incelendi (Resim 28). İmmünfloresan mikroskop ile inceleme ile hücrelerin %80-90 oranında GFP ile işaretlendiği görüldü



Resim 28: Transfeksiyon sonrası işaretli kök hücrelerin immunofloresan mikroskop ile ışımalarının gösterilmesi

5.3.6 Kök Hücrelerin Diferansiyasyonu (Farklılaşması):

Kök hücreler, 3. pasajdan sonra besiyeri içerisine birtakım supplementler eklenerek diferansiyasyon işlemine başlanır. Mesencult Basal Medium (Stem Cell) içerisine %15 osteojenik stimüle edici supplement, 3,5 mM β -gliserofosfat, 0,01 μ M deksametazon ve 50 μ g/ml askorbik asit eklenerek farklılaşma besiyeri hazırlandı. Her üç günde bir farklılaşma besiyeri değiştirilerek MKH'lerin osteojenik farklılaşması sağlandı. Bu farklılaşan hücrelerin fotoğrafları 9, 15 ve 21 gün sonunda çekilerek kaydedildi (Resim 29).



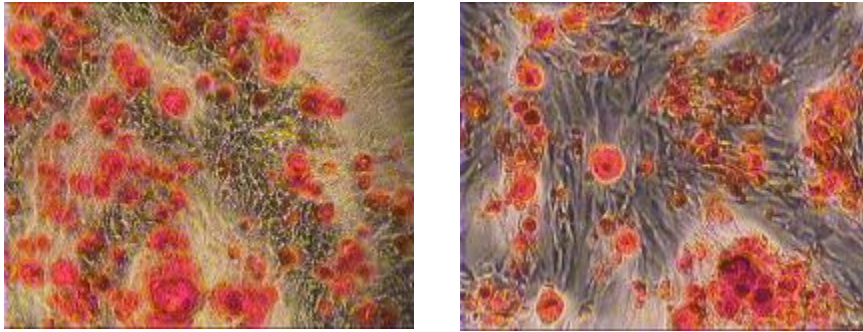
Resim 29: Diferansiye kök hücrelerin görünümü

Diferansiye Kök Hücrelerin Alizarin Red ile Boyanması:

Diferansiye olan hücrelerin kalsiyum hidroksiapatit depolanmasını göstermek ve diferansiyasyonu doğrulamak için hücelere alizarin red boyası uygulandı. Alizarin Red, konsantrasyonu 40 mM olacak Şekilde formaldehit içerisinde üzülerek amonyum hidroksit ile pH 4,4'e ayarlandı. Onikilik plate'lere 20x103 mezenkimal kök hücreler ekildi ve ertesı gün hücreler y zeyeye yapıŐtıktan sonra %70'lik soğuk alkol ile fikse edildi (Resim 30). Hücreler fikse olduktan sonra üzerindeki alkol atıldı ve distile su ile yıkandı. Ardından alizarin red boyama solüsyonu eklendi 20 dakika boyunca yavaş yavaş karıŐtırıcıda karıştırıldı bu süre sonunda üzerindeki alizarin red boyası atılarak mikroskop altında kalsiyum depozitleri incelendi (Resim 31). Bu işlem 9, 15 ve 21 gün sonlarında yapılarak mikroskop altında fotoğrafları çekilerek değişiklikler kaydedildi.



Resim 30: Alizarin red boyası uygulanmış MKH'ler



Resim 31: Alizarin red boyası ile kırmızıya boyanmış kalsiyum depozitleri

Alkalen Fosfataz (AP) Boyaması:

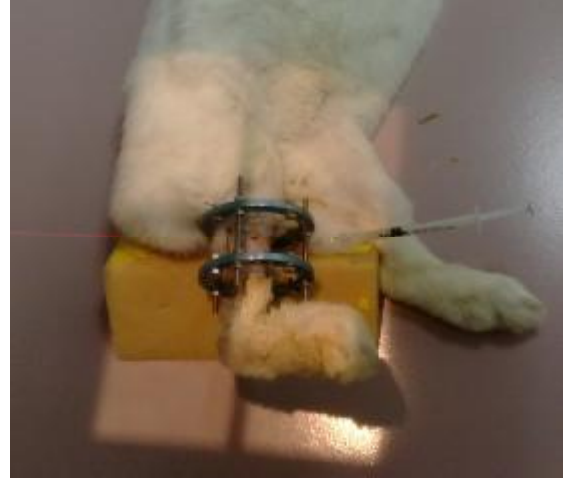
Tween 20 1XPBS içerisinde son konsantrasyonu %0,05 olacak şekilde ayarlandı ve iyice karıştırılarak "*Phosphate Buffered Saline Tween 20 (PBST)*" hazırlandı ve oda sıcaklığında saklandı. Boyama solüsyonu "*Alkaline Phosphatase Staining (Stemgent, Cat. No. 00-0009) kiti*" ile yapıldı. Kitte bulunan solüsyon A ve B 1:1 oranında karıştırıldı ardından AP boyama solüsyonu her bir deneme için ayrı ayrı hazırlandı. 24'lü kuyucuklara 50x103 mezenkimal kök hücrelerin üzerindeki besiyeri aspire edildi ve hücreler 2 kez 1XPBST ile yıkanır. Oda sıcaklığında, kit içerisinde bulunan *fix solüsyonu*'ndan 0,5ml 24'lü kuyucuklara eklenerek 1-2 dakika boyunca beklenerek mezenkimal kök hücreler fikse edildi. Bekleme süresi sonunda hemen *fix solüsyonu* aspire edilir ve 1XPBST ile fikse edilmiş mezenkimal kök hücreler yıkanır ve üzerine, 0,4 ml boyama solüsyonu eklenir. Hücreler 5-15 dakika arasında karanlık ortamda bekletilir. Renk değişimi incelenerek, açık renge dönüştüğü zaman spesifik olmayan boyamaların önlenmesi için reaksiyon durdurulur. Reaksiyon durdurma işlemi boyama solüsyonunun uzaklaştırılması ile gerçekleştirilir. 1x PBS ile kuyucuklar iyice yıkanır ve üzerine 500 µl 1XPBS eklenir ve AP ekspresyonu kırmızı ya da mor renk ile mikroskop altında belirlenir. Eğer ki AP ekspresyonu yok ise boyanma gerçekleşmez ve mikroskop altında renk değişimi gözlenmez.

Enjeksiyon Protokolü:

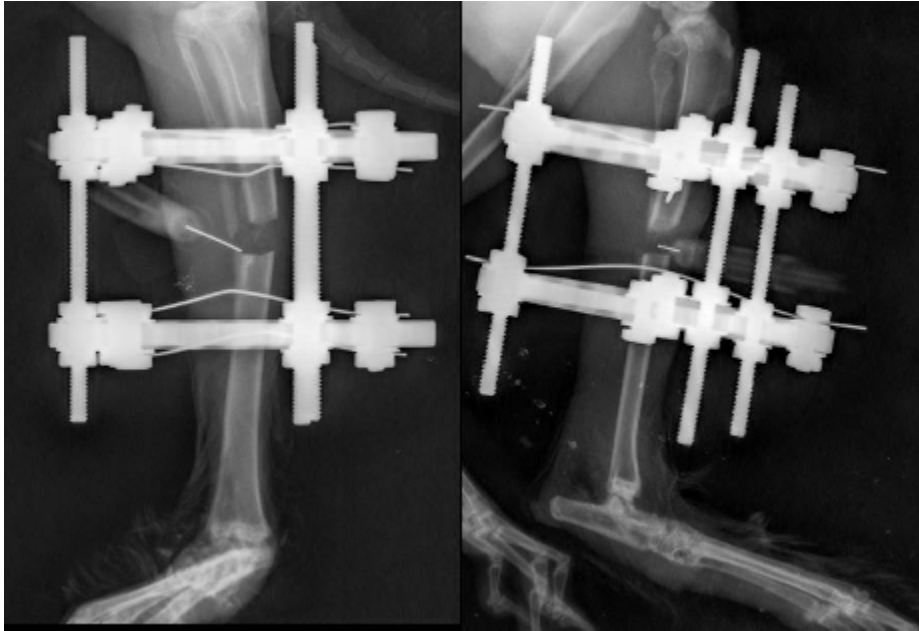
Hücreler tripsin solüsyonu ile besi yerlerinden ayrıldıktan sonra 1000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi, süpernatant atıldı ardından 0.25 cc serum fizyolojik içinde çözüldü. Hemositometre ile sayım yapılarak beş milyon adet kök hücre enjektöre çekildi. Ardından hücreler 1 saat içinde DEÜTF deney hayvanları araştırma laboratuvarına ulaştırıldı. Ketamin ve ksilazin anestezisi verilen denekler taşıma sepetleri ile grafilerinin çekileceği DEÜTF radyoloji bölümüne taşındı (Resim 32). Enjektörün iğnesi distraksiyon alanına sokuldu ve grafi çekildi (Resim 34). İğnenin uygun pozisyonda olduğunun görülmesinin ardından distraksiyon alanına 26 gauge iğne ile 1 dakika süre içerisinde yavaş yavaş kök hücrelerin enjeksiyonu yapıldı, enjeksiyonun ardından verilen sıvı dışarı akmasını diye iğne 1 dakika daha yerinde tutuldu (Resim 33). Distraksiyon alanını yaklaşık 0.5 cm³ olarak hesaplanmıştır. Bu bölgeye verilen kök hücre içeren sıvı hacmi ise 0.25 cm³'tür.



Resim 32: Kök hücre enjeksiyonu öncesi deneklerin anestezisi sağlandı



Resim 33: Kök hücre enjeksiyonu 1 dakika içinde yavaş yavaş yapıldı.



Resim 34: Enjektörün uygun pozisyonu grafi ile görüntüledi

5.4 Değerlendirme

Distraksiyon periyodunun tamamlanmasının ardından 8 haftalık konsolidasyon sürecinin de sona ermesiyle sakrifiye edilen deneklerden elde edilen sonuçlar radyolojik, histopatolojik ve biyomekanik incelemeye tabi tutuldu.

5.4.1 Radyolojik Değerlendirme:

Tüm deneklere distraksiyon tamamlanmasının ardından haftalık ön-arka ve yan düzlemlerde direkt grafi çekildi. Deney hayvanları araştırma laboratuvarında ketamin-ksilazin kombinasyonu ile anestezileri sağlanan denekler, taşıma sepetleri ile grafilerinin çekileceği DEÜTF radyoloji bölümü'ne götürüldü. Deneklerin transport esnasında ısı değişikliklerinden olumsuz etkilenmemesi amacıyla sepetlerin üzeri naylon ile kaplandı. Önceden numaralandırılmış olan denekler ilk olarak supin pozisyonunda yatırılarak ön-arka daha sonra ise yan pozisyonda yatırılarak lateral tibia grafileri çekildi (Resim 35). Görüntüleme işleminde yüksek çözünürlüklü dijital radyografi sistemi (Philips digital diagnost) ile yapıldı.

Görüntüleme 110 cm uzaklıktan 66 kV, 1.82 msn,1.20 mAs ve X1 büyütme kullanılarak standardize edildi. Değerlendirme çalışmayı bilmeyen bir radyoloji uzmanı tarafından yapıldı. Distraksiyon alanının yeni oluşan kemik ile doluluk oranı belirlenerek Modifiye Lane ve Sandhu Skorum Sistemi ile skorum uygulanı^{96,97,139} (Tablo 10). Bu skorum sisteminde defektin proksimali ve distali ayrı ayrı değerlendirilmektedir. Ayrıca bu skorum sistemi ile distraksiyon alanının ne kadarının kallus dokusuyla dolu olduğu ve ne kadar kaynama olduğu da değerlendirilebilmektedir.

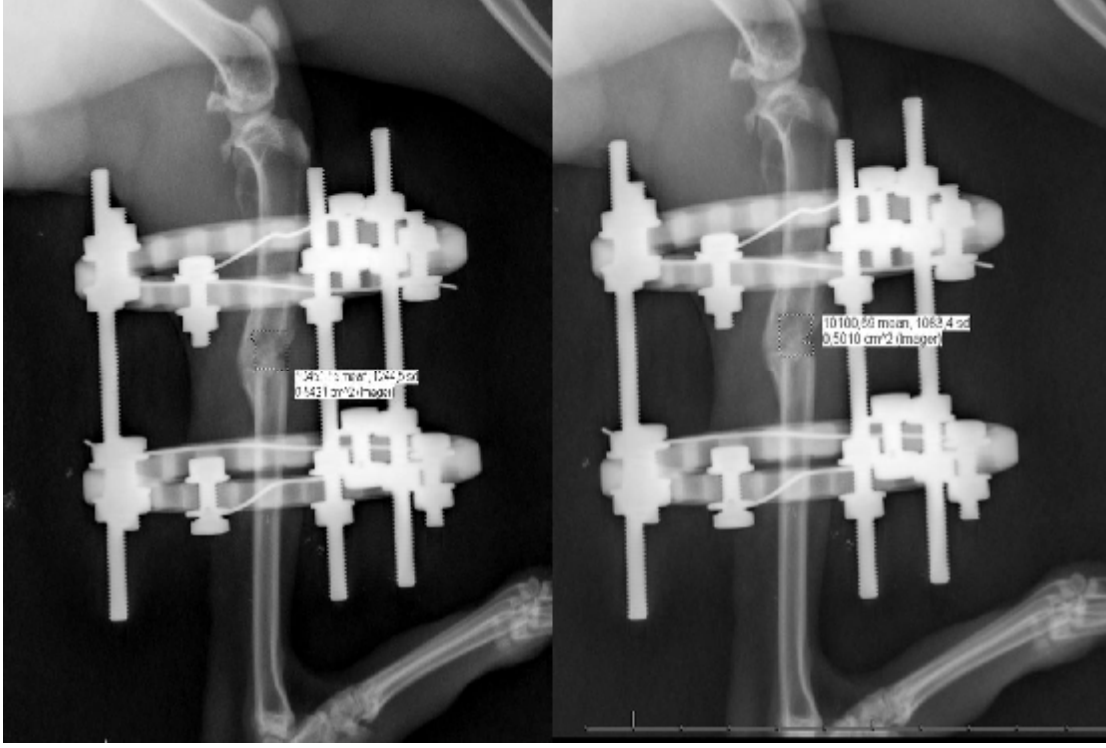
Direkt grafi üzerinde distraksiyon alanını dolduran kallus dokusu alanı toplam distraksiyon alanına oranlandı (Resim 36).



Resim 35: Deneklerin radyolojik görüntülemesi

Modifiye Lane ve Sandhu Skorlama Sistemi	Puanlama
Kemik oluşumu	
Kemik oluşumu yok	0
Defektin %25'ini dolduran kemik oluşumu	1
Defektin %50'sini dolduran kemik oluşumu	2
Defektin %75'ini dolduran kemik oluşumu	3
Bütün defekti dolduran kemik oluşumu	4
Kaynama (Proksimal ve distal ayrı değerlendirilir)	
Kaynama yok	0
Kaynama başlangıcı	1
Radyografik tam kaynama	2
Remodelasyon	
Remodelasyon yok	0
Intrameduller kanalın remodelasyonu	1
Kortekste tam remodelasyon	2
Mümkün olan maksimum puanlar	
Kemik oluşumu	4
Proksimal kaynama	2
Distal kaynama	2
Remodelasyon	2
Maksimum toplam puan	10

Tablo 10: Radyolojik sonuçların değerlendirilmesinde kullanılan Modifiye Lane ve Sandhu skorlaması



Resim 36: Kallus doluluk miktarlarının belirlenmesi

5.4.2 Biyomekanik Değerlendirme:

Denekler radyolojik incelemelerinin tamamlanmasının ardından 8. haftada her bir gruptan üçer tane olacak şekilde rastgele seçimle sakrifiye edildi. Distraksiyon alanının proksimal ve distalinde ikişer cm kalacak şekilde steril serum fizyolojik ile soğutulmuş yüksek hızlı elektrikli kesici ile kesildi. Kemik üzerindeki yumuşak dokular temizlendi. Tüm örnekler numaralandırıldı ve serum fizyolojik emdirilmiş ıslak bir sargı bezine sarılarak bir saat içerisinde Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomekanik A.D. laboratuvarına ulaştırıldı. Biyomekanik çalışma için üç nokta kırma testi uygulandı. (AG-1 10 kN, Shimadzu, Japonya) (Resim 37). Alt aparat aralığı 30 mm ile sabitlendikten sonra distrakte alan üst aparatı ortalayacak şekilde kemik numuneleri yerleştirildi. Cihaz kırma testini dakikada 1 milimetre hız (1 mm/dk) ile basarak gerçekleştirdi. Kallus dokusunda ilk kırılma oluşup kuvvet basma işleminin düştüğü andan sonra deney sonlandırıldı.

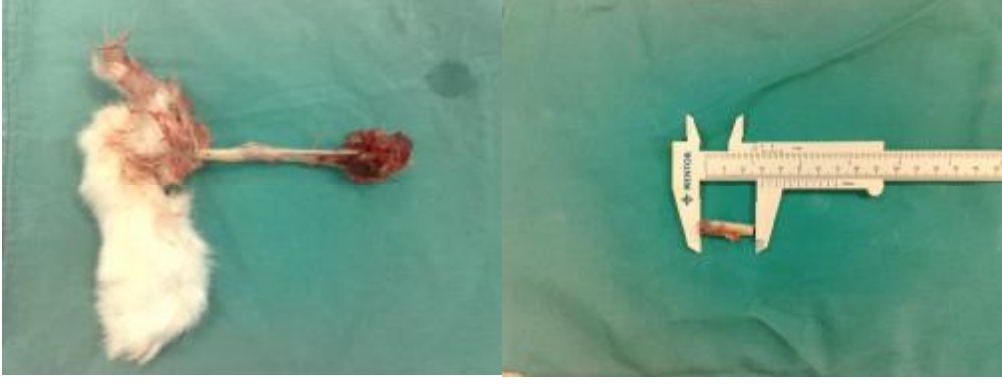


Resim 37: Üç nokta kırma (bending) testinin uygulanışı

5.4.3 Histopatolojik Değerlendirme:

Denekler, distraksiyon işleminin tamamlanmasından sekiz hafta sonra 40 mg/kg pentobarbital ile sakrifiye edildi. Sağ tibialarında bulunan distraktörleri tutan K telleri yan keski ile kesildi ve distraktör çıkarıldı ardından K teli parçaları penset yardımıyla çıkarıldı, onbeş numaralı bistüri ile tibia'nın anteriomedialinden kesi yapıldı. Kesi diz eklemi ve subtalar eklem seviyesine kadar ilerletildi. Yumuşak dokuların sıyrılmasının ardından yuvarlak uçlu elektrik motorlu kesici ile 8000 devir/dk olacak şekilde sürekli steril serum fizyolojik ile soğutma yapılarak distraksiyon alanını santralde bırakacak şekilde üç cm kemik eksize edildi (Resim 38).

Örnekler numaralandırılarak %10'luk formaldehit ile oda sıcaklığında 24–48 saat fikse edildi. Dekalsifikasyon için tibia morse solüsyonuna konuldu. Morse solüsyonu %10'luk tamponlu formalinle %20 oranında formik asitle (UN 1779, Merck, Darmstadt, Almanya) karıştırılarak hazırlandı. Solüsyon ilk üç gün 12 saatte bir değiştirilerek daha sonraki günlerde her 24 saatte bir değiştirilerek 12 günde dekalsifiye edildi. Daha sonra fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla bir gece akarsu altında yıkandı. Dehidratasyon amacıyla sırasıyla %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinde 20'şer dakika; ardından dört farklı aseton serisinde 20'şer dakika tutuldu. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki farklı ksilene tabi tutuldu. Birer saatlik iki kez parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ'luk parafin kesitler alındı.



Resim 38: Sakrifikasyonun ardından inceleme için 3 cm kemik dokusu eksize edildi.

Demirli Hematoksilen-Eozin Boyaması:

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 30 dakika (60°C etüvde) diğer ikisi 20'er dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için beş değişim absolü alkol %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Demirli Hematoksilen ile boyandı. Demirli hemotoksilen %70 Alkol solüsyonundan %10'luk Mayer's hemotoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) olacak şekilde karıştırılarak hazırlanan hemotoksilen %10'luk ferik kloridle birebir oranında kullanılarak boyama yapıldı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (01602E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyası ile boyandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve iki seri Absolü alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

Masson-Trikrom Boyaması:

Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 30 dakika (etüvde) diğer ikisi 20'şer dakikalık üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için iki değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi. Ardından distile suda beş dakika bekletildikten sonra Masson Trikróm boyama seti (04-010802, Bio-optica Milano, İtalya) içerisinde dokular üzerine altı damla A solüsyonu ile altı damla B solüsyonu damlatıldı ve 10

dakika bekletildi. Daha sonra yıkamadan 10 damla C solüsyonu damlatıldı ve 4 dakika bekletildi. Hızlıca distile su ile yıkandıktan sonra 10 damla D solüsyonu damlatıldı ve 4 dakika bekletildi. Distile suyla iyice yıkandı. Ardından 10 damla E solüsyonu damlatılıp 10 dakika bekletildi. Yıkamadan 10 damla F solüsyonu damlatıldı ve 5 dakika bekletildi. Distile su ile yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirildi. Son absolü alkolde 2 dakika bekletildi ve ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

İmmünohistokimyasal İncelemeler:

Hücrelerde osteopontin ve osteokalsin sentez miktarı immünohistokimyasal yöntemlerle gösterildi. Alınan parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için bir gece 60°C'lik etüvde bırakıldı. Ardından ilki 30 dakika (etüvde) diğer ikisi 20'şer dakikalık üç farklı ksilende tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için iki değişim absolü alkol ve %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirildi ve distile su beş dakika bekletildi. Distile sudan alınan kesitlerin doku etrafındaki su silinip, dakopenle çevresine daire çizildi. Bu işlem dokuların kurummasını engellemek ve uygulanacak maddelerin lam üzerinde dağılmasını engellemek amacıyla yapıldı. Üzerine PBS damlatıldı. Tripsin 10 dakika 37 °C etüvde muamele edildi. PBS'le 3X5 dakika yıkandı. %3'lük Hidrojen Peroksidaz'da beş dakika oda ısısında bekletildi. PBS'le 3X5 dakika yıkandı. Bloking solüsyonu damlatıldı ve 1saat oda ısısında bekletildi. Yıkama yapılmadan dokulara Primer Antikor damlatıldı ve bir gece +4 °C'de bekletildi. PBS'le 3X5 dakika yıkandı. Biotinlenmiş sekonder antikorla 30 dakika oda ısısında muamele edildi. PBS'le 3X5 dakika yıkandı. Enzimle işaretli (peroksidaz) avidin-biyotin kompleksi (streptavidin) ile 30 dakika oda ısısında muamele edildi. PBS'le 3X5 dakika yıkandı. DAB ile boyaması 3-5 dakika boyandı. Distile su ile yıkandı. Mayers hematoksilende 1-2 dakika boyandı. Distile su ile yıkandı. Artan alkol serilerinden geçirildi. Son absolü alkolde 2 dakika bekletildi ve ksilen ile şeffaflaştırma yapıldıktan sonra entellan ile kapatıldı.

Histolojik Skorum

Boyama işlemlerinin ardından örnekler ışık mikroskopunda 20x, 100x, 200x ve 400x büyütmede incelendi. Histolojik incelemeler için Olympus DX51 floresan mikroskop kullanıldı. Elde edilen demirli hemotoksilen preparatlarında 6 farklı alanda mm²'deki osteosit, osteoblast, osteoklast, fibroblast ve kondrosit hücreleri sayıldı. Histopatolojik inceleme sırasında ışık mikroskopundaki 1x'lik büyütmedeki görüntüler, renkli dijital video kamera (Olympus DC70) ile bilgisayar ortamına aktarıldı. Görüntüleme için *Olympus image proplus software* kullanıldı. Bilgisayar ortamında yeni oluşan trabeküller ve kırık bölgeleri alan cinsinden hesaplandı. Kullanıcının işaretlediği uzunlukları ve alanları ölçüp hesaplayabilme özelliğine sahip bir görüntü analizi yazılımı yardımıyla (Image Tool 3.0 Software) yeni kemik oluşum uzunlukları ve alanları hesaplanıp kaydedildi.

GFP ile işaretli hücrelerin ışınmasını göstermek amacıyla Grup II ve Grup III'e ait örnekler immünofloresan mikroskopta 20x, 100x, 200x ve 400x büyütmede incelendi. İmmünohistokimyasal boyama yöntemleri ile elde edilen preparatlarda 6 farklı alanda mm²'deki osteokalsin ve osteopontin pozitif hücreler sayıldı

5.4.4 İstatistiksel Değerlendirme:

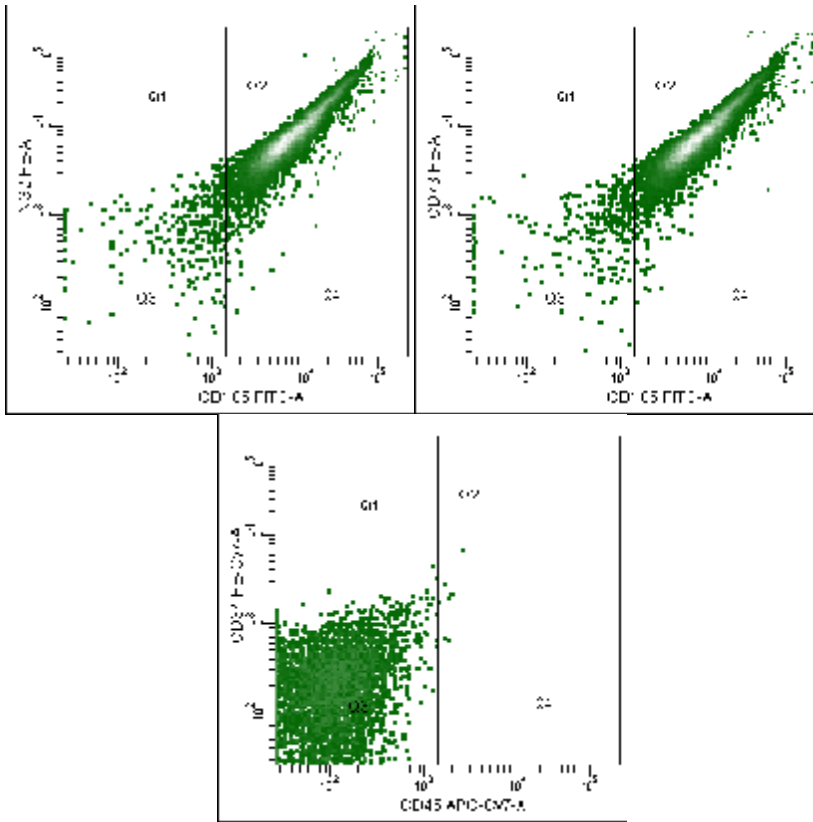
Çalışmada opere edilen tavşanlardan elde edilen radyolojik değerlendirme sonuçları, biyomekanik değerlendirme sonuçları ve histomorfometrik ölçüm sonuçları Windows için SPSS 15.0 istatistik programında Mann Whitney U testi kullanılarak analiz edildi. Veriler ortalama (\pm standart hata) olarak gösterildi.

6.BULGULAR-SONUÇLAR

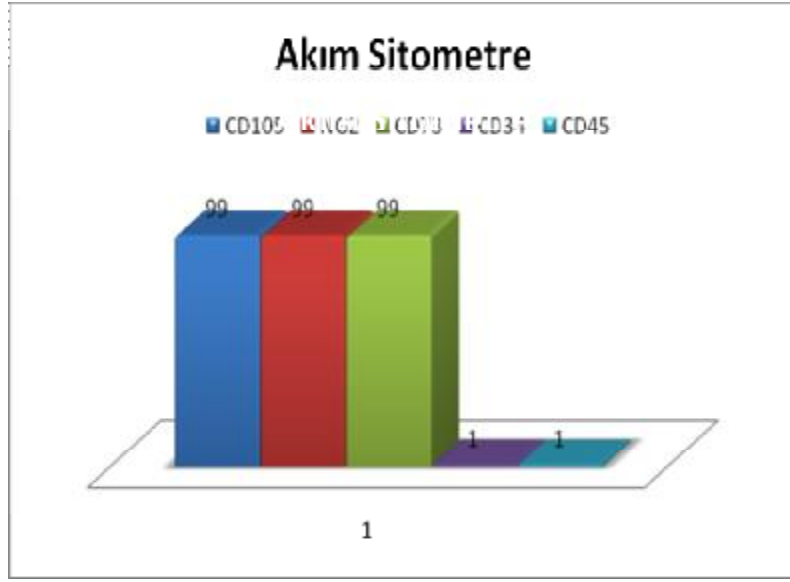
Çalışmaya Grup I, Grup II ve Grup III'te yedişer adet olacak şekilde 21 denek ile başlandı. Bütün deneklerin distraktörleri çok iyi tolere ettiği, yeme ve suya ulaşmada sorun yaşamadıkları görüldü. Üç olguda operasyon sonrası ödem ve hiperemi oluştu ancak bir hafta içinde geriledi. Grup III'te bir denekte yağ alınma işlemi sonrası alt ekstremitte paralizisi gelişti. Bu denek yerine başka bir denek konuldu ve çalışma 21 tavşan ile tamamlandı.

6.1 Akım Sitometre (FACS) Sonuçları:

Moleküler biyoloji laboratuvarında, elde edilen kök hücreler üçüncü pasajın ardından adipoz kökenli mezenkimal kaynaklı kök hücre olduklarının doğrulanması amacıyla yüzey belirteçleri ile işaretlenerek akım sitometri cihazında sayımı yapıldı. Hematopoetik kök hücrelere özgü olan CD34 ve CD45 belirteçlerinin negatif olduğu görüldü. Adipoz kökenli kök hücrelere özgü olan CD73, CD105, NG2 belirteçleri ile yapılan sayımda %99 oranında pozitiflik görüldü (Şekil 44,45).



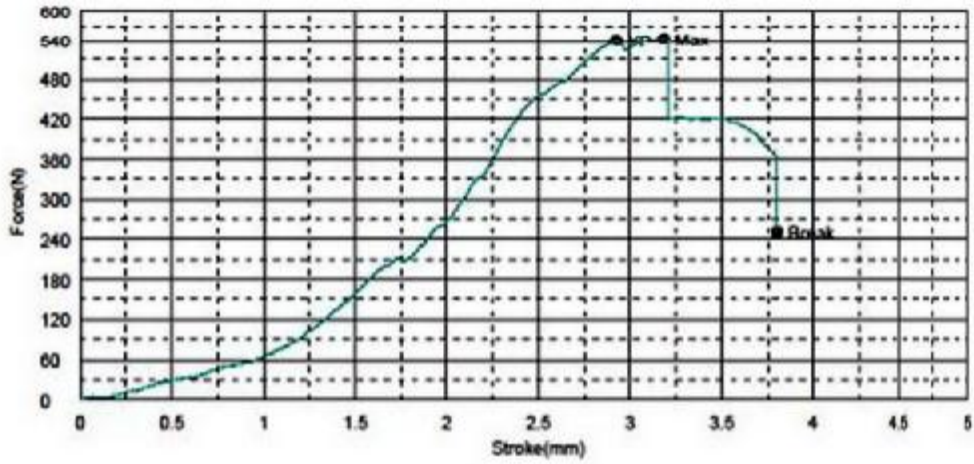
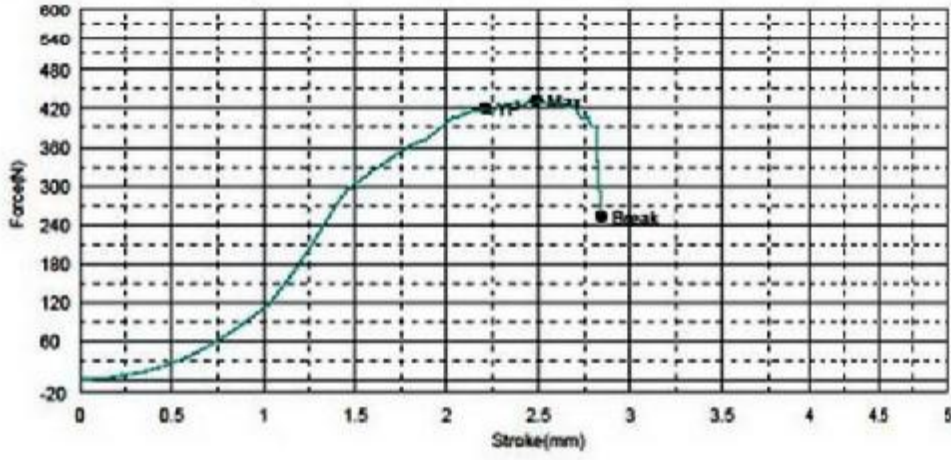
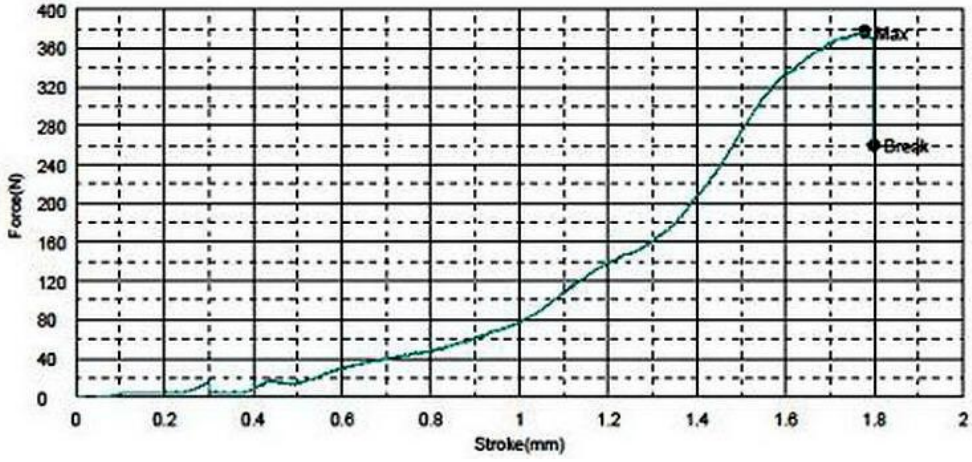
Şekil 44: Kök hücrelerin akım sitometre ile sayım sonuçları



Şekil 45: Akım sitometre sonuçların karşılaştırılması

6.2 Biyomekanik Değerlendirme Sonuçları

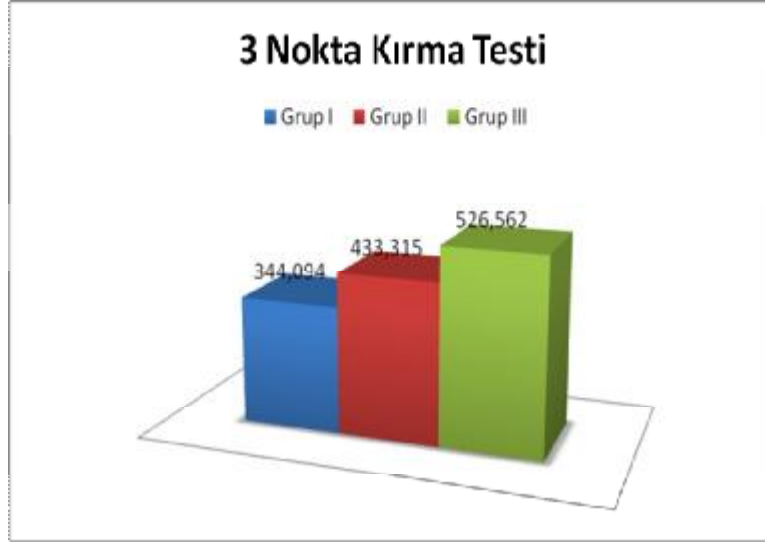
Biyomekanik değerlendirmede yapılan üç nokta kırma (bending) testinde elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında en yüksek skorların osteojenik diferansiye kök hücrelerin verildiği üçüncü grupta olduğu görüldü (Tablo 11). Grup I'in ortalama değeri $344,092 \pm 28,56$, Grup II'nin ortalama değeri $433,315 \pm 23,12$ ve Grup III'ün ortalama değeri $526,896 \pm 18,93$ idi (Şekil 46,47). İstatiksel değerlendirme için kullanılan Mann-Whitney U testinde tüm gruplar için aynı sonuç elde edilmiştir. Yapılan test ile M-W $U = 0,000$ $p = 0,050$ olarak saptandı. Aradaki fark istatistiksel açıdan anlamlı değildir. Gruplar arası değerlendirme için yapılan Kruskal Wallis testinde $p=0,027$ olarak saptanmıştır. Bu değerlendirmede aradaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.



Şekil 46: Biyomekanik değerlendirme ile Grup I, Grup II ve Grup III'te alınan sonuçlar

	Denek No	Maksimum güç (Newton)	Ortalama
Grup I	1	377.031	344.094
	2	326.019	
	3	329.234	
Grup II	1	431.875	433.315
	2	457.126	
	3	410.945	
Grup III	1	545.000	526.562
	2	526.563	
	3	508.125	

Tablo 11: Her üç grupta saptanan biyomekanik değerlendirme sonuçları

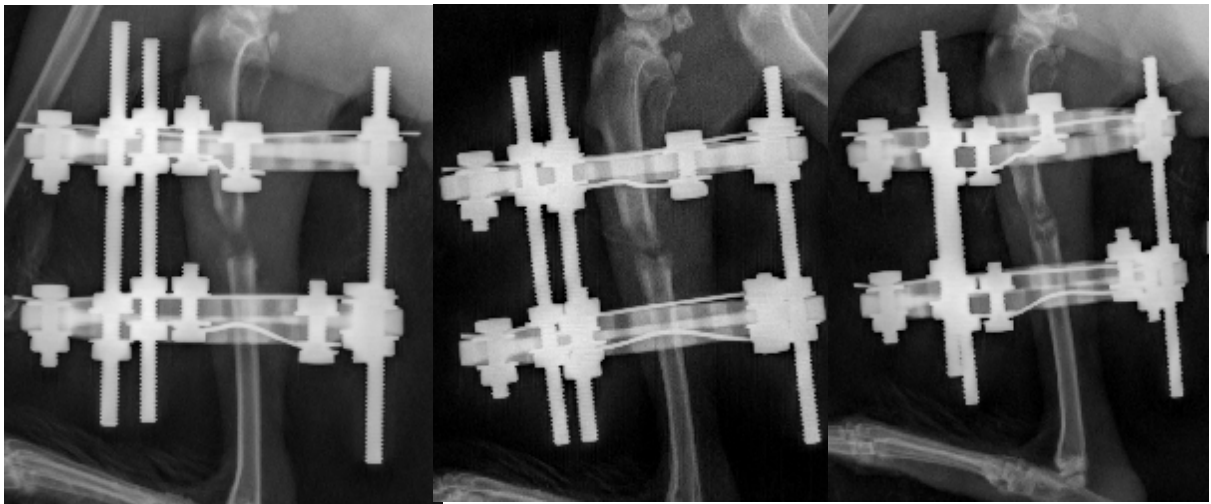


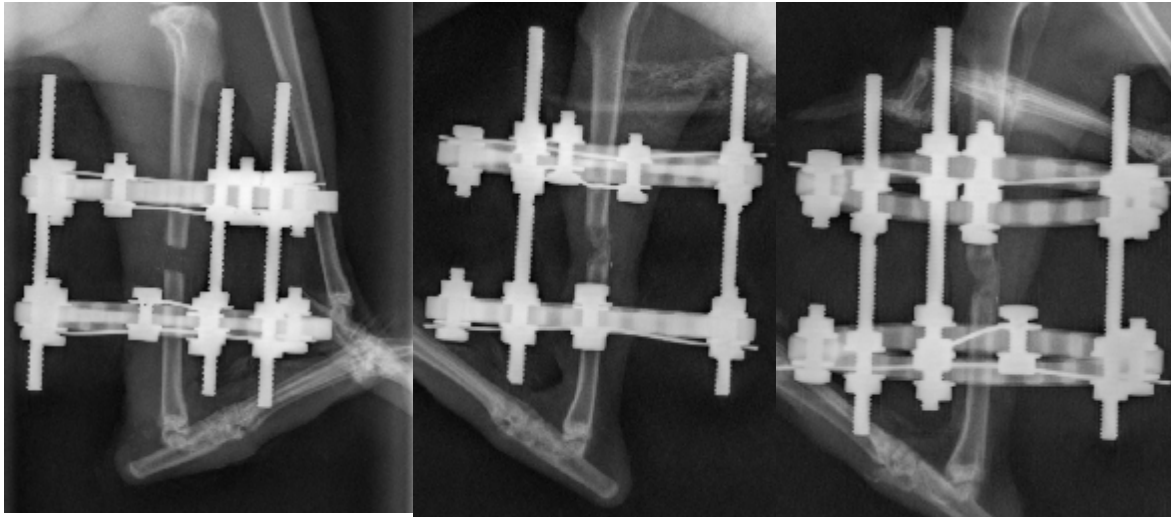
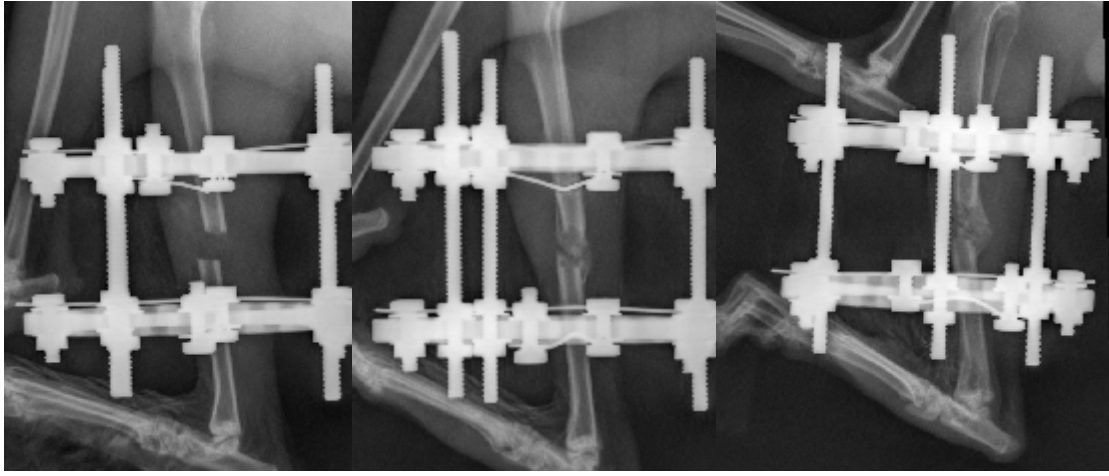
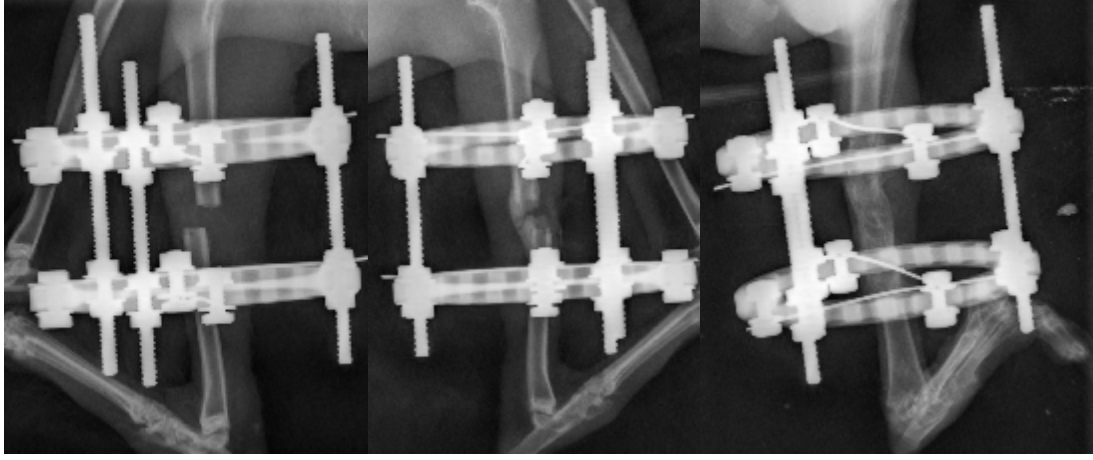
Şekil 47: Üç nokta kırma testinde alınan maksimum yüklenme ortalamalarının karşılaştırılması

6.3 Radyolojik Sonular

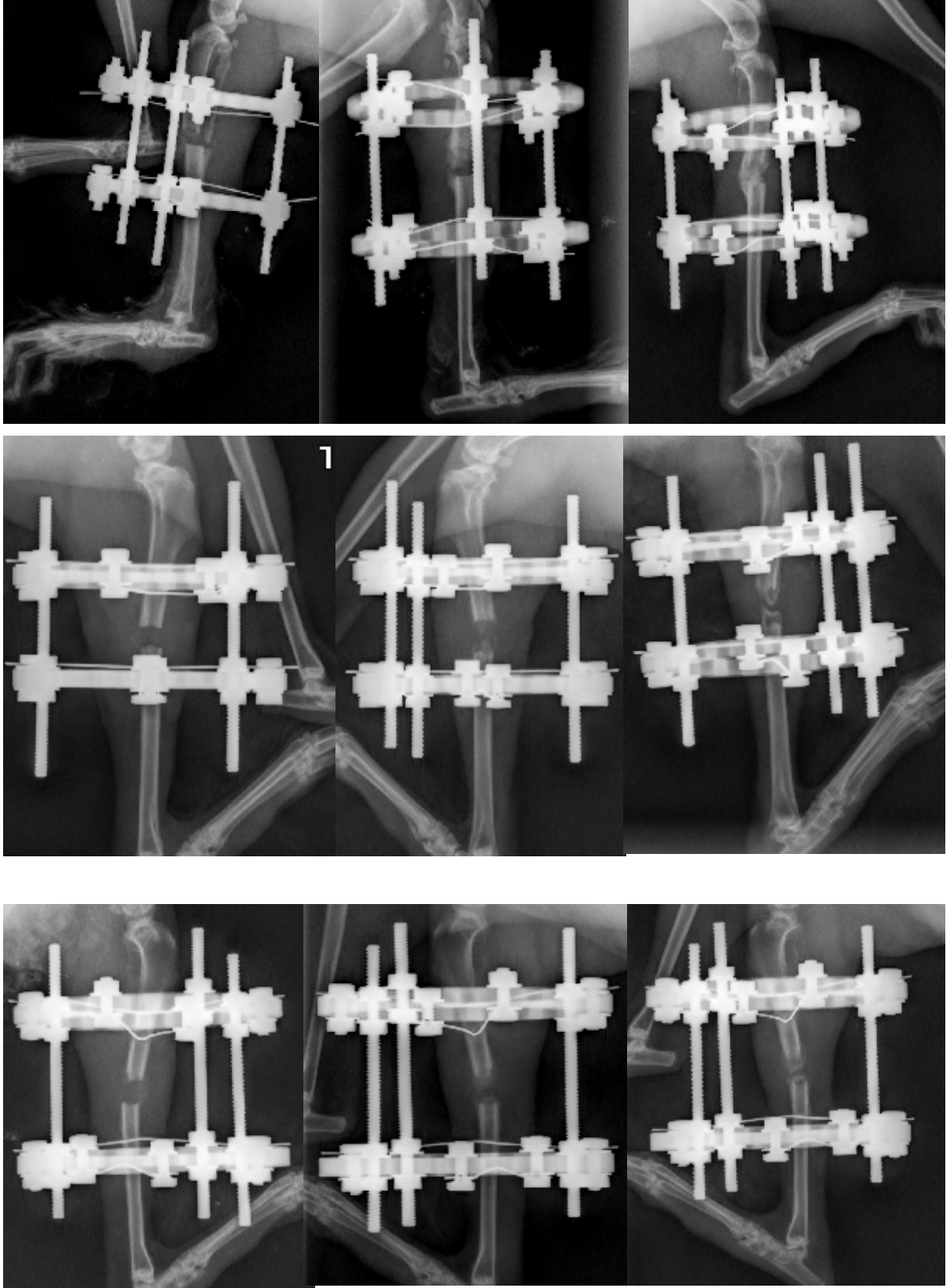
Deneklerin 8. haftadaki radyolojik görüntüleme sonuçları karşılaştırıldı. Osteojenik diferansiye kök hücrelerin verildiği Grup III' de bazı deneklerde yüzde yüze varan oranlarda distraksiyon alanının kallus ile dolu olduğu görüldü bu oran diferansiye olmamiş kök hücrelerin verildiği Grup II'de daha düşüktü. Kontrol grubu ve kök hücre grubunda proksimal ve distal kallus füzyonunun her denekte olmadığı füzyon olan deneklerde ise kallus dokusunun çok daha radyolusent olduğu görüldü. Çalışmaya alınan deneklerin radyografik görüntülerinin değerlendirilmesi için Modifiye Lane ve Sandhu skorlama sistemi kullanıldı.^{97,127} Her bir grubun aldığı skorlar ve distraksiyon alanının kallus dokusu ile doluluk oranları karşılaştırıldı (Resim 39,40,41).

Deneklerin modifiye Lane ve Sandhu skorlamasında aldığı değerler ortalaması; Grup I'de $4,571 \pm 0,2$, Grup II'de $5,14 \pm 0,1$, Grup III'te $6,14 \pm 0,5$ olarak bulunmuştur (şekil 48). Her bir grup ikili olarak diğer gruplarla karşılaştırıldığında; Grup I ve II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,044$ M-W U= 12,000). Grup I ile Grup III arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur; ($p=0,011$ M-W U = 6,000) Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,084$ M-W U= 13,000) (Tablo 12).

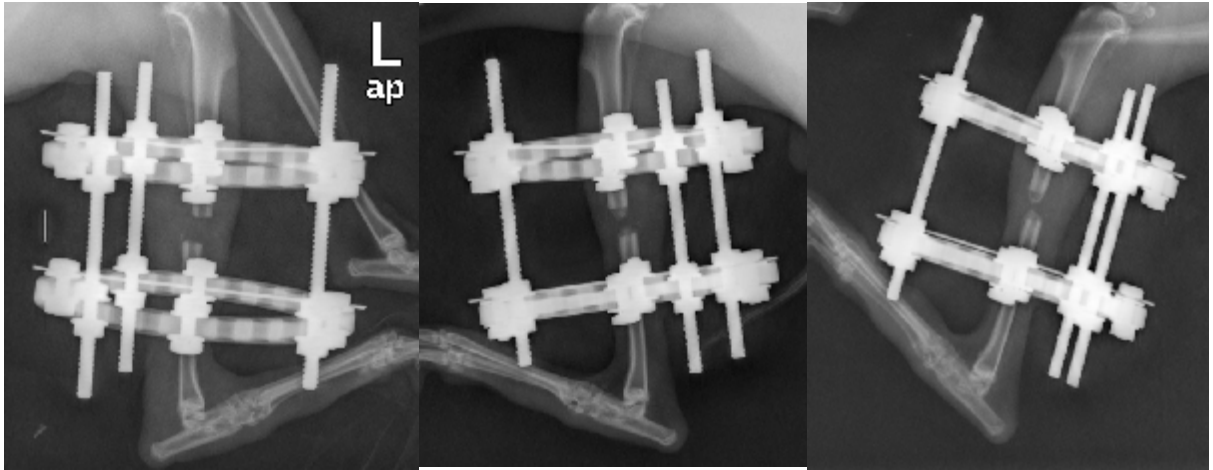
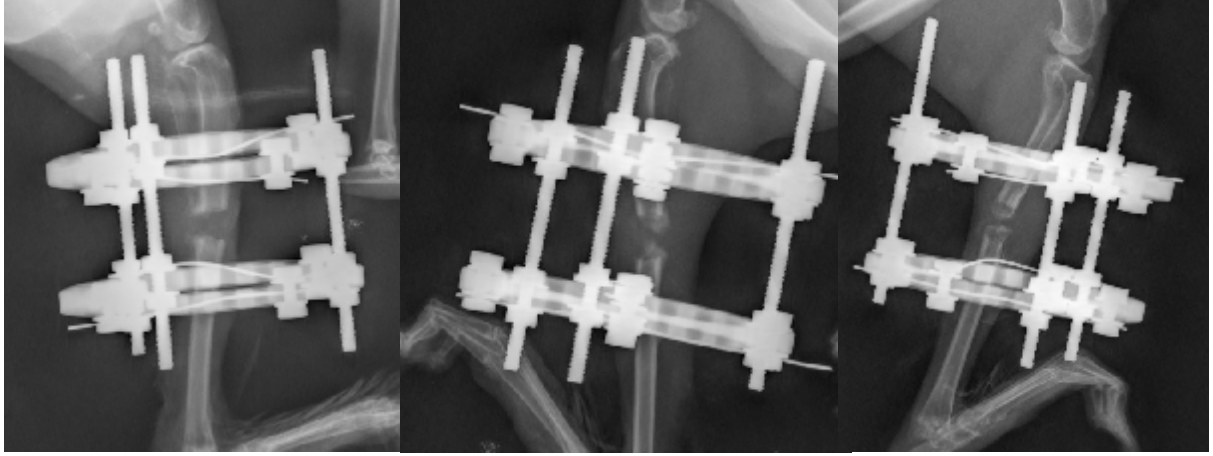
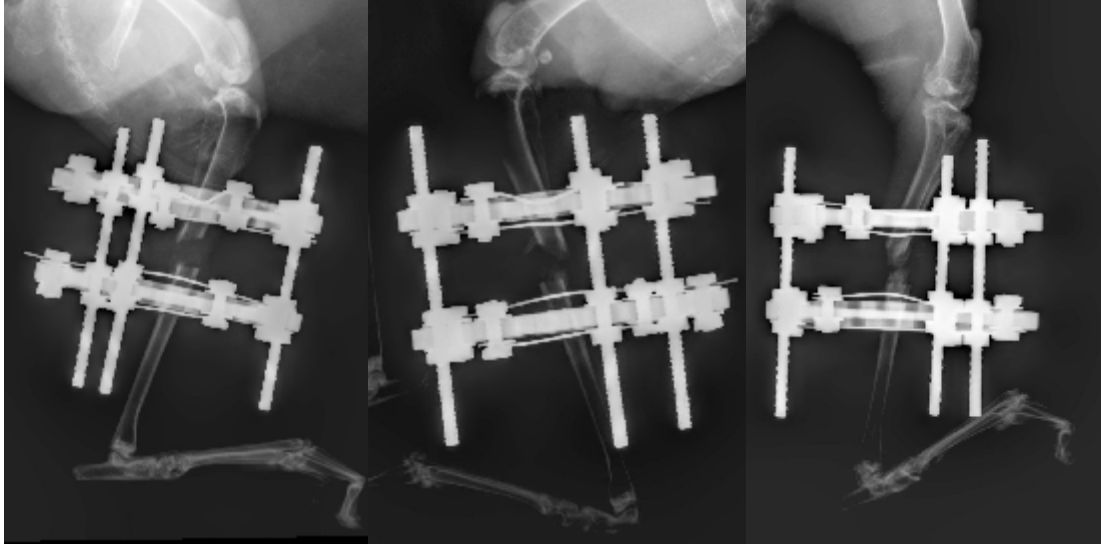




Resim 39: Diferansiyasyon grubundaki deneklerin (Grup III) 1., 4. ve 8. haftalardaki radyolojik görünümleri



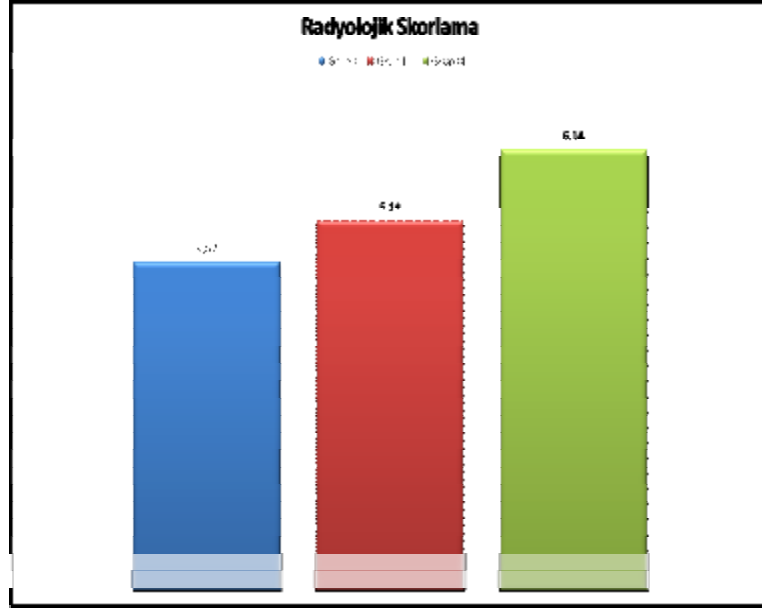
Resim 40: Kök hücre grubundaki deneklerin (Grup II) 1., 4. ve 8. haftalardaki radyolojik görünümleri



Resim 41: Kontrol grubundaki deneklerin (Grup I) 1., 4. ve 8. haftalardaki radyolojik görünümleri

Denek No	Grup I	Grup II	Grup III
1	4	6	5
2	5	5	5
3	5	5	8
4	4	5	5
5	5	5	6
6	5	5	6
7	4	5	8
Ortalama	4,57	5,14	6,14

Tablo 12: Grupların aldığı radyolojik skor ortalamaları

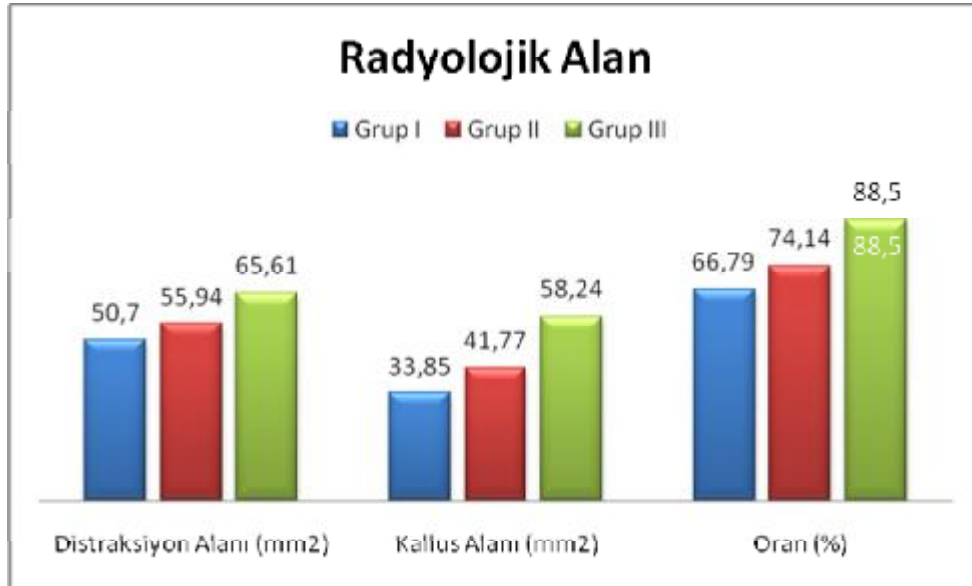


Şekil 48: Radyoloji skor ortalamalarının grafiksel karşılaştırılması

Çalışmaya alınan tavşanların radyolojik incelemesinde distraksiyon alanını dolduran kallus oranları ortalamasına bakıldığında; Grup I'in ortalaması $66,79 \pm 2,7$, Grup II'nin ortalaması $74,14 \pm 3,9$ ve Grup III'ün ortalaması $88,5 \pm 3,9$ dur (Şekil 49). İstatistiksel olarak karşılaştırılma yapıldığında; Grup I ve II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p=0,18$ M-W $U=0,18$) Grup I ve III arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,002$ M-W $U=0,000$) Grup II ve III arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır ($p=0,047$ M-W $U= 9,000$) (Tablo 13).

Denek No	Grup I			Grup II			Grup III		
	Kallus alanı (mm ²)	Distraksiyon alanı (mm ²)	Kallus alanının toplam alana oranı	Kallus alanı (mm ²)	Distraksiyon alanı (mm ²)	Oran	Kallus alanı	Distraksiyon alanı (mm ²)	Oran
1	29,33	42,26	69,40	50,10	56,19	89,16	58,73	75,66	77,62
2	29,16	39,06	74,65	36,81	58,85	62,55	41,73	55,68	74,95
3	36,44	54,06	67,41	34,97	50,49	69,26	63,77	71,76	88,87
4	27,16	48,24	56,30	27,83	45,68	60,92	48,55	59,17	82,05
5	42,93	60,02	71,53	45,75	58,13	78,70	52,08	54,21	96,07
6	42,57	59,94	71,02	51,29	63,11	81,27	64,91	64,91	100
7	29,42	51,38	57,26	45,67	59,18	77,17	77,93	77,93	100
Ort.	33,85	50,70	66,79	41,77	55,94	74,14	58,24	65,61	88,5

Tablo 13: Gruplar arası kallus alanı ve distraksiyon alanlarının karşılaştırılması



Şekil 49: Grupların kallus doluluk oranlarının karşılaştırılması

6.4 Histopatolojik Sonuçlar

6.4.1 Işıık Mikroskopik Bulgular:

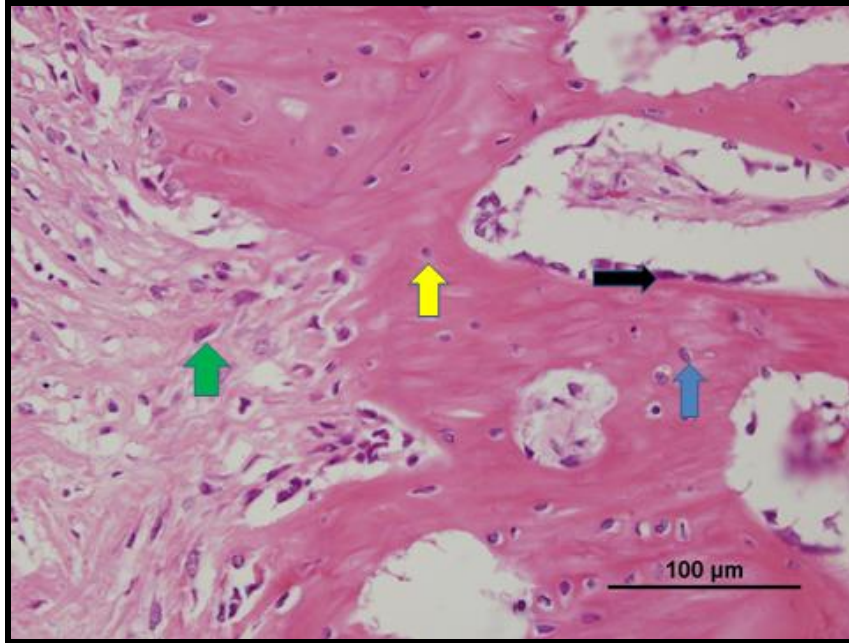
Kırık iyileşmesi ve kallus oluşumu; kırığın az travmatik olması, serbest fragman içermemesi, fiksasyonun iyi ve doğru açıda yapılmış olmasına bağlıdır. Çalışmamızda kırık işleminin minör travmayla gerçekleştirilmesine bağlı olarak kırık hattından alınan kesitlerde serbest fragman ile karşılaşılmadı. Mikro düzeydeki kemik debritlelerinin de osteoklastlarla yok edilmiş olduğu görüldü. Kemik kırık uçları olağan hipersellüler fibroblastik aktiviteyi göstermekte olup hızla damarlanan meduller tarafta hyalin kıkırdak adalarla karakteristik kemik modelleri temsil edilmekteydi. Bu kıkırdak alanlar hipoksiye bağlı olarak trabeküler (ağsı) kemik ile yer değiştirmektedir.

Deney gruplarımızda gruplar arası farklılık esasen bu iyileşme hiyerarşisinin yüzdelerindeki fark gibidir. Bu demektir ki; trabeküler kemik yüzdesi ne kadar fazla ise iyileşme o oranda başarılı hipersellüler bağ doku reaksiyonu kırık hattında ne kadar fazla izleniyorsa iyileşme o kadar erken evrededir.

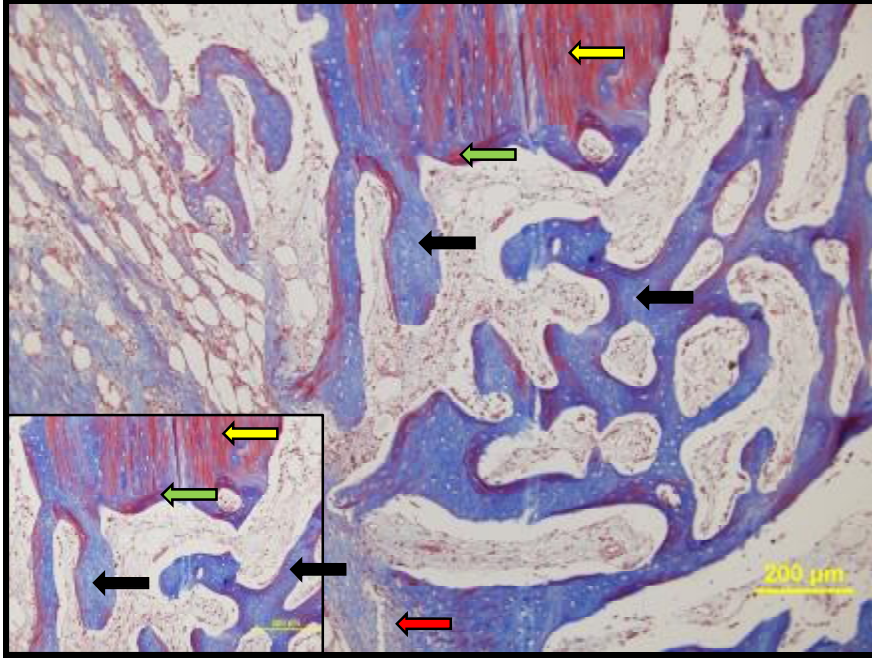
Çalışmamızda Grup I'e ait tibia kesitleri incelendiğinde, kırık hattından endokondral kemikleşmenin başladığı az da olsa trabeküllerin oluştuğu, kallus dokusunun çoğunluğunun çok hücreli (rejeneratif) bağ dokusundan oluştuğu gözlemlendi, aralarda kıkırdak alanlara bolca rastlandı (Resim 42,43,44,45).



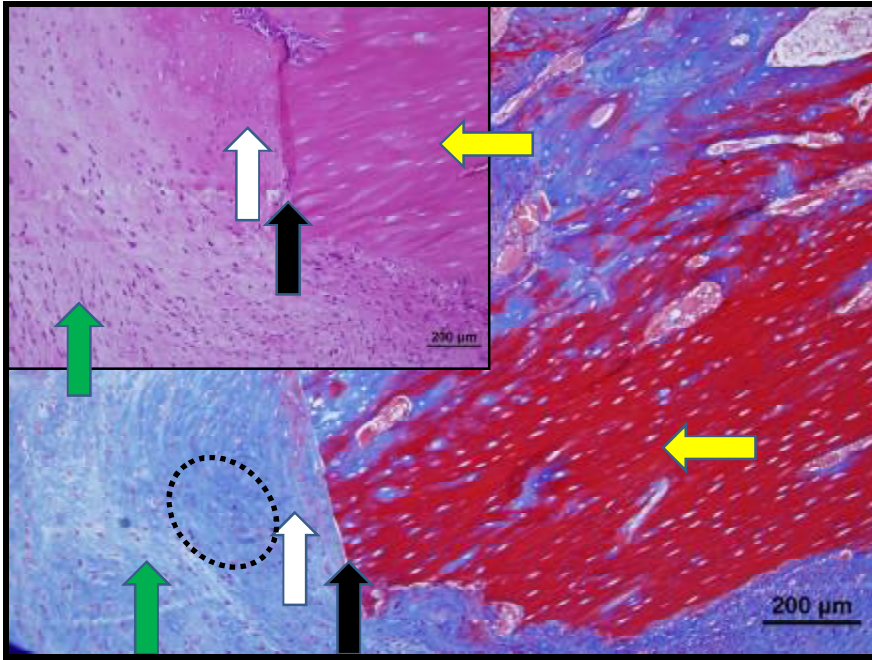
Resim 42: Grup I, siyah ok: osteon, sarı ok: havers kanalı, mavi ok: kıkırdak odakları, noktalı alan: kıkırdak alanlar yeşil ok: hipersellüler bağ dokusu. H&E



Resim 43: Grup I, solda bol fibroblast içeren hipersellüler bağ dokusu, sağda örgü kemik içerisinde kıkırdak doku adacıkları, siyah ok: osteoblast hücresi, mavi ok: kıkırdak odakları, sarı ok: osteosit hücresi, yeşil ok bağ dokusunda fibroblast hücresi. H&E

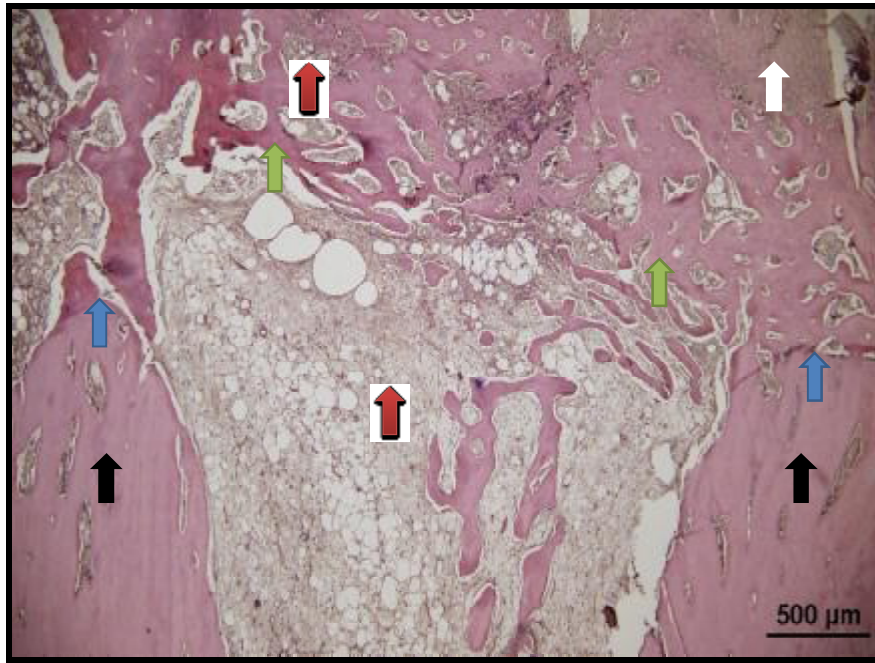


Resim 44: Grup I, yeşil ok: kırık hattı, siyah ok: yeni oluşan trabeküller, sarı ok: eski kemik, kırmızı ok: bağ dokusu. Masson Trikrom.

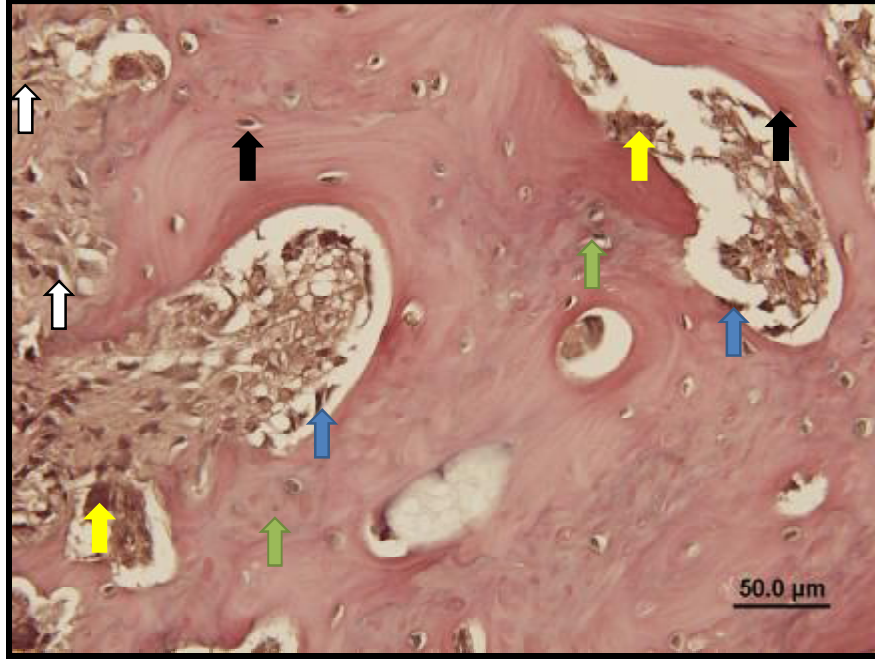


Resim 45: Grup I, düzgün kemik kırık ucu ve uçta noktalı alan: kırıldak doku adacığı siyah ok: kırık hattı, beyaz ok: kemikleşme, sarı ok: eski kemik dokusu, yeşil ok: bağ dokusu. Masson Trikrom+H&E

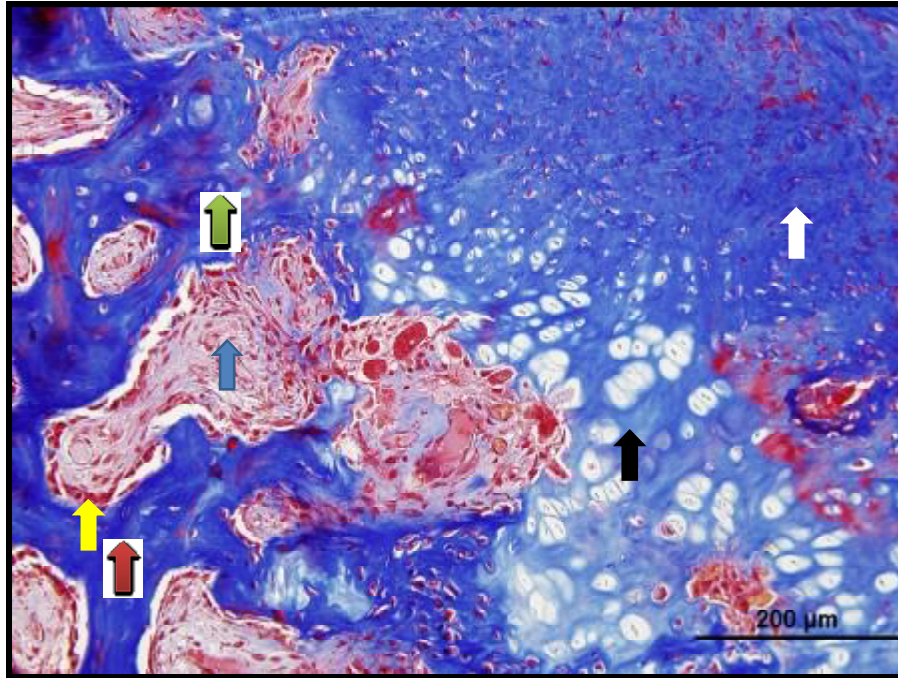
Grup II'ye ait tibia kesitleri incelendiğinde, kırık hattından sekonder kemikleşmenin Grup I'e oranla daha fazla ilerlediği, bağ doku oranının azaldığı, trabeküler yapının arttığı ve düzenli bir ağ yapma eğiliminde olduğu, kallus dokusunun çoğunluğunun trabeküler kemik ve kırık doku adacıklarından oluştuğu gözlemlendi (Resim 46,47,48,49,50,51).



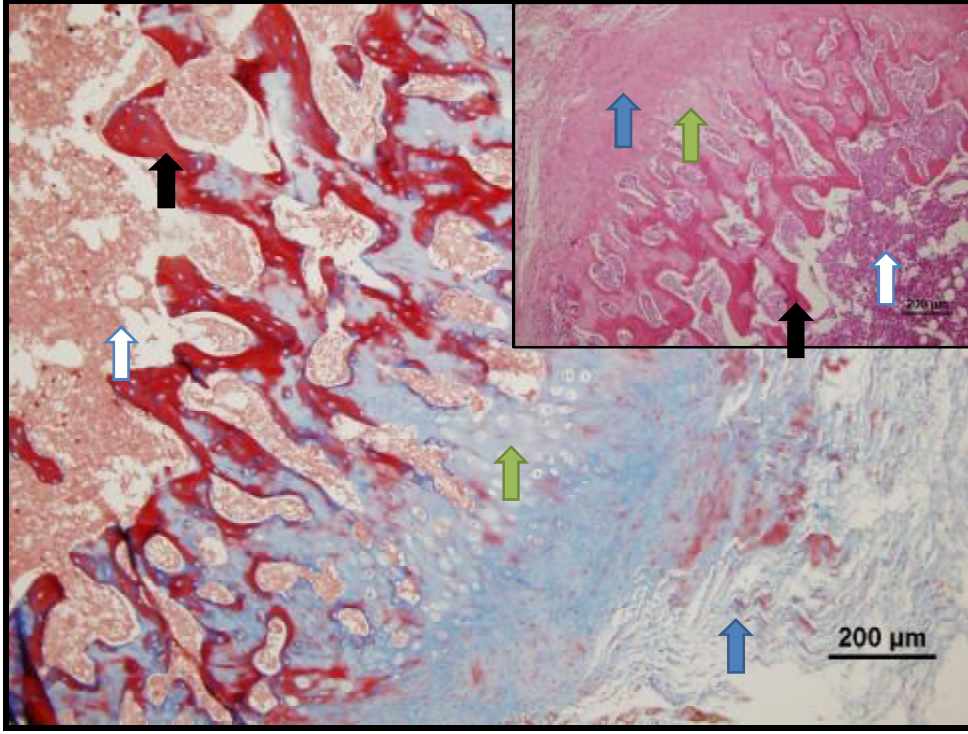
Resim 46: Grup II, alt sağ ve solda iki kortikal kemik kırık ucu ve onların ortasında medulla izlenmekte. Bu iki uç oldukça sıkı ağ görünümlü trabeküler kemikle devam etmekte. Siyah ok: kırık ucu, mavi ok: kırık hattı, yeşil ok yeni oluşan trabekül, kırmızı ok: kemik iliği, beyaz ok: hiperselüler bağ doku. H&E



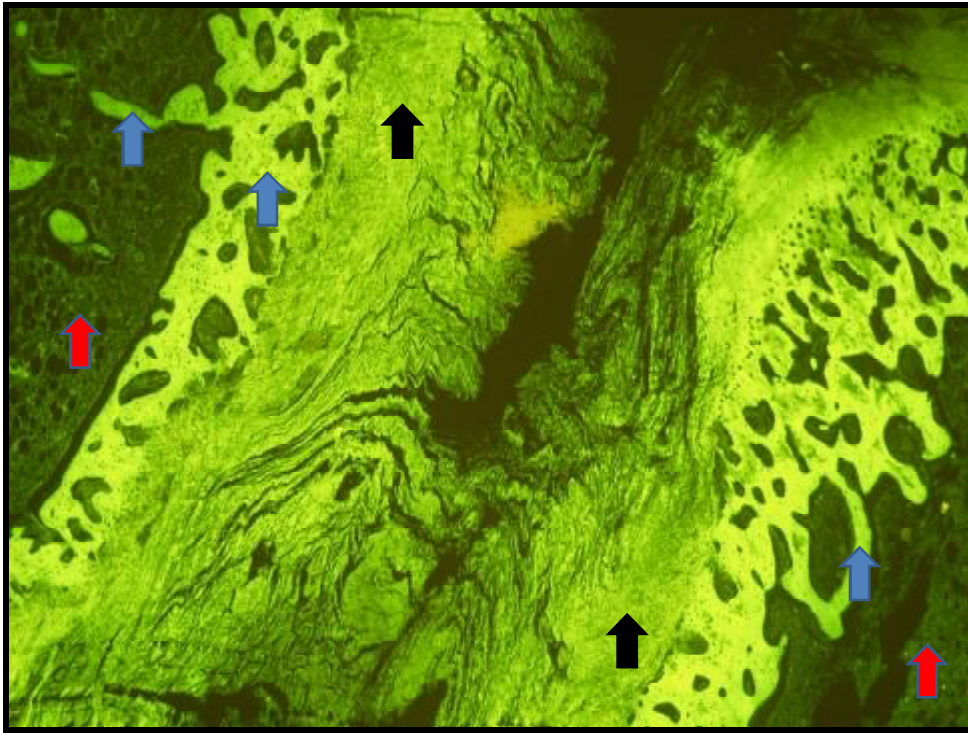
Resim 47: Grup II, siyah ok: osteosit, mavi ok: osteoblast, yeşil ok: kıkırdak odaklar, sarı ok: osteoklast hücreleri, beyaz ok: bağ dokusunda fibroblastlar. H&E



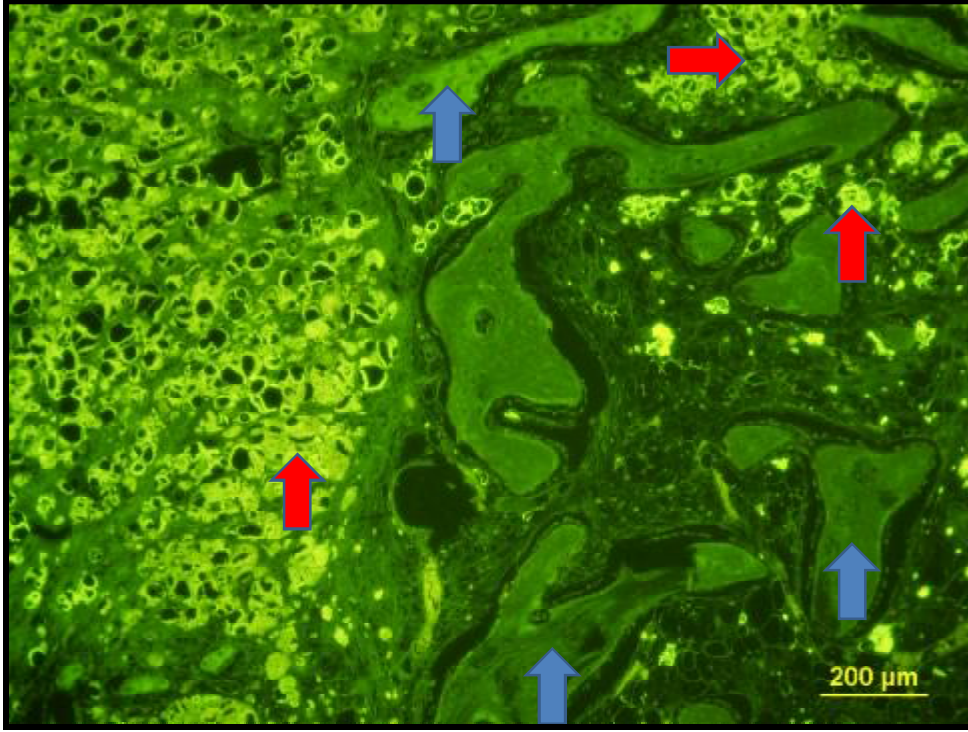
Resim 48: Grup II, Kemik-kıkırdak-bağ doku geçişi, kırmızı ok: yeni oluşmuş trabekül, siyah ok: kıkırdak geçişi, beyaz ok: bağ dokusu, sarı ok: osteoblast, yeşil ok: osteosit, mavi ok: mezenşimal hücre. Masson Trikrom.



Resim 49: Grup II, siyah ok: yeni oluşan trabeküller, yeşil ok: kırıldak geçişi, mavi ok: bağ dokusu, beyaz ok: kemik iliği. Masson Trikrom+H&E.



Resim 50: Grup II, mavi ok: GFP ışması yapan yeni oluşmuş trabeküller, siyah ok: ışma yapan bağ dokusu, kırmızı ok: ışma yapmayan kemik iliği dokusu.

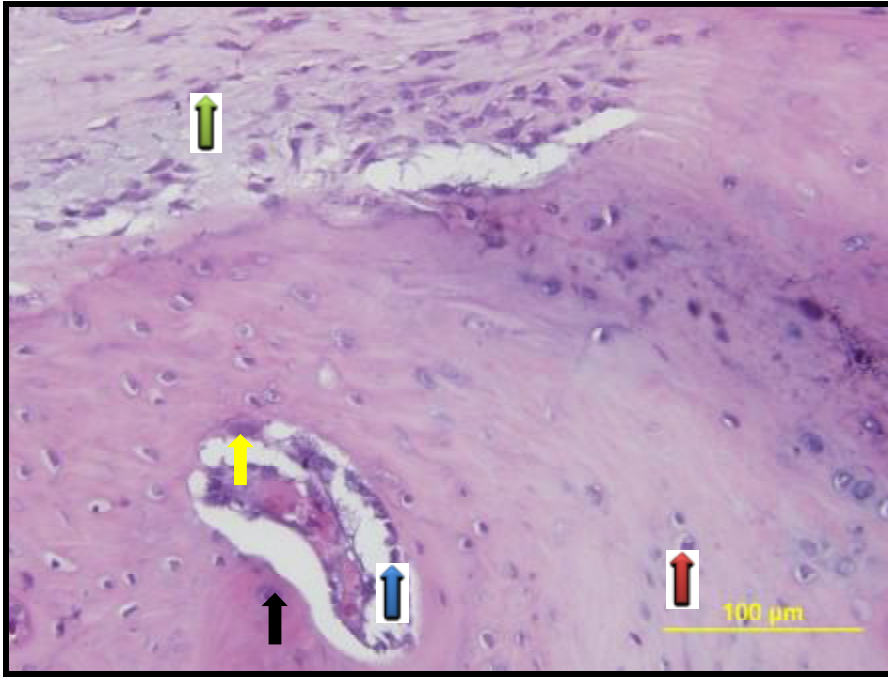


Resim 51: Grup II, kırmızı ok: GFP ışması yapan kemik iliği, mavi ok: ışma yapmayan trabeküller.

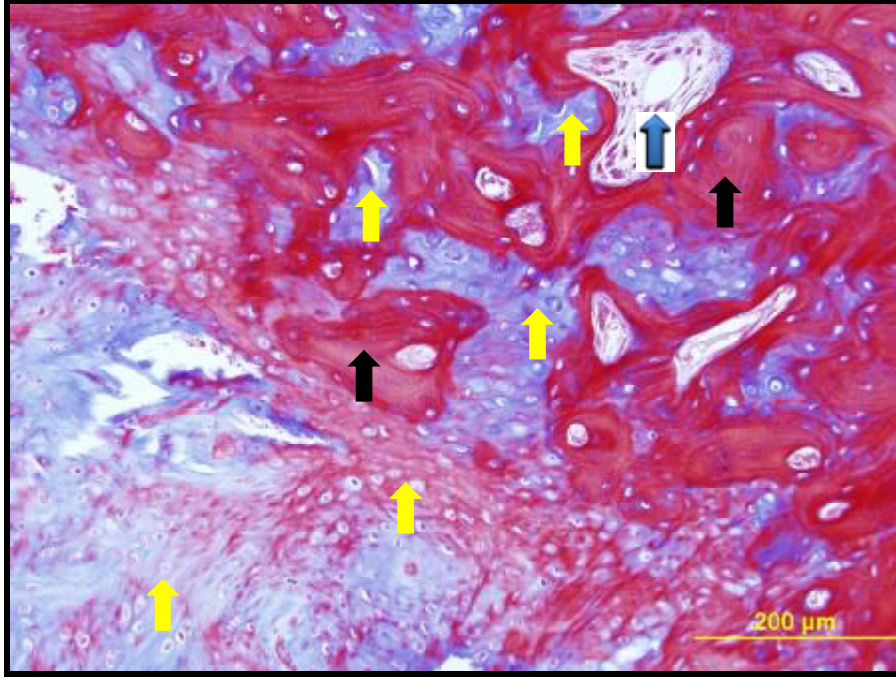
Grup III'e ait tibia kesitleri incelendiğinde, kırık hattından kemikleşmenin Grup I ve Grup II'ye oranla daha da ilerlediği bağ doku oranının çok azaldığı, trabeküler yapının arttığı ve düzenli olduğu, kallus dokusunun çoğunluğunun trabekül ve kırıldak dokudan oluştuğu gözlemlendi. GFP ile işaretli hücrelerin kallus dokusunda yerleştiği kemik, kırıldak ve bağ dokusuna katılarak iyileşme sürecini ilerlettiği ve hızlandırdığı gözlemlendi.(Resim 52-61)



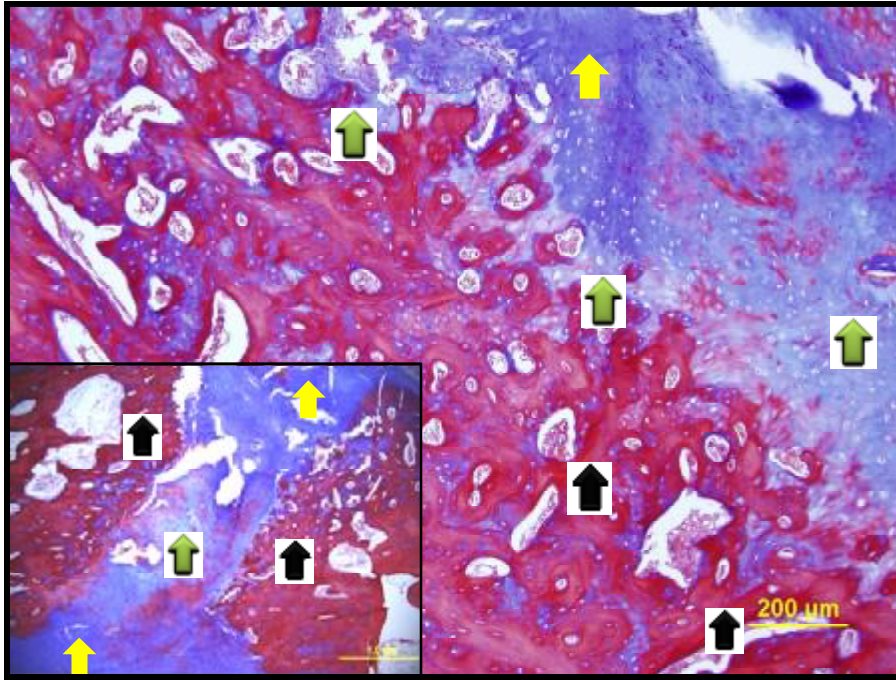
Resim 52: Grup III, siyah ok: yeni oluşan trabeküler kemik dokusu, kırmızı ok: kıkırdak dokusu, beyaz ok: hiperselüler bağ dokusu, mavi ok: kemik iliği. H&E



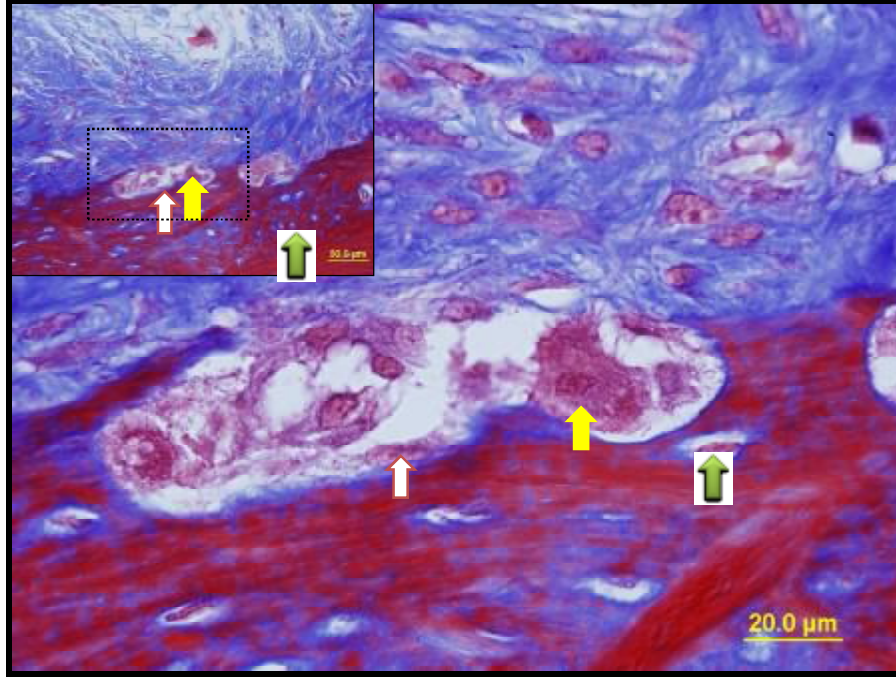
Resim 53: Grup III, siyah ok: osteosit, kırmızı ok: kondrosit, mavi ok: osteoblast, sarı ok: osteoklast, yeşil ok: fibroblast. H&E



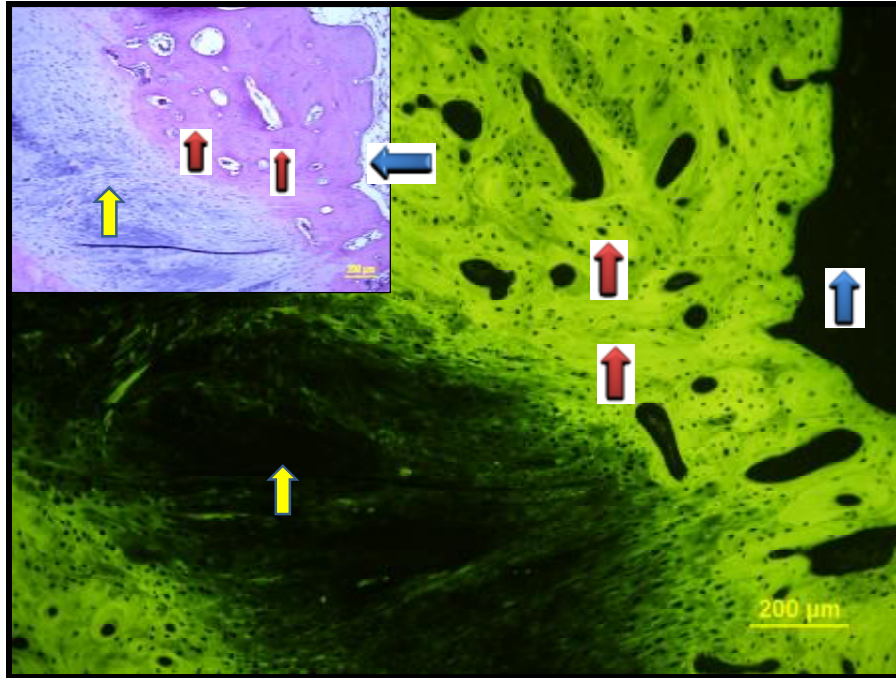
Resim 54: Grup III, sarı ok: kırıldak dokusu, siyah ok: kemik dokusu, mavi ok: kemik iliği. Masson Trikrom.



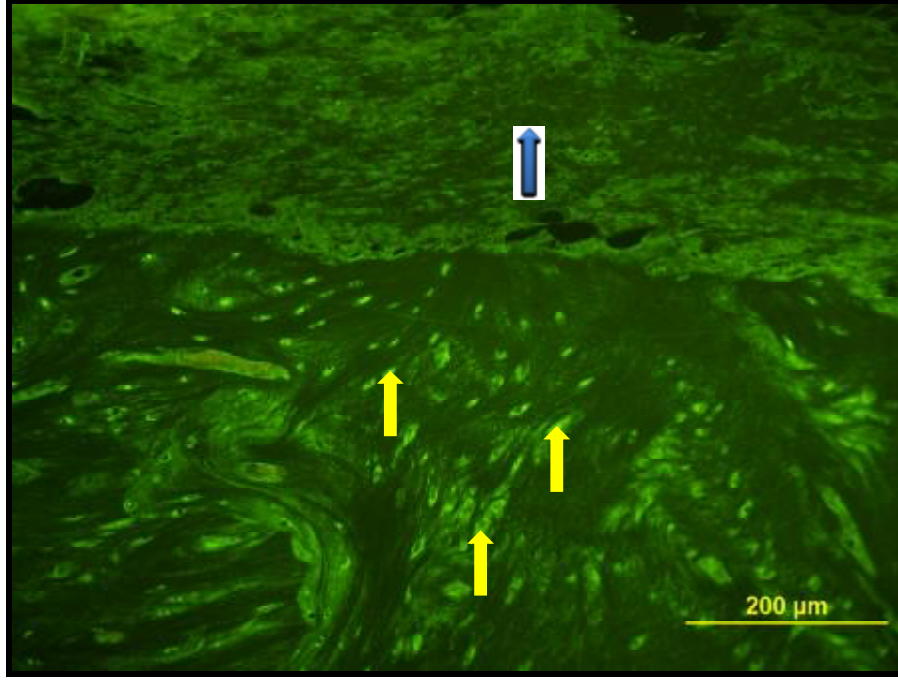
Resim 55: Grup III, siyah ok: yeni oluşan trabeküler kemik dokusu, yeşil ok: kırıldak geçişi, sarı ok: hiperselüler bağ dokusu. Masson Trikrom.



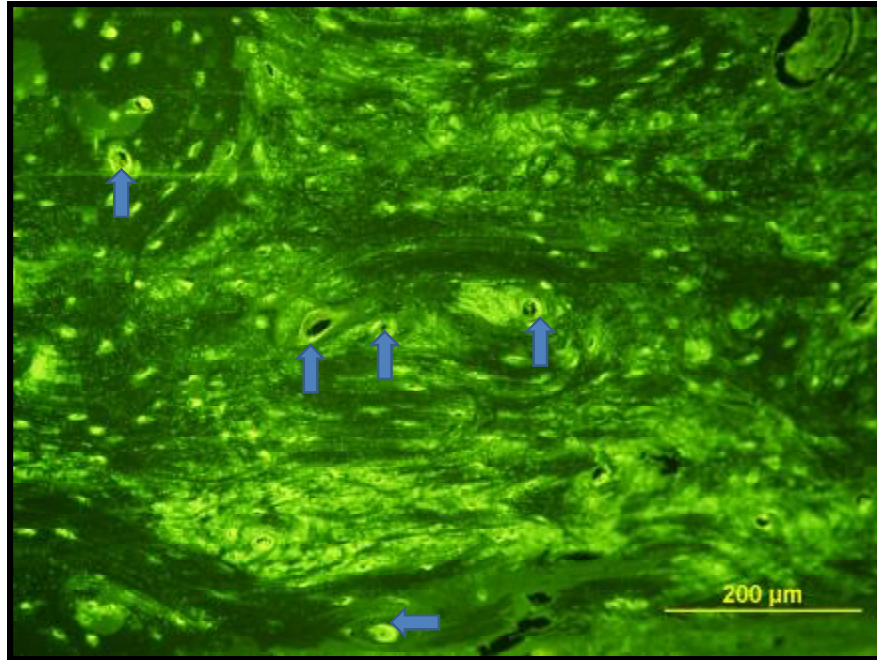
Resim 56: Grup III, sarı ok: osteoklast, yeşil ok: osteosit, beyaz ok: osteoblast. Masson Trikrom.



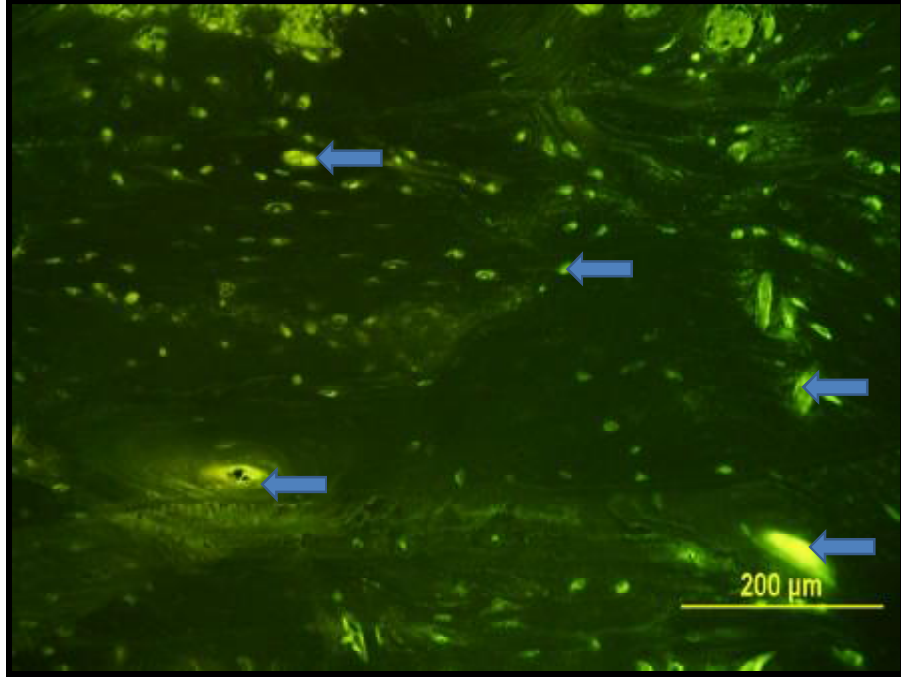
Resim 57: Grup III, aynı alandan alınan iki farklı görüntü. Kırmızı ok: GFP ışması yapan osteosit hücreleri, sarı ok: ışma yapmayan kondrosit hücreleri, mavi ok: ışma yapmayan kemik iliği hücreleri. Sol üst H&E



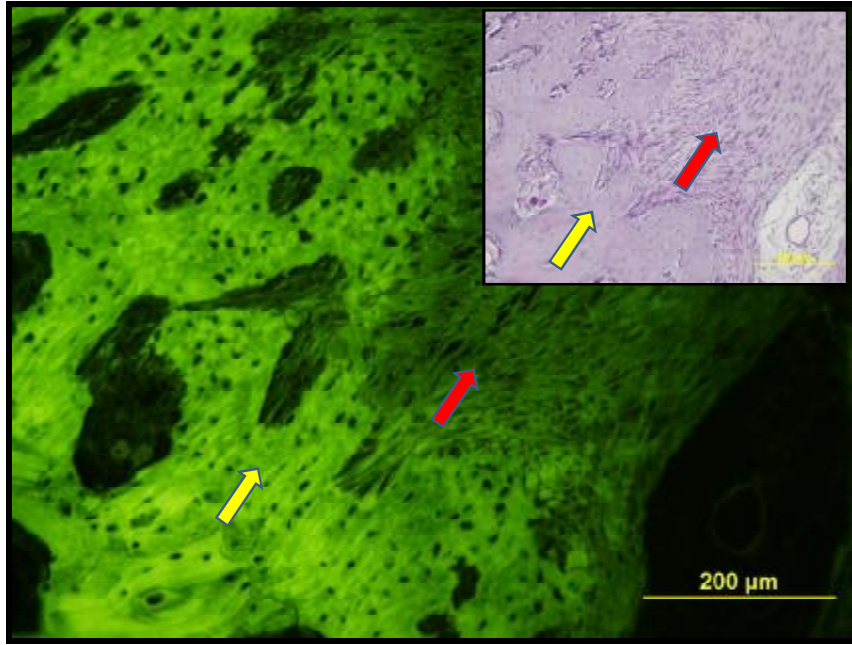
Resim 58: Grup III, sarı ok: GFP ile işaretlenmiş osteosit hücresi, mavi ok: ışımaya yapmayan fibroblast hücresi.



Resim 59: Grup III, GFP işaretlemesi: mavi ok ışımaya yapan osteosit hücreleri.



Resim 60: Grup III, GFP işaretleme: mavi ok ışık yapan osteosit hücreleri.



Resim 61: Grup III, diferansiye kök hücre transfer edilen grup: sarı ok: GFP ışığı yapan osteositler, kırmızı ok: GFP ışığı yapmayan fibroblast hücreleri. Sağ üst H&E

6.4.2 Histolojik Sayısal Değerlendirme:

Elde edilen preparatlarda yapılan histolojik değerlendirmede veriler ortalama \pm standart sapma olarak gösterildi. Grup I'nin mm^2 'deki osteosit sayısı ortalama $35 \pm 1,25$, Grup II de $43,4 \pm 0,64$ ve Grup III de $55,08 \pm 0,86$ idi. Grup I ile Grup II ve Grup III istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı artış saptandı. P değerleri sırasıyla $p=0,0001$ ve $p=0,0002$ idi. Bu artış kemikleşme oranının istatistiksel veriler ile paralel oranda arttığını göstermektedir.

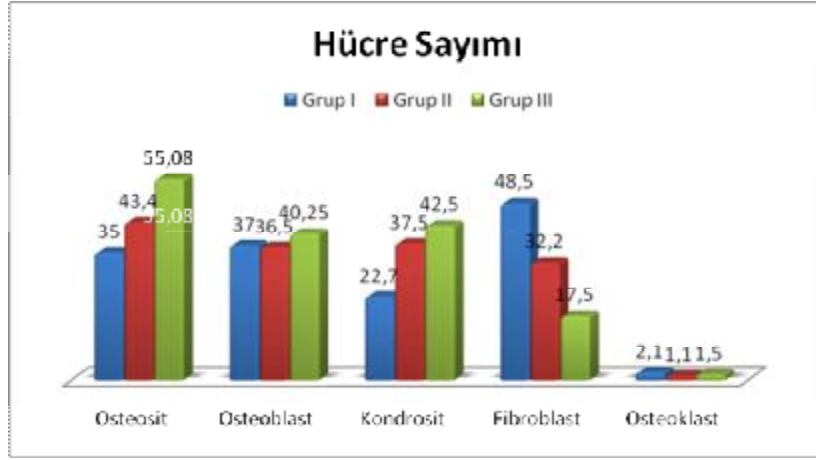
Osteoblastların ortalama değerlerinin karşılaştırılmasında Grup I $37 \pm 1,27$, Grup II $36,5 \pm 0,64$ ve Grup III $40,25 \pm 0,85$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I ile Grup II arasında anlamlı fark bulunmazken ($p=0,9$) Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi ($p=0,001$).

Kondrosit hücrelerinin ortalaması karşılaştırıldığında Grup I $22,7 \pm 0,6$, Grup II $37,55 \pm 1,44$ ve Grup III $42,5 \pm 0,89$ istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I ile Grup II ve Grup III arasında anlamlı bir artış gözlemlendi ($p=0,001$ ve $p=0,0002$).

Fibroblast hücrelerinin ortalama değerleri karşılaştırıldığında Grup I $48,5 \pm 0,99$, Grup II $32,2 \pm 2,81$ ve Grup III $17,5 \pm 0,95$ olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I'e oranla Grup II ve Grup III'te anlamlı derecede azalma saptandı ($p=0,0002$ ve $p=0,0009$).

Osteoklast hücrelerinin değerlendirmesinde Grup I $2,1 \pm 0,26$, Grup II $1,1 \pm 0,26$ ve Grup III $1,5 \pm 0,28$ olarak bulundu. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup II ve Grup III Grup I'e oranla anlamlı derecede azalma saptandı ($p=0,011$ ve $p=0,005$) (Şekil 50).

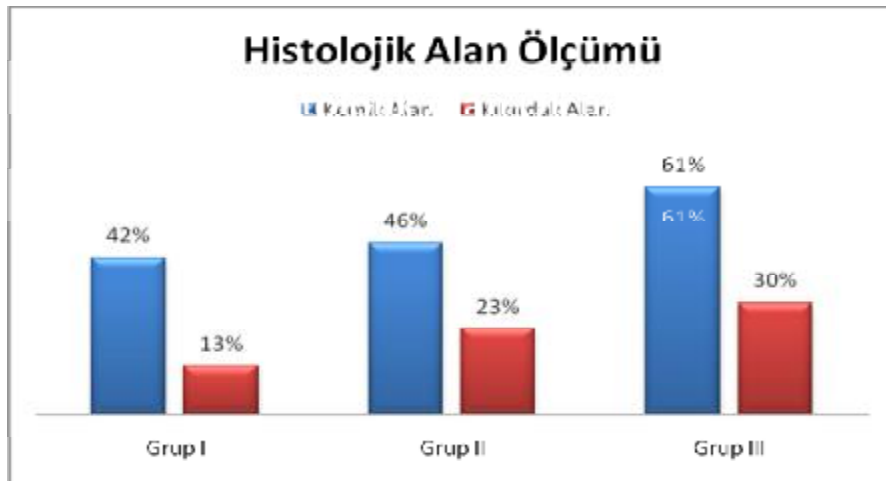
Hücre sayım analizleri de sonuç olarak gruplar arası iyileşmedeki evrenleme farkını açıklar niteliktedir.



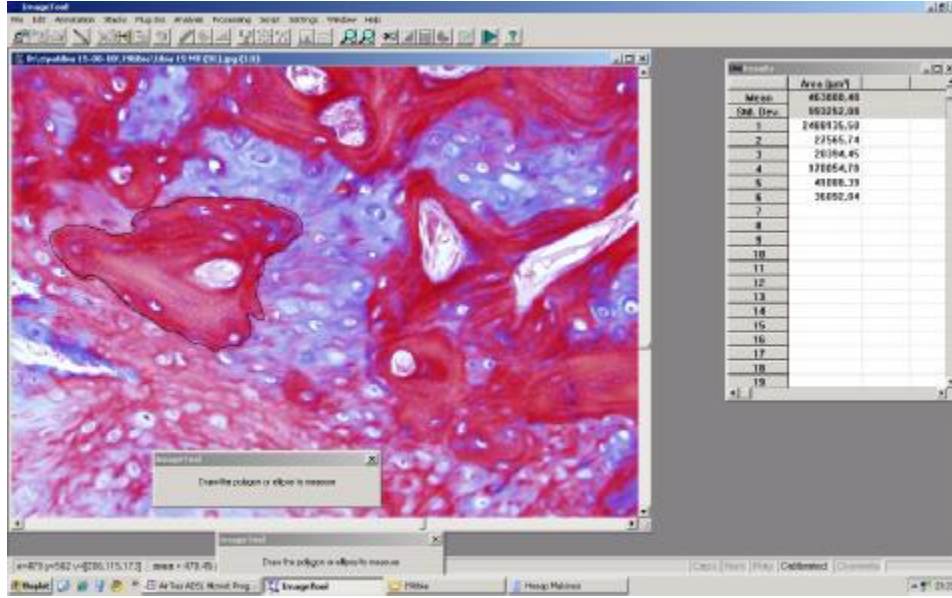
Şekil 50: Gruplar arası hücre sayımlarının karşılaştırılması

Kemik alanları incelendiğinde, Grup I $42,0 \pm 2,6$, Grup II $46,0 \pm 2,0$ ve Grup III $61 \pm 2,2$ olarak bulundu. Grup I ile Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu (Grup I-II $p=0,014$ M-W U: 5,500 , Grup I-III $p=0,002$, M-W U: 0,000). Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yine anlamlı fark olduğu görüldü ($p=0,002$, M-W U:0,000). (Şekil 51)

Kıkırdak alanlar incelendiğinde ise (Şekil 52), Grup I $13,0 \pm 2,1$, Grup II $23,0 \pm 2,6$ ve Grup III $30 \pm 1,7$ olarak bulundu. Grup I ile Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi (Grup I-II $p=0,002$ M-W U: 0,000 , Grup I-III $p=0,002$, M-W U: 0,000). Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yine anlamlı bir fark bulundu ($p=0,002$, M-W U:0,500).



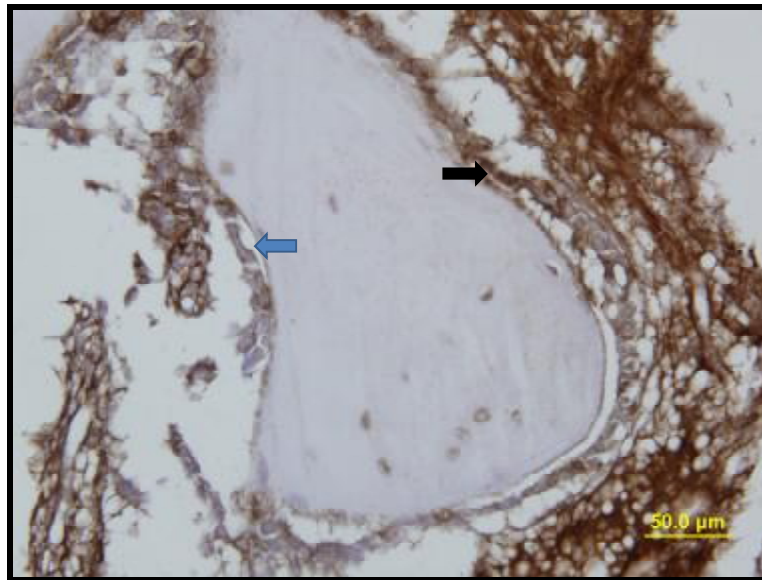
Şekil 51: Gruplar arası kemik-kıkırdak alan ölçümlerinin karşılaştırılması



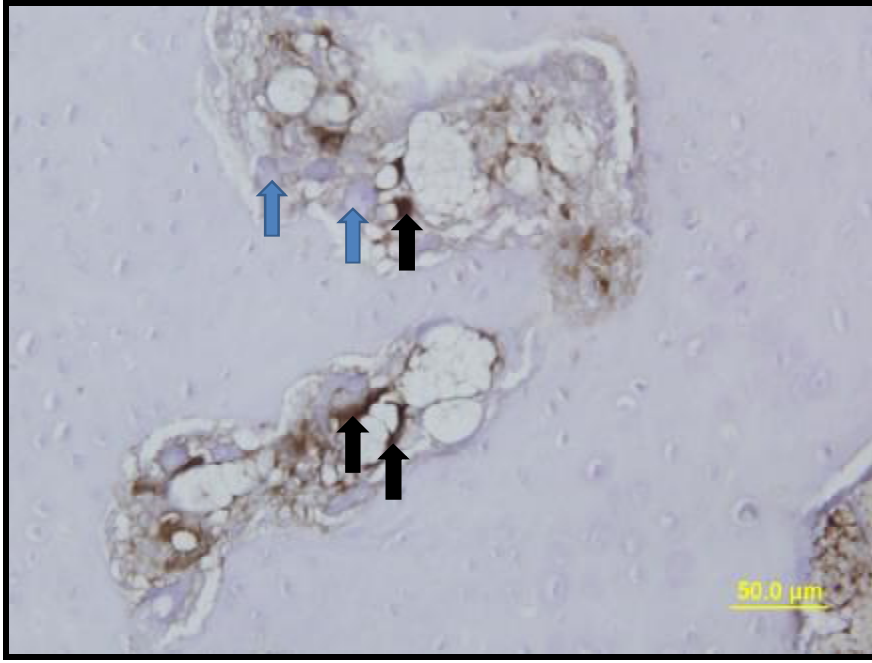
Şekil 52: Kemik-kıkırdak alan hesaplaması

6.4.3 İmmünohistokimyasal Değerlendirmeler

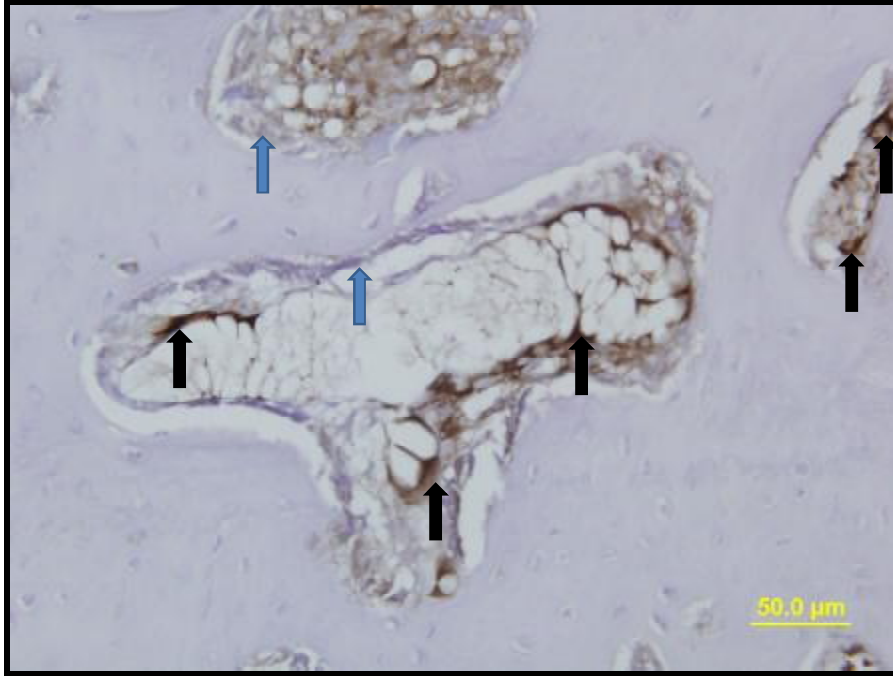
Alınan kesitlere yapılan immünohistokimyasal boyamalarda osteokalsin ve osteopontin sentezleyen osteoblastlar işaretlenerek gösterildi. Pozitif boyanan hücrelerin Grup I'e göre Grup II ve Grup III'te daha fazla miktarda olduğu gözlemlendi. Bu artış kemikleşme hızının Grup II ve Grup III'te daha hızlı oluşunu açıklar niteliktedir (Resim 62-67).



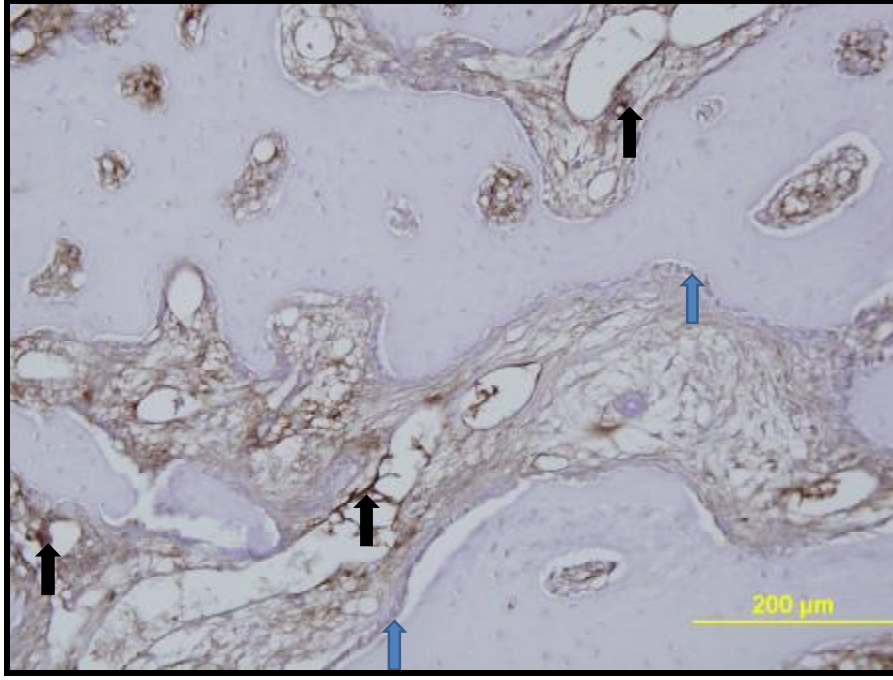
Resim 62: Grup I, siyah ok: osteokalsin pozitif hücre, mavi ok: osteokalsin negatif hücre.



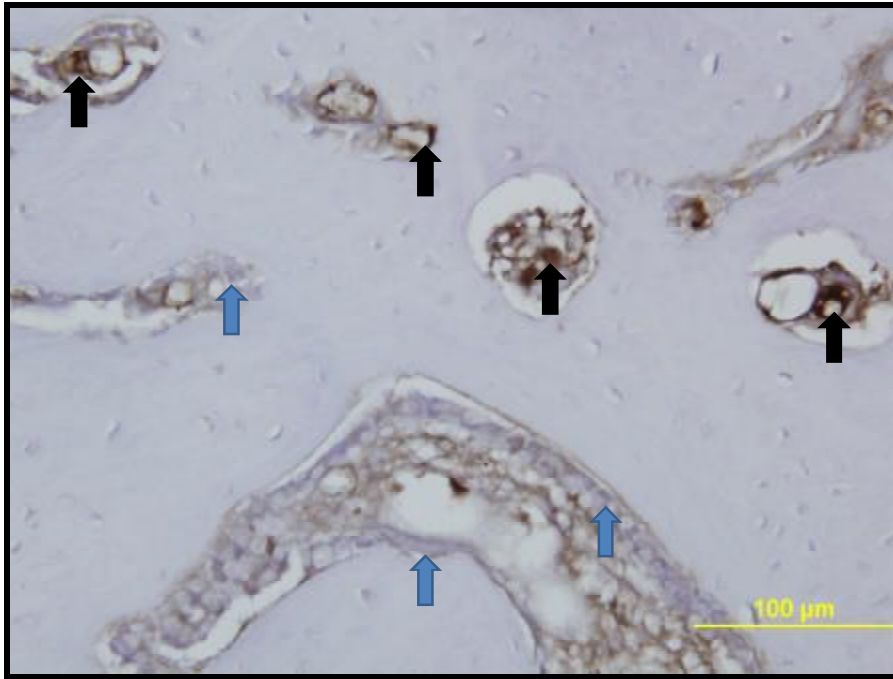
Resim 63: Grup II, siyah ok: Osteokalsin pozitif hücreler. Mavi ok: osteokalsin negatif hücreler.



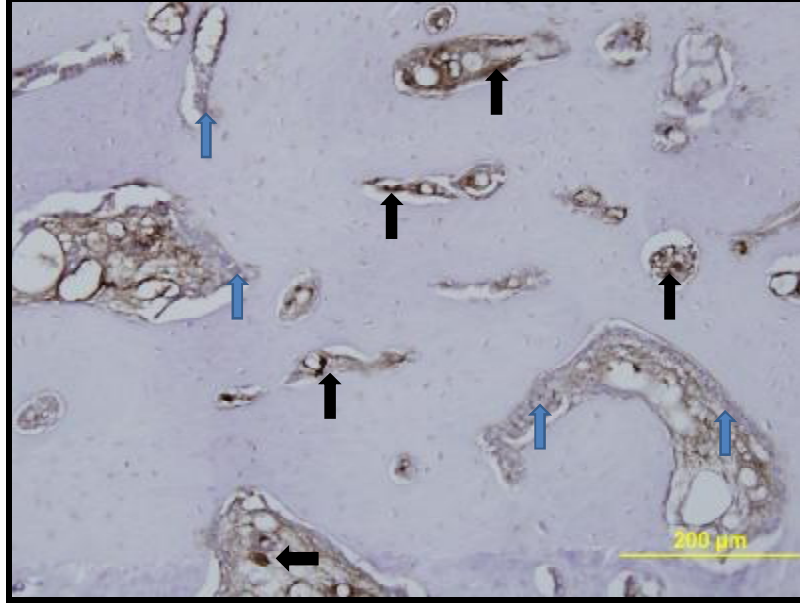
Resim 64: Grup III, siyah ok: osteokalsin pozitif hücreler, mavi ok: osteokalsin negatif hücreler.



Resim 65: Grup I, siyah ok: Osteopontin pozitif hücreler, mavi ok: osteopontin negatif hücreler.



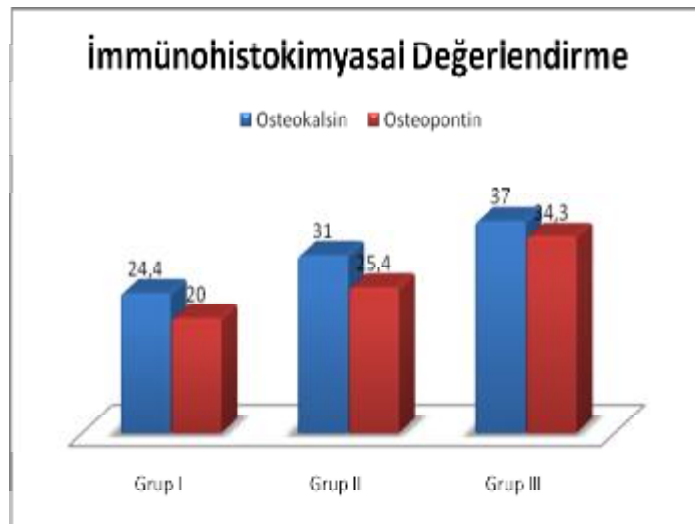
Resim 66: Grup II, siyah ok: Osteopontin pozitif hücreler. Mavi ok: osteopontin negatif hücreler.



Resim 67: Grup III, siyah ok: Osteopontin pozitif hücreler. Mavi ok: osteopontin negatif hücreler.

Elde edilen dokularda yapılan immünohistokimyasal boyamalarda kemikleşme için spesifik sayılabilecek osteokalsin pozitif boyanan hücreler sayıldığında Grup I'de $24,4 \pm 1,05$, Grup II'de $31 \pm 1,01$ ve Grup III'te $37 \pm 0,74$ olarak bulundu. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I e göre Grup II ve Grup III anlamlı oranda artığı gözlemlendi. ($p=0,0001$ ve $p=0,0002$)

Osteopontin pozitif hücreler karşılaştırıldığında Grup I $20 \pm 1,13$, Grup II $25,4 \pm 0,78$ ve Grup III $34,3 \pm 0,99$ olarak bulundu. Değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I e göre Grup II ve Grup III anlamlı oranda artığı gözlemlendi ($p=0,0001$ ve $p=0,0002$). (Şekil 52)



Şekil 53: İmmünohistokimyasal değerlerin karşılaştırılması

7.TARTIŞMA

Ateşli silah yaralanmaları, enfeksiyon, psödoartroz, travma ve kemik tümörlerinin geniş rezeksiyonları sonucunda oluşan kemik defektlerinin onarımı, yeni çözüm teknikleri aranan en önemli sorunların başında gelmektedir.⁹⁶ Grade III açık tibia fraktürleri başta olmak üzere enfekte olsun ya da olmasın tibia defektlerinin yeniden onarımı oldukça zordur. Enfekte kemik ve yumuşak doku debridmanı sonrası fiksasyon yapılması esastır.⁹⁸ Uygulanan çok seanslı cerrahi prosedürlerle tedavi genellikle yıllar alır ve sonuçlar çoğunlukla yüz güldürücü değildir.

Geniş kemik defektlerinin onarımında otojen kemik grefti ile onarım hala en sık kullanılan yöntemdir. Ancak otojen kemik dokunun elde edilebilirliği ve “viable” olarak kullanılacak kemik grefti dokusu sınırlı olmakta ve büyük kemik “gap”lerin kapatılmasına olanak vermemektedir.^{3,4,16,97} Ayrıca greftin alındığı donör alanlarda ağrı, skar, hipersensitivite ve parestezi oluşabilmektedir.^{17,18} Bununla birlikte geleneksel greftleme ve stabilizasyon tekniklerinde, yeterli stabilite sağlanamaması, kısalık oluşması veya kemik kaybı meydana gelmesi üstesinden gelinmesi gereken zorluklardır. Ayrıca alt ekstremitede özellikle tibiada alıcı ve verici kemik arasındaki çap uyumsuzluğu kemiklerin birleşme bölgesinde yoğun stres oluşturmakta bunun neticesi olarak da refraktürler ve psödoartrozlar oluşabilmektedir.

Kullanımı limitli olan ve morbidite oluşturan kemik grefti yerine kullanılabilir olan demineralize kemik allogreftlerinin ise osteoindüktif (kemik yapımını uyarma) ve osteokondüktif (kemik yüzeyine yapışma) özellikleri çok düşüktür. Bu düşük aktiviteyi arttırabilmek için greftlerin etrafının periost ile kaplanarak defektli alana verilmesi gibi yöntemler de denenmiştir.⁹⁷ Ancak bu yöntemlerin hem uygulaması zor hem de etkileri sınırlıdır. Ayrıca allogreftlerin kontamine ortamlarda kullanılamaması, greft rezorpsiyonu, kötü revaskülarizasyon ve enfeksiyon taşıma riski gibi istenmeyen özellikleri de vardır.¹⁰

1950’lerde Ilizarov’un öncülük ettiği çalışmalarda distraksiyon osteogenezin yeni kemik oluşumunu uyardığı gösterilmiş travma ya da tümör rezeksiyonu gibi kemik defektlerinin onarımında veya kemik uzatılmasında çok etkili bir teknik olduğu kanıtlanmıştır.^{10,52} Ilizarov tekniğinde distraksiyon osteogenez kemik grefti

gerektirmeden, tedavi sürecinde üzerine yük binmesini de sağlayarak deformitenin simultane düzeltilmesini ve yeni kemik oluşumunu sağlamaktadır.

Ilizarov tarafından tanımlanan “*Gerim-stres*” etkisinin biyolojik prensibi, sirküler eksternal fiksator ile kombine edildiğinde; metafiz ve diyafiz fraktürleri, geniş kemik defektleri, kozmetik ve fonksiyonel amaçlarla kemik kalınlaştırma, konjenital veya travmatik psödoartrozların tedavisi, ekstremitte uzatma, uzun kemik ve eklem deformitelerinin düzeltilmesi, eklem kontraktürlerinin perkütan eliminasyonu, osteomyelit kaviterlerinin doldurulması, amputasyon güdüklerinin uzatılması, mandibula hipoplazisi gibi bir çok hastalığın tedavisinde kullanılabilir.⁵³

Distraksiyon osteogenezi etkileyen faktörler iki grupta incelenmektedir. Birincisi osteotomi seviyesi, osteotomi tipi ve bekleme periyodunu içeren biyolojik faktörlerdir.^{59,143} Osteotomi seviyesi için ideal olarak belirtilen metafizer bölgenin, kan dolaşımının fazla, spongiyöz kemik doku açısından zengin ayrıca kemik uçları arasında temas yüzeyinin geniş olması nedeniyle distraksiyona daha iyi uyum sağladığı bildirilmektedir.^{97,144} Bizim çalışmamızda Ilizarov’un tavsiye ettiği şekliyle metafizer osteotomi yapmamamızın başlıca nedeni tavşan anatomisinin buna izin vermemesiydi. Distraktör proksimale gittikçe femur ve tibia arasındaki dar açı nedeniyle distraktörün barları ve telleri tavşana acı vermekte, hareketini kısıtlamakta ayrıca güçlü bacak hareketleriyle daha spongiyöz olan metafizer bölgede kırıklara neden olabilmektedir. Hayvanın acı duyması kas kontraktürlerine neden olabilmekte, bunun sonucunda angulasyonlar gelişebilmektedir. Tavşan deneyleri için uygun olmadığı gözlenen metafizer osteotomi köpek deneylerinde rahatlıkla kullanılmıştır.¹³⁴ Ayrıca Steen ve Fjeld’in yaptığı çalışmalarda radyografik olarak metafizer uzatmalarda erken kemikleşme ve daha fazla osteojenik potansiyele rağmen, biyomekanik olarak metafizer ve diyafizer uzatmalar arasında anlamlı bir farkın olmadığı belirtmektedir.¹⁴²

Ilizarov, distraksiyon aralığında yeterli kallus dokusu oluşumu elde etmek için uygun osteotomi tipi olarak kortikotomiye önermiştir.⁵² Kortikotomi sırasında medüller kanal tamamen korunmakta kanal çevresinden osteotomi yapılmaktadır. Her ne kadar Ilizarov kortikotomi diye adlandırdığı medüller dolaşımın korunduğu bu metodu tanımlamış ve sunmuş olsa da diğer cerrahlar ve araştırmacılar bu yöntemi

uygulamanın çok zor olduğu ve başarılı bir distraksiyon için dolaşıma katkısının ise çok fazla olmadığı konusunda fikir birliği etmişlerdir.^{10,59,96} Ilizarov ayrıca kortikotomi sırasında periost ve endost'un da mutlaka korunması gerektiğini bildirmiştir. Kojimoto ve arkadaşları periost'un, endost ve kemik iliğinden de daha önemli olduğunu, Delloye ve arkadaşları ise osteotomi ile kortikotomi arasında belirgin bir farkın olmadığını belirtmişlerdir.⁹⁷ Çalışmamızda periostun korunmasına maksimum dikkat edilerek düşük devirli elektrik motoruyla osteotomiler gerçekleştirildi. Kontrol grubundaki bir denekte distraktörde herhangi bir sorun olmamasına uygun oranda distraksiyon yapılmasına ve angulasyon olmamasına rağmen kemikleşme 3. haftadan sonra durdu ve 8.haftaya kadar hiç ilerlemedi. Bu durum bize bu denekteki olası bir periost hasarını düşündürdü.

Operasyondan sonra distraksiyona kadar geçen bekleme süresinde; dokuların yeniden yapılanması ve kemik uçlarında yeterli osteoblastik aktivitenin ortaya çıkması için 2 ila 14 gün arasında bir sürenin geçmesi gerektiği bildirilmektedir.^{44,145} Yaptığımız çalışmada distraksiyon hızımızın düşük ve distraksiyon süremizin uzun olması nedeniyle 7 günlük bekleme süresini uygun gördük

Distraksiyon osteogenez'i etkileyen diğer faktörler ise fiksasyon stabilitesi, distraksiyonun oranı ve frekansı şeklindeki mekanik faktörlerdir.^{53,143} Bu faktörler içinde fiksasyon stabilitesi oldukça önemlidir. Ilizarov iyi bir kemik iyileşmesi için çerçevenin stabilizasyonunun çok önemli olduğunu belirtmiştir. Sirküler eksternal fiksatör, düzgün uygulandığında tüm planlarda kemik fragmanlarını stabilize eder ancak osteogenez'i stimüle eden aksiyel mikro-hareketlere de izin verir.⁵³ Bazı araştırmacılar, fiksatörlerin biyomekanik analizleri sonucunda sirküler eksternal fiksatörlerin kemik uçlarını tüm planlarda stabilize ederken yeterli aksiyel mikro hareketlere izin vermesi yanında kemiği halkalara bağlayan ince tellerden dolayı kemik ve yumuşak doku hasarlarının az olduğu bildirilmektedir. Literatürde monolateral dinamik aksiyel fiksatörler (Orthofix) ile yapılan başarılı tavşan deneyi sonuçları olsa da⁴⁴ bizim gözlemlerimiz dinamik aksiyel fiksatörlerin, tavşanın ani ve güçlü bacak hareketleri neticesinde oluşan darbeyi soğurmada güçlük çektiği ve bu nedenle prematür fraktürlere ve angulasyonlara neden olabildiğidir.¹⁴⁶ Çoğu modern monolateral fiksatörler distraksiyon için yeterince stabil olsa da doğal yapıları gereği yükü ekzantrik olarak dağıtırlar ve bu da uzama segmentinde istenmeyen

angulasyonlara neden olabilir. Ilizarov halka eksternal fiksatöre geçirilmiş olan gerilimli tellerin özel bir biyolojik etkisi olduğundan da sıklıkla bahsetmiştir.⁵² Gerilimli teller neticesinde oluşan *gerim*'in kemik yapım elemanlarını uyardığı ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını belirtmiştir.

Ilizarov, sirküler eksternal distraktörlerin yetersiz stabilitesinde rejenera kemik oluşumunda az sayıda kırıkta adacığı, fokal hemorajik alanlar ile kemik dokusuna dönüşmeyen fibröz alanların, rijit stabilitesinde ise konsolidasyon gecikmesinin olacağını bildirmektedir.⁵³

Yaptığımız deneysel çalışmadan edindiğimiz bilgiler ışığında iyi bir fiksasyon için; K tellerinin kemiğin tam santralinden geçmesi gerektiğini, delikli vidaanın fiksasyon için çok önemli olduğunu, pin gevşemesi olmaması için bütün vida somun temas noktalarına pul yerleştirilmesinin gerektiğini anlamış bulunmaktayız. Yaptığımız ön çalışmada delikli olmayan vida kullanıldı, K teli gerilerek bu vidaanın baş kısmının altına sıkıştırıldı. Ancak bu sistemi uyguladığımız tüm deneklerde bir süre sonra pin gevşemesi meydana geldi. Deneyde kullandığımız delikli vida ile sadece yeterli fiksasyonu değil aynı zamanda distraksiyon osteogenezin temel biyolojik prensibi olan yeterli gerimi de rahatlıkla elde edebildik.

Yaptığımız ön çalışmadan kazandığımız diğer bir deneyim K tellerinin perkutan yerleştirilmesi esnasında tibianın tam ortasından geçilmesi gerekliliğiydi. Yarım santimetre çaplı tavşan tibiası distale doğru daha da incelmektedir. Kenarlarda, prematür fraktür oluşumunu engellemek amacıyla mutlaka 1.5 mm bırakmak gerektiği düşünülürse K telinin uygun pozisyonda geçmesi için 1.5-2 mm kadar bir alan kalmaktadır. Bu alanın daha periferinde yerleştirilmiş K telleri büyük oranda prematür fraktürlere neden olmaktadır. Bu şekilde K telini perkutan yerleştirmek oldukça güçtür ancak açık tekniğe göre daha hızlı iyileşme ve daha az enfeksiyon riski vardır.

Yine ön çalışmada kazanılan bir deneyim olarak distraktör halkalarının herbirinin üzerinde toplam 24 adet bar ve vida geçiş deliği tasarlandı. Böylece yerleştirilen K telinin tam karşısında bir delik olması sağlanarak telin hiç eğilmeden

fiksasyonu sağlandı ve K telinin eğikliğine bağlı oluşabilecek istenmeyen angülasyonların önüne geçildi.

Osteotomileri özellikle tibiofibular bileşkenin distalinden gerçekleştirdik. Bu mesafeden yapılan osteotomilerde fibula kesilmemekte böylece kırık fibulanın iyileşme prosesinin tibianın iyileşme alanına etki etmesinin önüne geçilmektedir.

Sirküler eksternal distraktöre ve DO'e ait komplikasyonlar; aksiyel dizilim bozukluğu, eklem lüksasyonu, kas kontraktürü, prematür konsolidasyon, gecikmiş konsolidasyon, eklem sertliği, subluksasyon, uzunluk kaybı, tel gevşemesi, kompartman sendromu, pin dibi enfeksiyonu, nörolojik ve vasküler yaralanmalar olarak bildirilmektedir.⁹⁶ Yaptığımız deneysel çalışmada, çalışmanın sonuçlarını olumsuz etkileyecek çok ciddi sorunlarla karşılaşmadık. Çalışmamızda bazı deneklerde 15-20 dereceyi aşmayan hafif angülasyonlar ile karşılaştık. Tüm deneklerde fiksasyon sonrası osteotomi uygulandığı ve osteotomi sonrası erken dönemde angülasyon görülmediği için bu hafif angülasyonların neden kaynaklanabileceğini araştırdık. Sonuçta, kemikleşmeye olumsuz etkisi olmadığı gözlenen bu hafif angülasyonların kas kontraktürlerine bağlı olabileceğine düşündük. Denekler distraksiyon sürecinde hergün kısa süreli de olsa (günlük distraksiyon işlemi) strese maruz kalmakta ve neticesinde kas spazmları gelişebilmektedir. Ayrıca distraktörün ağırlığının da (100 g) kas spazmı oluşumuna etkisi olabilmektedir. Bu süreç içerisinde hergün genel anestezi vermek ise deneğin viabilitesi açısından mümkün görünmektedir. Kas kontraktürlerinin etkisinin olamayacağı daha iyi bir stabilite üç ya da dört halkalı distraktörler ile sağlanabilir ancak bunun da beraberinde ek komplikasyonlar, uygulama güçlüğü ve iyileşme sorunları getirebileceğini düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızda üç bar, iki halka ve dört adet K teli'nden meydana gelen fiksasyon siteminde tüm deneklerde, tavşanın güçlü bacak hareketlerine karşı koyan yeterli fiksasyonun sağlandığı görüldü. Çalışma sırasında hiçbir denekte prematür kırık meydana gelmedi. Yaptığımız ön çalışmada elde ettiğimiz tecrübeler neticesinde uygulanan çift pullu, çift somunlu ve delikli vida sisteminde sadece bir denekte pin gevşemesi yaşandı. Bu çalışma sırasında tavşan tibiasına özel olarak

geliştirilen çuval pansuman nedeniyle literatürde sık rastlandığı söylenen pin dibi enfeksiyonuna hiç rastlanmadı.⁹⁶

Çalışmamızda kemikleri stabilize etmek için 1 mm kalınlığında K teli kullanıldı. Literatürde ince tel kullanılmasının yumuşak dokuya, periosteuma ve kemik iliği kan akımına zarar verme riskini en aza indirdiği söylenmektedir.⁵³ Daha ince tel kullanılabilir mi diye yaptığımız ön çalışmada kullandığımız 0.8 mm kalınlığındaki K teli ile deneğin direncine karşı koyamama ve neticesinde ciddi angulasyon sorunları yaşanması üzerine çalışmada 1 mm kalınlığındaki K telinin kullanılmasına karar verildi.

Günümüzde distraksiyon osteogenez için eksternal fiksatörler yanında yeterli fiksasyonu ve rijiditeyi sağlayabilen intramedüller rodlar da kullanılmaktadır. ilk olarak 1939 yılında Gerhard Küntscher intrameduller rod'u kullanmıştır. 2001 yılında D.Cole tarafından kinetik intrameduller distraktör geliştirilmiş ve başarılı sonuçlar alınmıştır. Ancak intrameduller rod maliyetinin çok yüksek olması, uygulanabilirliğinin zorluğu ve tecrübe gerektirmesi günümüzde kullanımını kısıtlayan etmenlerdir. Bu sebeple çalışmamızda intrameduller rod yerine klasik halka distraktör kullanmayı tercih ettik

Farklı günlük distraksiyon frekans ve oranlarının da hem kemik hem de yumuşak doku üzerine farklı etkileri vardır. Ilizarov'un çalışmaları hem oran hem de frekansın osteogenez üzerine önemli etkilerinin olduğunu göstermiştir.⁵³ Bir ekstremitte 6 saatte bir toplamda 0.5 mm olacak şekilde 0.125 mm uzatılırsa osteogenez çok hızlanmakta ve prematür konsolidasyona neden olmaktadır. Günde 2 mm.lik (0.5 mm X4) uzatma ise sadece osteogenezin geri kalmasına değil aynı zamanda çevre yumuşak dokularda da tahribata neden olmaktadır.⁵³ Ilizarov, otodistraktör ile 6 saatte bir 0.25 mmlik distraksiyonun en uygun olduğunu belirtmiştir. Çalışmamızda distraktörlere uygulanacak en uygun oran ve ritmi belirleyebilmek için literatüre baktığımızda tavşanlarda yapılan çalışmalarda 0.7 mm/gün hızla yapılan distraksiyonun hücre proliferasyonu ve kemik formasyonu için optimum hız olduğunun belirtilmiş olduğunu gördük. 1.3 mm/gün'den daha hızlı distraksiyonun ise kemik formasyonu ortamını engellediği gösterilmiştir.⁷⁷ Çalışmamızda bu çalışmayı baz alarak 0.7 mm/gün oranında 15 gün distraksiyon uygulandı ve arzu edilen 10 mm uzama sağlandı. Ayrıca yaptığımız deneysel

çalışmada uygulanan bu oranının tavşanlarda prematür kemikleşmeye yada kemik iyileşmesinde gecikmeye neden olmadığı gösterilmiştir. Günlük tek ritm ile distraksiyon yapılması Ilizarov'un önerdiği ideal distraksiyon ritminden farklı olsa da, deneklere daha az stres uygulaması ve dolayısıyla canlılıklarının uzun süre sağlanması için önemlidir. Ayrıca yapılan çalışmalarda ve bizim bu çalışmamızda bu oran ve ritm ile başarılı sonuçlar alındığı gösterilmiştir.

Ilizarov, yaptığı çalışmalar neticesinde distraksiyon osteogenezde tansiyon-stres efekti ile yalnızca intramembranöz kemikleşme gelişeceğini söylemiştir. Ancak literatüre bakıldığında, yapılan çalışmalarda, distraksiyon osteogenezde endokondral ve intramembranöz kemikleşmenin birlikte olduğu gösterilmiştir.^{99,126,136} Hatta DO'de kırık iyileşmesinde endokondral kemikleşmenin ağırlıklı olduğu gösterilmiştir.¹³⁶ Aynı çalışmada, distraksiyon osteogenezde intramembranöz ve endokondral kemikleşme yanında üçüncü bir kemikleşme şeklinin olduğu gösterilmiş ve "Kondroid kemik" olarak adlandırılmıştır. Yaptığımız çalışmada distraksiyon alanında her iki kemikleşmenin de mevcut olduğunu gördük. İntrameduller bölgede endokondral kemikleşme belirginken kortikal alanlarda ise intramembranöz kemikleşme daha ön plandaydı. Her iki kemikleşmenin birarada olmasının nedenleri araştırılmış, uygulanan oran ve ritmin buna etkisi olabileceği düşünülmüştür. Distraksiyon osteogenezde düşük distraksiyon oranlarının (0.5-1.0 mm/gün) intramembranöz ossifikasyona neden olacağını söyleyen çalışmalar¹²⁶ yanında, değişik oranların karşılaştırıldığı bazı çalışmalarda oranın bu duruma etkisi olmadığı söylenmektedir.⁹⁹

Ilizarov, yeni kemik oluşumunu açıklarken iki önemli faktöre inanmıştır; iyileşme bölgesindeki kan dolaşımı ve "gap" etrafındaki eşsiz mekanik çevre. Kan dolaşımının korunması periostun korunmasıyla sağlanır. Distraksiyon sırasında oluşan fiziksel güçler yeni kemik oluşumunun uyarılmasında oldukça önemli etkiye sahiptir. Distraksiyon sürecinde iyileşme, gerim güçlerinin kemik rejenerasyonunun stimülasyonuna önderlik ettiği oldukça dinamik bir hücrel prostestir. Bu süreç içerisinde mekanotransdüksiyon denilen biyofiziksel güçlerin hücrel cevaba dönüşümü gözlenir.¹³⁸ Bu iki faktör şüphesiz DO'in başarısında çok önemlidir ancak progenitör hücreler de yeni kemik oluşumunda kritik rol oynamaktadır. Bir şekilde kırık bölgesine gelen progenitör hücreler yeni kemik formasyonunu sağlayacak osteojenik prekürsörlere farklılaşmaktadırlar.¹⁰ Bu bilgi neticesinde osteoblast

diferansiyasyonunda ve kemik formasyonunda önemli rol oynayan *bone morphogenic protein* (BMP)'ler ile birçok deneysel çalışmalar yapılmıştır.¹²⁸ BMP'ler TGF- β ailesi üyesidir, günümüzde onbeş çeşit BMP tanımlanmış olup BMP-2 osteoindüktif özelliği en fazla olandır. Yapılan çalışmalar; BMP'lerin birçok doku ve organın oluşumunda erken morfogenez sırasında olan epitelial mezenkimal etkileşimlerde morfogenerler olarak rol oynadıklarını göstermiştir.¹⁴⁷

BMP-2'nin gelişmekte olan diş jermelerinde, çene kemiğinde, çizgili ve düz kaslarda, spinal kord, nazal, trakeal ve özefageal epitelde lokalize olduğu yapılan çalışmalarda belirlenmiştir.¹²⁸ BMP'nin osteojenik etkisi direkt olarak olgun olmayan, primitif hücreler üzerinedir. Olgun osteoblastların BMP'ye cevap verme yeteneğini kaybettikleri tespit edilmiştir.¹⁴⁸ Ancak şu da bir gerçektir ki BMP etkisiyle kemik oluşumu mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır.¹⁰ Ayrıca yapılan bu çalışmaların en önemli eksikliği kesin olarak yeni oluşan kemiğe BMP'nin etkisinin histolojik olarak gösterilmesinin mümkün olmamasıdır.

Distraksiyon osteogenez tekniğinde bölünmüş kemik fragmanları arasında oluşan tamir kallusuna dereceli traksiyon uygulanmakta ve bu traksiyon kallus üzerinde stress oluşturarak yeni kemik formasyonunu stimüle etmektedir.^{1,10,29-32} Kemik fragmanları arasındaki "gap" daha sonra kemik dokuya diferansiye olacak olan pluripotansiyel hücreler ile dolmakta ve matür tubuler yapı tekrar inşa edilmektedir.¹⁰ Kemiğe uygulanan distraksiyon kuvvetleri çevre yumuşak dokuda da gerilme yaratmakta ve deri, fasya, kan damarları, sinir, kas, ligament, kıkırdak ve periostta da aktif histogenezis oluşarak adaptif değişiklikler olmaktadır.^{10,28}

Distraksiyon osteogenezde önemli bir diğer faktör, fibrokartilaj dokunun osteojenik dokuya metaplazisidir. Kemik iliği ve fibrokartilaj dokuların içinde bulunan mezenkimal hücreler, osteoblast ve osteosit haline dönüşürler. Böylece fibröz doku, kemik dokuya dönüşmeye başlar. Bir başka deyişle distraksiyon osteogenez de *invivo* osteojenik diferansiyasyon işlemidir.⁷⁶

Distraksiyon osteogenez, eşsiz iyileşme mekanizması ile kemik onarımında hala yeri doldurulamaz bir öneme sahip olsa da, uzun konsolidasyon süresi ve bu uzun süre içerisinde (her bir santimetre uzama için yaklaşık 1-2 ay)^{24,122} oluşabilecek

re-fraktürler, pin gevşemesi, kallus çöküşü, uzama kaybı, malunion, nonunion, enfeksiyon gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelme riski de mevcuttur.^{11,12,14,24,122} Bu nedenle konsolidasyon sürecini ve dolayısıyla kemik oluşumunu hızlandırmak ve kemik formasyonunu arttırmak amacıyla literatürde birçok çalışmaya rastlanmaktadır. Bu çalışmaların bazıları; mekanik kompresyon,^{149,150} hiperbarik oksijen,¹⁵¹ kimyasal stimülasyon,¹⁵¹ elektrik ve elektromanyetik stimülasyon, kontrollü mekanik stimülasyon,¹²² distrikte kallusa sitokinlerin enjeksiyonu ve çeşitli büyüme faktörleri kullanılarak yapılan çalışmalar çoğunluktadır.^{22-25,122-124} Literatürde büyüme faktörleri (PG, endojen FGF, TGF β , BMP) ile unilateral eksternal fiksatorler kullanılarak tek enjeksiyon ile yapılan çalışmalar oldukça fazladır. Bu çalışmaların bazılarında (özellikle mezenkimal hücreler üzerine mitojen olan FGF-2 ile yapılan çalışmalarda) da istatistiki olarak başarılı sonuçlar alınmıştır.¹²³ Ancak unutulmamalıdır ki büyüme faktörleri verilerek mevcut ortamda osteoblast sentezinin uyarılması çalışılmaktadır. Tek bir enjeksiyon ile yarı ömürleri kısa olan bu büyüme faktörlerinin etkinliği oldukça kısıtlanmaktadır. Büyüme faktörlerinin sürekli verilebilmesi için ozmotik pompalı sistemler de kullanılmış ve kısmi başarılı sonuçlar alınmıştır.¹⁴⁶

Ancak bu faktörlerin yarı ömürlerinin çok kısa ve etkinliklerinin de az oluşu nedeniyle araştırmacılar kemik iyileşmesine doğrudan etki edebilecek çalışmalar üzerine yoğunlaşmışlardır. Osteotomi hattında oluşan 'gap' in pluripotent hücreler ile dolması ve ardından kemikleşme gelişmesini gözönünde bulundurarak osteotomi alanına dışarıdan pluripotent kök hücre verilmesinin süreci hızlandırmak açısından faydalı olabileceği düşüncesiyle¹⁰ kök hücre çalışmalarına yönelmişlerdir.²⁶ Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ile distraksiyon osteogenez çalışmaları yapılmıştır.^{13,26,27}

Literatürde, başarılı sonuçları olduğu bildirilen kemik iliği kökenli kök hücreler ile birçok distraksiyon osteogenez çalışmaları mevcuttur.^{10,122} Klinik uygulanabilirliği düşünüldüğünde kemik iliği elde etmek zahmetli ve elde edilen hücreler sayı olarak yetersizdir. Bu yetersiz olan hücrelerin sayılarının artırılması için daha uzun süre pasajlanmaları gerekmektedir. Bu nedenle yeterli kök hücre elde edilme süresi uzamaktadır. Ayrıca literatürdeki çalışmalar göstermektedir ki üç pasajdan sonra hücrelerin maruz kaldıkları stres artmakta ve hücrelerin kanserleşme eğilimleri

artmaktadır. Adipoz dokudan yüksek miktarlarda elde edilebilecek hücreler sayesinde daha kısa pasaj süreleri ile daha fazla sayıda hücre elde edilebilmektedir. Böylelikle daha az strese maruz kalmış ve bu nedenle daha stabil hücreler elde edilebilecek bu tür kararlı hücrelerin klinik kullanım imkanları daha yüksek olabilecektir.

İnsanoğlunun kök hücreler ile tanışıklığı 1960'lı yıllara kadar uzanmaktadır. O yıllarda kemik iliğimizde bulunan bir grup hücrenin kan sistemini oluşturan hücreleri yaptığının belirlenmesiyle, "kök hücre" terimi tıp terminolojisine girmiştir.⁵⁷ Ancak, şimdiki bilgilerimize göre o zamanlarda yapılan tanımlama pek doğru görünmüyor. Çünkü, bu hücreler üzerinde araştırmalar yoğunlaştırıldığında, bu gün için "kök hücre olabilme kriterleri" olarak adlandırdığımız bir çok özellik daha keşfedildi. Bunlardan ilki, bu hücreler laboratuvar koşullarında uygun uyaranlara maruz kaldıklarında yalnızca kan sistemini oluşturan hücrelere farklılaşmıyorlardı. Kemik, kıkırdak, sinir, kas, deri ve karaciğer hücresi gibi daha birçok farklı hücre çeşidini oluşturabildikleri tespit edildi. Bu hücrelerin bu özelliği "plastisite" ya da "transdifferensiasyon" olarak isimlendirildi.

İkinci olarak, bu hücreler vücudumuzda bulunan diğer hücrelerden (karaciğer ve böbrek hücreleri gibi) farklı olarak uzun dönemler boyunca kendilerini yenilemek amacıyla bölünebilmekteydiler. Oysa vücudumuzdaki diğer hücre çeşitleri (somatik hücreler), örneğin bir karaciğer hücresi bölündüğü zaman yine bir karaciğer hücresi oluşturur ve bölünebilme kapasitesi sınırlıdır. Kök hücreler ise, birden fazla çeşit hücre tipine farklılaşabilmekte ve fazla sayıda bölünebilmektedir. Başlıca, bu iki özellik nedeniyle kök hücreler diğer vücut hücrelerimizden farklıdır. Sonraki yıllarda gerçekleştirilen araştırmalar, kök hücre olarak tanımlanan bu tip hücrelerin yalnızca kemik iliğimizde ve periferik kanımızda değil, bir çok doku ve organımızda da var olduğunu gösterdi. Aslında, erişkin bir kök hücresi, bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup, bu hücre kendisini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerinin yaşayan organizmadaki esas görevleri, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. 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. Bu gün için tedavisi mümkün görünmeyen hastalıkların birçoğu, yaşam için vazgeçilmez olan bazı hücre, doku ve organların, bir daha asla normal yapı ve işlevlerine döndürülmeyecek şekilde hasarlanmış olması sonucudur. Bir hedef doku veya organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesiyle bu amaca ulaşılabilir. Kök hücreler, bu amaca hizmet edebilecek yani hücre tabanlı tedavide kullanılacak başlıca unsur olarak görünmektedir

Kök hücreler şu özelliklere sahiptir: 1) Kendi kendini yenileme kapasitesi 2) uzun ömürlülük 3) çok yönlü olabilme potansiyeli. Embriyonel ve kemik iliği kökenli erişkin kök hücrelerin multipotansiyel olabilme yetenekleri geniş çapta incelenmiş ve karakterize edilmiştir. İlk olarak 25 yıl önce fare embriyonik kök hücreleri laboratuvar ortamında yetiştirilebilmiştir.⁸⁹ Fare embriyonik kök hücrelerinin muazzam potansiyeli neticesinde insan embriyonik kök hücreleri ile çalışmalar yapılmaya başlanmış ancak muazzam potansiyellerinin yanında insan embriyonik kök hücre kullanımını sınırlayan birçok etik ve politik hususlar vardır.⁵⁴ Bu nedenlerle birkaç merkez dışında tüm dünyada insan embriyonik kök hücre çalışmaları durdurulmuştur bunun neticesinde erişkin kök hücreler ile ilgili deneysel ve klinik çalışmalar artmıştır.

Multipotansiyel kök hücreler erişkin dokularda da vardır ancak erişkin kök hücreleri tanımlayacak spesifik ve universal bir moleküler marker'ın olmayışı nedeniyle dokuda varlıklarını gösterebilmek için fonksiyonel testler gereklidir.⁸⁹ Dokuya spesifik kök hücreler beyin, barsak, akciğer, karaciğer, adipoz doku ve kemik iliği gibi spesifik organlardan elde edilmektedirler.⁵¹ Dolayısıyla kemik iliği kökenli erişkin kök hücreler embriyonik kök hücrelere alternatif bir kaynak olarak sunulmuştur.⁸⁹

İlk olarak osteoprogenitör hücre kaynağı olarak tanımlanan MKH'lerin invitro ve invivo koşullarda adipositlere, kondrositlere, osteoblastlara ve miyoblastlara dönüşebilmesi, bu hücreleri mezodermal defekt onarımlarında ve birçok hastalığın tedavisinde oldukça fazla umut veren bir aday yapmıştır. Ancak, MKH'lerin klinik kullanımları beraberinde bazı sorunları da getirmiştir bunlar; ağrı, morbidite ve elde edilen hücre sayısının oldukça düşük olmasıdır.^{35,89} İşte bu negatif

durumlar bir çok araştırıcıyı kemik iliği kökenli MKH'ler için alternatif kaynak araştırma çalışmalarına yönlendirmiştir.

Mezenkimal kök hücreler (MKH), başta konnektif doku kökenli hücreleri (kemik, kıkırdak, yağ, tendon, stroma) olmak üzere birçok farklı doku hücresine (kalp, karaciğer, pankreas, sinir sistemi) farklılaşarak veya çözüdür faktörler sentezleyerek doku, organ rejenerasyonuna katkıda bulunması, in vitro ortamda kök hücre özelliklerini koruyarak kolaylıkla çoğaltılabilmesi, hematopoezi destekleyerek kemik iliği-kök hücre grefti reddini önlemesi, immünosupresif özellikleri nedeniyle, greft versus host hastalığının (GVHH) önlenmesi ve tedavisinde, otoimmün hastalık tedavisi, ayrıca gen aktarımı kolaylığı nedeniyle başta kalıtsal hastalıklar olmak üzere birçok klinik alanda uygulama potansiyeline sahiptir.¹⁰⁵ Bu nedenle hekimler ve temel bilimciler arasında büyük ilgi uyandırmaktadır. Ayrıca, hücrelerin kullanımında HLA doku uyumu gerektirmemesi nedeniyle biyoteknoloji firmaları tarafından genel kullanıma açık universal MKH verici havuzları oluşturulmaktadır. Mezenkimal kök hücreler, yukarıda bahsedilen biyolojik özellikleri nedeniyle hasarlı organ tamiri için önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu hücrelerin yaygın kullanımını zorlaştıran en önemli faktör, dokularda çok az sayıda olmaları nedeniyle klinik kullanım için in vitro olarak çoğaltılmaları gereğidir. Araştırma amaçlı çoğaltılmaları kolaylıkla mümkün olduğu halde, klinik uygulamaya uygun MKH geliştirilmesi, uluslararası standartta hücresel tedavi altyapısını gerektirmesi nedeniyle bugün için oldukça iddialı bir tedavi yaklaşımıdır.

Mezenkimal kök hücrelerin, elde edildikleri dokularda az sayıda olmaları nedeniyle in vitro hücre kültür ortamında çoğaltılmalarının gerekliliği, bu kök hücrelerin temel bilim araştırmalarında ve klinik kullanımdaki en önemli dezavantajıdır. Bu durum hücrelerin kültür ortamında pasajlanmaları sonucu maruz kaldıkları çeşitli uyarılar ve faktörlerin etkisiyle fenotipik, immünolojik ve diğer biyolojik özelliklerinde farklılıklara yol açmaktadır.¹¹² Mezenkimal kök hücreler ile yapılan temel araştırmaların tamamına yakın bir kısmında in vitro kültür ortamında geliştirilen hücreler kullanıldığı için, detaylı çalışılmış da olsa, bu hücrelerin tanımlanmış özelliklerinin in vivo özelliklerini yansıtmaktan oldukça uzak olduğu bilinmektedir. Bu durum özellikle klinik uygulamalar için dezavantaj oluşturmaktadır. Kültür ortamında pasajlanarak çoğaltılmaya bağlı hücre yaşlanması, sitogenetik

bozukluk ve düşük de olsa malign transformasyon riski bulunmaktadır. Bu nedenle yüksek sayıda hücre ile işe başlamak yeterli kök hücre elde edilmesi için gereken pasaj sayısını azaltacak ve pasaj sayısının azalması da beraberinde getirdiği olumsuzlukları en aza indirecektir. Yağ dokusundan kolaylıkla elde edilebilen yüksek miktarda adipoz doku ile 2-3 pasajda oldukça yüksek sayıda kök hücre elde edilebilmektedir.

Kollajenaz ile sindirilen ve santrifüj edilen yağ dokusundan süpernatant kısmının ayrılmasıyla elde edilen pellet stromal vasküler fraksiyon (SVF)'dir. SVF içerisinde kök hücreler olduğu kadar kan hücreleri, fibroblastlar, perisitler, ve endotel hücreleri de içeren heterojen bir hücre popülasyonudur. Kültür kabına ekilen pellet içerisinde plastik kaba yapışan AKKH'lerden günlük yıkamalarla yapışmayan kısımları ayrılarak AKKH yoğunluğu artırılır.

Kemik iliği kökenli kök hücreler ile karşılaştırıldığında AKKH'ler çok fazla sayıda, oldukça kolay ve düşük donör saha morbiditesi ile elde edilebilmektedirler. Bu özellikleri AKKH'leri doku mühendisliğinde, kemik iliği kökenli kök hücreler yerine kullanılabilmesini sağlamıştır.¹¹⁹

Günümüzde artmış obezite insidansı nedeniyle, subkutan yağ dokusu oldukça bol ve erişimi de kolaydır. Her yıl binlerce liposuction operasyonu yapılmakta, elde edilen aspirat genellikle çöpe atılmaktadır. Adipoz doku kökenli kök hücreler kullanılarak yapılan başarılı deneysel ve klinik çalışmaların sonuçları ve bu hücrelerin kullanımlarının standardize edilmesiyle, yüksek miktarda ve kolay elde edilebilen bu hücreler klinik birçok hastalığın tedavisinde ve defekt onarımlarında kullanılabilir.⁵¹

Ancak, bu hücrelerin isimlendirilmesinde bile standardizasyon henüz sağlanmaya çalışılmaktadır. Adipoz dokunun kollejenaz ile sindirilmesinin ardından izole edilen ve plastik kaba yapışan kısmını tanımlamak için çok çeşitli isimler kullanılmıştır. Bunlar; *Adipose derived stem/stromal cells* (ASCs), *adipose derived adult stem cells* (ADAS), *adipose derived adult stromal cells*, *adipose derived stromal cells* (ADSC), *adipose stromal cells* (ASC), *adipose mesenchymal stem cells* (ADMSC), *lipoblast*, *pericyte*, *pre-adipocyte*, *processed lipoaspirate* (PLA) hücreleri.

Bu karmaşaya bir standart getirilmesi amacıyla *International Fat Applied Technology Society* ortak bir karara varmış ve bu plastiğe yapışan multipotent hücre popülasyonununun *Adipose-Derived Stem Cells (ASCs)* olarak adlandırılmasına karar vermiştir. Biz de yaptığımız çalışmada, bu standardizasyona uyarak bu hücreleri “Adipoz Kökenli Kök Hücre” olarak adlandırdık.

Adipoz doku da kemik iliği gibi mezenkimal kökenlidir ve kolayca izole edilebilen destek stroma içerir. Bu nedenle adipoz doku bir çok alanda başarılması zor olan hedeflere ulaşılmasını sağlayabilir.^{35,89} Zuk 2001 yılında insan lipoaspiratından kök hücre popülasyonu elde etmiştir. Bu hücre topluluğuna işlem görmüş lipoaspirat “ *processed lipoaspirate*” (PLA) denildi. Bu hücreler adipoz dokudan oldukça fazla sayıda elde edilebilmişti ve kültürde stabil büyüme ve proliferasyon kinetiği göstermişti. Ayrıca PLA hücreleri aynı MKH’ler gibi invitro ortamda uygun, özel ve ispatlanmış faktörler ile muamele edildiğinde osteojenik, adipojenik, miyojenik ve kondrojenik değişim göstermekteydi.⁸⁹ Bu çok yönlü değişim kapasitesi Zuk ve arkadaşlarını MKH’ler ile kıyaslanabilecek sayıda multipotent kök hücrenin adipoz dokudan elde edilebileceği yönünde düşündürmüştür.

PLA hücrelerin kök hücre popülasyonu gösterip göstermediğini doğrulamak açısından PLA popülasyonu ve adipoz kökenli kök hücre denilen onun bir çok klonu yoğun moleküler ve biyokimyasal çalışmalarla elde edilmiştir

PLA hücreleri, MKH ler gibi birçok CD (*cluster of differentiation*) marker antijeni sentezler. Zuk ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalar ile PLA hücrelerin MKH’lerde görüldüğünden farklı karakterde, CD marker ve gen ekspresyon profili değişikliklerini de içeren eşsiz özellikler sergilediği görüldü ve bu çalışmaların sonucu olarak adipoz dokuların “*multi-germline*” potansiyeli olan kök hücre elde edilebilmesi için eşsiz bir başka kaynak olduğu gösterildi.³⁵

PLA hücreleri fenotip olarak MKH’lere benzerdir; MKH’lerin karakterleri eksprese ettikleri “cell-specific proteinler ve CD markerlar kullanılarak saptanmıştır. MKH’ler gibi PLA hücreleri de CD29, CD44, CD71, CD90, CD105/SH2 ve SH3 eksprese eder ancak CD34, CD31 ve CD45 eksprese etmez. Bu sonuçlar, MKH’ler ile PLA ların benzer CD komplementleri eksprese ettiğini gösterir. Ancak PLA

hücreleri CD106 eksprese etmez bu durum PLA'ların non-hematopoetik dokudan elde edildiklerinin göstergesidir.

Adipoz doku kaynaklı kök hücreler (AKKH) lipoaspirasyon sonrasında veya abdominal subkutan yolla alınmış yağ dokusunun mekanik ve enzimatik yollar ile ayrıştırılması ile elde edilen ve in vitro şartlarda farklanmadan büyüme özelliğine sahip hücrelerdir. AKKH'lerin sahip oldukları yüksek in vitro kültür ve farklanma potansiyelleri ancak yeni anlaşılmaya başlanmıştır. Diğer yandan, ADKK hücrelerin tedavi ve araştırma amaçlı kullanım potansiyelleri bu hücrelerin diğer hücrelere farklanma mekanizmalarının çözülmesi ile daha iyi anlaşılmaktadır.

Adipoz doku da aynı kemik iliği gibi embriyonik mezodermden derivedir ve heterojen stromal hücre popülasyonu içerir. PLA hücreleri invitro koşullarda çok kolay ekspansiyon olurlar ve fibroblast benzeri morfoloji sergilerler. PLA hücreleri MKH hücrelerinden farklı olarak FBS'nin (Fetal bovine serum) kaynağından ve kalitesinden çok fazla etkilenmedikleri gibi kültüre edildiklerinde takipleri de daha rahattır. Zuk'un 2001'deki çalışmalarında PLA hücrelerinin ortalama iki katına çıkma süresi 60 saat izolasyon sonrası ilk duraklama süresi 5-7 gündür. Hücreler daha sonra proliferatif faza girerler ve konfluense ulaşmaları 48 saat içinde olur. Yaptığımız çalışmada karmaşık olmayan ve kompleks materyaller gerektirmeyen adipoz kökenli kök hücre elde etme prosedürü uygulandı. Bu basit prosedürler ile kök hücrelerin hızlı çoğaldıkları, flaska tamamen yapıştıkları ve viabilitelerini kaybetmedikleri gözlemlendi. Her ne kadar ışık mikroskobu ile tipik kök hücre görüntüsü sergilemiş olsalar da, elde ettiğimiz hücrelerin kök hücre olduklarının yüzey belirteçleri ile doğrulanması açısından akım sitometre (FACS) ile floresan sayım yapıldı. CD34 ve CD45 negatifliği ve %99 CD105 CD73 pozitifliği ile hücrelerin adipoz kökenli kök hücre oldukları doğrulandı.

Kök hücre tedavilerinde en büyük ilgi uyandıran dal rejeneratif tıp alanıdır. Tıbbın hemen her alanını kapsamaktadır. Meniskus hasarı tamiri, osteoporoz tedavisi, implantlar, myokard enfarktüsü, spinal kord yaralanmaları, yanık tedavisine kadar çok geniş potansiyel kullanım alanı bulunmaktadır

Son on yıl içinde yapılan çalışmalar ışığında gelecekte doku mühendisliğinde kök hücre kullanımının rutin olacağı söylenebilir. Bugüne kadar yapılan birçok umut verici çalışma bulunmaktadır. Cowan ve arkadaşları yakın zaman önce fareler üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada farelerin karın bölgesinden elde edilen ADKK hücrelerinin uygun biyomateryal (PLGA) ile birleştirildikten sonra ciddi kalvaryal defektlerin tamirinde efektif olarak kullanılabilceğini göstermiştir. (55)

Doku mühendisliği'nin (rejeneratif tıp) yapıtaşı olarak nitelendirebileceğimiz ideal bir kök hücrenin şu kriterlere uyması gerekmektedir; 1) çok yüksek sayılarda (milyonlarca, milyarlarca hücre) elde edilebilmelidir, 2) minimal invaziv yöntemlerle alınabilmeli ve harvest edilebilmelidir. 3) üretilmesi istenen birçok hücre çeşidinin yolağına girebilmelidir 4) otolog ya da allojenik bir alıcıya güvenli ve efektif olarak transplante edilebilmelidir.⁵¹ Bizim çalışmamızda AKKH tercih etmemizin nedeni AKKH'lerin tüm bu kriterleri karşılayabilmesidir. Kemik iliği kökenli kök hücreler hem az sayıda elde edilebilmekte hem de minimal invaziv yöntemlerle alınması mümkün olamamaktadır.

Rejeneratif tıp açısından klinik rutin kullanımda ciddi morbiditeye yol açacak bir yöntemin uygulanabilir olmayacağı açıktır. Bu nedenle de elde edilirken morbiditesi daha az olan ve yüksek miktarlarda elde edilebilen adipoz dokunun rejeneratif tıpta çok önemli ve çok geniş bir kullanım alanı bulabileceği açıktır.

Ancak henüz hücre hazırlama metodları tam olarak optimize edilmemiştir. Bu eksiklik rutin klinik kullanımın önündeki önemli bir engeldir.¹⁰⁵ AKKH ile yapılacak tüm çalışmaların ışığında, AKKH elde etme prosedürlerinin standardizasyonu belirlenerek klinik kullanımın önündeki çok önemli bir engelin kalkacağını düşünmekteyiz.

Kök hücrelerin doku mühendisliği ve gen terapisi gibi uygulamalardaki terapötik potansiyeli muazzamdır. Kavramsal olarak iki tip kök hücreden bahsettik, embriyonik kök hücreler ve otolog kök hücreler. Embriyonik kök hücreler teorik olarak pluripotent olsalar da pratik olarak hücre regülasyonu ve etik durumlar gibi sınırlayıcı potansiyel problemleri vardır. Oysa otolog kök hücreler doğaları gereği immünolojik açıdan uygundur ve kullanımlarıyla ilgili herhangi bir etik durum söz konusu değildir.

İnsan kemik iliği embriyonik mezodermden meydana gelir ve mezenkimal stroma ile desteklenen hematopoetik kök hücre (HKH) popülasyonundan oluşur. Bu HKH'lerin proliferasyon ve diferansiyasyonu iyi dökümente edilmiş olmasına rağmen stromal komponent hakkında bilinenler azdır.

İnsanlar ve hayvanların her ikisinde kemik iliği stroması mezenkimal kök hücre (MKH) denen bir kök hücre popülasyonu içeren birçok hücre popülasyonu ihtiva eden bir heterojen kompozisyondadır. MKH'ler ile yapılan çalışmalarla bu hücrelerin adiposit, kondrosit, miyoblast ve osteoblastlara diferansiyasyonu gösterilmiştir. Bu hücreler gelecekteki doku mühendisliği stratejileri için umut verici bir seçenek olmuşlardır. Ancak geleneksel kemik iliği elde etme prosedürleri ağırlı olabilir, genellikle genel veya spinal anestezi gerektirir ve işlem sonucunda elde edilen MKH miktarı düşüktür (yaklaşık 1 MKH/10⁵). Düşük miktarda kök hücre elde edilmesi, klinik olarak yeterli sayıda hücre elde edebilmek için ex vivo ekspansiyon gerekliliği doğurur. Bu gereklilik de zaman-para ve hücrelerin kontaminasyon nedeniyle kaybına neden olabilir. Ayrıca uzun süreli ekspansiyonun kanserleşme eğilimini arttırdığı da bilinmektedir. Otolog kök hücrelerin ideal kaynağı hem elde edilmesi kolay, hem de hastaya en az derecede rahatsızlık veren, ayrıca yoğun kültür ekspansiyonuna gerek bırakmayacak miktarda elde edilebilir olmalıdır.

Doku mühendisliği çalışmalarında biyomateryaller kullanılarak in vitro ortamda kök hücreler yardımıyla elde edilecek üç boyutlu skafold ile yapılan distraksiyon osteogenez çalışması literatürde bulunmamaktadır. Kemik defekti onarımları için kemik iliği kökenli kök hücreler ile yapılan ve skafold olarak hidroksiapatit gibi üç boyutlu biyoseramiklerin kullanıldığı çalışmalar literatürde mevcuttur.^{58,114} Polimer ya da kalsiyum fosfat bazlı yapılacak bir skafoldun düşük osteoindüktif yeteneği olması sebebiyledir. Bu kaynakların osteokondüktif yetenekleri olsa da tek başına yeterli değildir. İdeal skafold malzemesinin bulunabilmesi ile ilgili çok çeşitli çalışmalar yapılmaktadır.¹¹³

Adipoz yapıyı karmaşık üç boyutlu şekilde elde etmek için hücrelerin tutunabileceği, onlara destek sağlayan , rehberlik eden iyi bir taşıyıcı iskelete ihtiyaç vardır. Bir çok çalışmada taşıyıcıların adipoz doku ile uzun süre dayanıklı kalması üzerinde çok yüz güldürücü sonuçlar elde edilemese de hücreleri barındırma ve

diferansiyasyonlarını mümkün kılma açısından oldukça elverişli taşıyıcı iskeletler geliştirilmiştir. Skafold olarak PLGA'nın kullanıldığı adipoz kökenli kök hücreler ile kalvarial defektin onarımının yapıldığı bir çalışmada ise başarılı sonuçların alındığı bildirilmiştir.¹⁵³ Distraksiyon osteogenezin doğası gereği böyle bir skafoldun yapılabileceği de henüz bilinmemektedir. İn vitro ortamda elde edilebilecek üç boyutlu organ ve doku yedeklerinin distraksiyon osteogenez dahil bir çok rekonstrüktif uygulamayı tarihe gömeceği öngörülebilir. Ancak hala uzun süre laboratuvar koşullarında kalan hücrelerin yoğun strese maruz kalma ve kanserleşme riskleri mevcuttur, üstelik kemik iliğini de içeren üç boyutlu kemik dokusunun oluşması için onlarca hücre ve sitokin uygun doz ve sürede varlığı gerekmektedir.

İn vitro koşullarda karmaşık ve özel kültür ortamlarına ihtiyaç duymadan gelişebilen hücre kaynakları, doku mühendisliği için çok büyük bir avantaj sunmaktadır. Otolog kök hücreleri bu alanda kullanışlı kabul edilebilir. Elde edilişleri açısından bakıldığında insan AKKH'leri bol miktarda bulunmaktadır ve klinik uygulamalar için "*suction lipoektomi*" ile kolayca elde edilebilir. İnsan adipoz dokusundan temin edilen multipotent kök hücreler adipojenik, kondrojenik myojenik ve osteojenik hücrelere farklılaşabilmektedir. Birçok araştırmacı, geleneksel hücre kültürü teknolojileri ile ekspande olabildiklerini ortaya koymuştur. Adipoz doku mühendisliğinin yeni aşama kaydedebilmesi, otolog hücreleri ve gelişmiş taşıyıcı iskeleleri kullanarak adipoz doku üretebilen bir ex vivo kültür sisteminin bulunmasına bağlıdır ve çalışmalar bu konu üzerinde yoğunlaşmaktadır.

Yağ dokusu vücutta yaygın ve kolay elde edilebilir olduğundan hücre kaynağı doku mühendisliği stratejileri açısından bir sorun oluşturmamaktadır. Ama bazı özellikleri nedeniyle bazı zorluklara sahiptir, matür adipozitler sitoplazmalarındaki yoğun lipid depozitleri nedeniyle stabil olmayan yapıya sahiptir. Yüksek metabolizma hızları nedeniyle iyi vaskülarizasyona ihtiyaç duyarlar. Bunun yanı sıra matür adipozitlerin diferansiyasyon ve proliferasyon yeteneğinin olmadığı kabul edilir. Hacim olarak büyüyebilirler ancak çoğalmazlar Preadipozitler diferansiyasyon öncesinde tıpkı fibroblast gibidir, diferansiyasyon sırasında fibroblastik özelliklerini kaybeder yuvarlaklaşır adipozitlerin ultrastrüktürel yapısına kavuşur.¹³²

Biyolojik olarak yok edilebilen sentetik materyallerin hücrelerin tutunması ve doku oluşumuna yön vermesi için bir “taşıyıcı iskelet” (scaffold) rolü oynayabileceği fikri doku mühendisliği alanını başlatmıştır.¹³² Çalışmamızda distraksiyon periyodu sonrasında kök hücrelerin yeni oluşmuş olan kallus içerisine verilmesi ile kallus bir nevi skafold olarak kullanılmıştır.

Günümüzde kullanılan taşıyıcılara örnek olarak kısa ve uzun dönemde olumlu sonuçların alındığı preadipozit ekilmiş poli L-laktik ko-glikolik asit yapıdaki taşıyıcılar verilebilir. Hyalüronik asitten modifiye edilen taşıyıcı iskelet de kollajen içerikli olanlara göre fareye ekilen insan preadipozitlerinin ekspansiyon ve diferansiyasyonlarını daha çok arttıran etkiye sahiptir. Ekstrasellüler matriks, adiposit metabolizması için oldukça önemlidir. Bunu göz önünde tutan çoğu araştırmacı, fibronektin içeren taşıyıcılar üzerine çalışmalarını yoğunlaştırmaktadırlar. Fibronektin ile kaplanmış alloplastın adipoz diferansiyasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Arjinin, glisin ve aspartik asitten derive edilen doğal hidrojenlerin de yumuşak doku mühendisliğinde iyi bir taşıyıcı olabilir. Aljinatin in vivo ortamda minimal kapsül oluşturarak 6 ay üzerinde kalabildiği gösterilmiştir. Fibrin glue da vaskülarize kapsül içine yerleştirilmiş preadipozitleri dağıtıcı araç olarak kullanılmaktadır.¹³² Polyester temelli bu moleküller oldukça hidrofobik olduklarından hücre tutunması için ideal özellikte sayılmazlar. Özelliklerinin geliştirilmesine uygun fonksiyonel grup da taşımazlar. Kollajen gibi oldukça hidrofilik olan moleküllerin sorunu da kültür ortamında hızla erimeleri ve bu nedenle çapraz bağlanmalarının gerekmesidir.¹¹⁶

Distraksiyon osteogenezde taşıyıcı olarak skafold kullanan çalışmalar az da olsa literatürde mevcuttur. Bu çalışmalarda genellikle plateletten zengin plazma (PRP),^{135,140,151} kollajen⁵³ ya da hiyalüronik asit taşıyıcı olarak kullanılmaktadır. Özellikle taşıyıcı olarak PRP kullanılmasıyla ilgili başarılı çalışmalar literatürde mevcuttur. Hatta otolog mezenkimal kök hücre ve PRP kombinasyonu ile oluşturulan enjektabl jele *doku mühendisliği osteojenik materyali* ismi verilmiştir.¹⁵¹ PRP, yoğun büyüme faktörü ve sitokin kaynağı oluşu nedeniyle çalışmanın sonucuna etki edebileceği düşünülerek bu çalışmada taşıyıcı olarak kullanılmadı.

Özellikle osteojenik yönde farklılaşmış kök hücre verdiğimiz grubun başarılı iyileşme sonuçlarına bakarak bu hücrelerin taşıyıcı olarak serum fizyolojik yerine

PRP ile taşınmasının kemik iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceğini söyleyebiliriz. Bizim çalışmamızda kök hücrelerin sağ kalımına olacak etkileri, adipoz dokuların beslenmesine olacak etkileri ve oluşturacakları immün reaksiyonların distraksiyon alanındaki kırık iyileşmesine ve dolayısıyla deneysel çalışmaya yapacakları etki önceden kestirilemediğinden hiyalüronik asit ya da kollajen gibi bir skafold taşıyıcı kullanılmamıştır. Arzulanan ideal materyalin biyolojik olarak uyumlu olması, osteokondüktif olması, klinik olarak kabul edilebilir sürede polimerize olması ve kontrollü degrade olması istenilir. Geliştirilmiş olan kemik replasman materyalleri her ne kadar daha güvenli, daha basit ve daha dirençli olsalar da ideal olmaktan uzaktırlar.¹¹⁵ ince barsak submukozası da biyolojik olarak uyumlu, güvenli olması nedeniyle kemik defekti onarımlarında skafold olarak denenmiş ancak başarılı bulunmamıştır.¹¹⁵

Kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerle yapılan bazı çalışmalarda, bu hücrelerin yeni kemik oluşumunu hızlandırdığının radyolojik ve histolojik olarak gösterildiği ancak yine de yeni oluşan kemiğin kök hücre kökenli olduğunun in vivo kesin olarak gösterilememesinin önemli bir eksiklik olduğunu belirtilmiştir.¹⁵¹ Bu nedenle yapacağımız çalışmada distraksiyon alanına vereceğimiz hücrelerin burada yeni kemik oluşumuna yapacakları katkının ve verilen hücrelerin canlılıklarını koruyup koruyamadıklarının kesin olarak gösterilebilmesi için, tüm kök hücrelere 6 aya kadar süren ışına yeteneği bulunan GFP ile işaretli plazmidlerin transfeksiyonunu uygun gördük

Yeşil floresan proteini (GFP), günümüzde hücre biyolojisi çalışmalarında tanımlayıcı gen ve hücre işaretleyici olarak kullanılmaktadır. GFP'nin oldukça önemli kullanım alanlarının başında; farklı genlerin içerisine eklenerek bu genlerin farklı organizmalardaki ekspresyonlarının miktar tayini ve canlı hücreler içerisinde işaretleyici olarak kullanılabilmesi gelmektedir.⁹⁵ Bu çalışmada adipoz kökenli kök hücreleri in vivo takip edebilmek amacı ile GFP genini içeren plazmid vektörünü AKKH'ye aktardık. Bu amaçla GFP geni taşıyan "*phM-GFP*" plazmid vektörü ve AKKH'lere plazmid vektörünün aktarılması amacı ile "*Effectene Transfeksiyon kiti*" kullanılmıştır. Kök hücrelerin işaretlenmesi, canlı hayvan ve hücrelerde kök hücrelerin takibi açısından yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Yaşayan organizmalarda hücrelerin takibi için; mikroenjeksiyon, elektroporasyon, kalsiyum

fosfat presipitasyon, DEAE-Dextran, lipozomlar ve adenovirüsler, lentivirüsler ve retrovirüsleri içeren bir çok yöntem vardır. Meier ve arkadaşları *effectene transfeksiyon* metodunun düşük toksisite ve daha iyi transfeksiyon verimi olduğunu göstermişlerdir.¹²⁰ Yaptığımız çalışmada uzun konsolidasyon süresini de göz önünde bulundurarak altı aylık süre boyunca ışığa yapabilen GFP kullanımına karar verdik. Bizim çalışmamızda hücrelerin nükleusları *effectene* transfeksiyon kiti yardımıyla plazmidler ile işaretlendi, bu plazmidlerin sürekli sayılarının artması ile uzun süreli ışığa imkanı oluştu. Böylelikle distraksiyon bölgesine transfekte edilen hücrelerin ne kadarının sağ kaldığı ve kemik dokuya entegre olduğu gösterilebildi. Hücrelerin işaretlenip kallus alanına verilmesinin ardından sekiz hafta sonra sakrifikasyon sonrası elde edilen kemik preparatlarının dekalsifiye edilmesi sırasında ilk önce EDTA solüsyonu kullanıldı, bu solüsyonun kemiği geç dekalsifiye etmesi üzerine %20'lik formik asit ile dekalsifikasyon sağlandı. Her iki yöntemin de hücrelerin ışımaya negatif etkisi olmadığı görüldü. Bu her iki solüsyonun GFP ışımaya etkisinin karşılaştırılması açısından da çalışmamız literatürdeki tek çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Literatürdeki kök hücre ile distraksiyon çalışmalarının çoğunda elde edilen kök hücreler yüzey belirteçleri ile sayılarak kök hücre olduklarının doğrulanmadan çalışmalarda kullanıldıkları ve aynı zamanda nükleusları işaretli hücreler kullanmadığı için deney alanına verilen hücrelerin ne kadarının dokuda canlı kaldığı ne kadarının öldüğü bilinmemektedir, elde edilen pozitif sonuçlar direkt hücrelerin gösterilmesiyle değil ancak dolaylı yollardan elde edilebilmekte bu nedenle güvenilirlikle daha düşük olmaktadır.¹²²⁻¹²⁴

Literatürde, elde edilen hücrelerin dokuya transplantasyonunun ne zaman yapılması ile ilgili tartışmalar mevcuttur.¹²² Bazı yazarlar distraksiyon sürecinin başında verilmesini doğru bulurken bazı yazarlarca distraksiyon sürecinin sonunda yeterli yumuşak kallus oluştuğundan sonra verilmesi daha uygun bulunmaktadır. Tavşan kemiklerinde yapılan çalışmalarda cerrahi sonrası 12 günden önce diferansiyasyonun başlamadığı bilinmektedir.¹²⁶ Biz çalışmamızda yeterli yumuşak kallus oluşmuş olması ve bu kallusun bir nevi skafold vazifesi göreceği olması nedeniyle transplantasyonu distraksiyon sürecinin sonunda yapmayı uygun gördük.

Hem kök hücre hem de diferansiye kök hücre grubunda transplantasyon distraksiyon sürecinin sonunda yapıldı. Çalışmamızda kontrol grubunun yanısıra kök hücre ve diferansiye kök hücre gruplarının da iyileşmeye katkısını karşılaştırma imkanı bulduk. Kırık ortamına kök hücre verilmesinin iyileşmeye olumlu etkisinin olacağı aşikardır. Ancak çalışmamızın sonuçlarının da gösterdiği şekilde iyileşmeye yapacakları katkı ortama direkt osteojenik diferansiyasyona uğramış, alkalen fosfataz enzimi salgılayabilen kalsiyum hidroksiapatit depolanması yapabilen osteoblast benzeri hücrelerin verilmesinin yapacağı katkı yanında yetersiz kalmaktadır.

Deneklerin haftalık radyoloji sonuçları sekiz hafta sonunda incelendiğinde grupların hepsinde zamanla kallus dokusunda artış olduğu görüldü. Sadece Grup I'deki deneklerden birinde distraksiyonun tamamlanmasının ardından distal ve proksimalde bir miktar kallus oluşumu olduğu ancak üçüncü haftadan sekizinci haftaya kadar bu kallus dokusunda hiç ilerleme olmadığı görüldü. Herhangibir deviasyonu, enfeksiyonu ya da genel durum bozukluğu olmayan denekte iyileşmenin durması diye nitelendirebileceğimiz bu olaya cerrahi sırasında periost hasarının neden olabileceği düşünüldü.

Latent periyotta osteotomi alanı literatürde belirtildiği gibi immatür bulutsu kallus ile sarılıydı.⁴⁴ Distraksiyon başladıktan sonra kallusun proksimal ve distal segmentlere ayrıldığı görüldü. Tüm deneklere sekiz hafta olan konsolidasyon süresi boyunca haftalık grafiler çekildi. Grafilerin haftalık çekilmesinin nedeni; radyolojik olarak saptanacak olası bir angulasyona erken dönemde müdahale etme şansının bulunabilmesi ve kırık iyileşmesinin gruplar arası karşılaştırmasının daha sağlıklı yapılabilmesiydi.

Deneklerin tümü önceden numaralandırılarak radyolojik inceleme için götürüldü. Tüm deneklerin, ilk olarak supin pozisyonunda yatırılarak ön-arka daha sonra ise yan pozisyonda yatırılarak yan tibia grafileri çekildi. Görüntüleme işlemi yüksek çözünürlüklü dijital radyografi sistemi (Philips digital diagnost) ile yapıldı. Görüntüleme 110 cm uzaklıktan 66 kV, 1.82 msn,1.20 mAs ve X1 büyütme kullanılarak standardize edildi. Distraksiyon alanında oluşan yeni kemiğin radyoloji kdeğerlendirilmesinin yapılabilmesi için literatürde radyolojik değerlendirme için en sık kullanılan modifiye Lane ve Sandhu skorlama sistemi kullanıldı.^{96,97,139} Bu

skorlama sisteminde kemik doluluk yüzdelerinin yanısıra hem proksimal hem de distalden kaynamalar ayrı ayrı değerlendirilmektedir. Ayrıca medüller kanal oluşumu ve korteks oluşumuna da puan verilir. Bu skorlama sistemini kullanarak yaptığımız değerlendirmede en yüksek kemik doluluk oranlarının Grup III'de olduğunu gördük. Grup III'deki iki denekte kemik doluluk oranı %100'e ulaşmıştı. Bu oran, sadece kök hücrelerin verildiği Grup II'de daha düşüktür. Kontrol grubunda ise proksimal ve distal kallus füzyonunun her denekte olmadığı füzyon olan deneklerde ise kallus dokusunun çok daha radyolusent olduğu görüldü. Çalışmamızdaki hiçbir denekte medüller kanal oluşumu ya da korteksin tam teşekkülünü görmedik. Bunun nedeni 8 haftalık bekleme süresinin medüller kanal ve korteksin tam teşekkülü için yeterli bir süre olmamasıdır.

Çalışmamıza katılan deneklerin grafileri incelendiğinde, diferansiye kök hücre verilen grupta (Grup III), üç denekte kallus oluşumunun enjeksiyon yapılan kısımda diğer tarafa göre çok daha fazla olduğu görüldü, bu bulgu kallus bölgesine verilen osteojenik kök hücrelerin kemik iyileşmesini hızlandırdığını destekler yöndedir.

Deneklerin modifiye Lane ve Sandhu skorlamasında aldığı değerler ortalaması; Grup I'de $4,571 \pm 0,2$, Grup II'de $5,14 \pm 0,1$, Grup III'de $6,14 \pm 0,5$ olarak bulunmuştur. Her bir grup ikili olarak diğer gruplarla karşılaştırıldığında; Grup I ve II arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Grup I ile Grup III arasındaki fark da istatistiksel olarak anlamlıdır, Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında ise aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. İstatistiksel sonuçlara bakarak kök hücre verilen gruplardaki kallus miktarı ortalamalarının kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu söylenebilir ancak her ne kadar diferansiye kök hücre grubunda (Grup III) yüzde yüz doluluk oranları olan denekler olsa da kök hücre grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç çıkmaması, her iki grubun da kemik iyileşmesine iyi derecede katkısı olduğunun bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

Kontrol grubundaki kallus dokularının belirgin olarak daha radyolusent olması, mineralizasyonun daha düşük olması ile açıklanabilir. Ayrıca özellikle Grup III ile karşılaştırıldığında Grup I'de proksimal ve distal uç füzyonlarının daha az

köprüleşmenin yetersiz ve kallus doluluk oranlarının da çok daha düşük olduğu söylenebilir.

Çalışmaya alınan tavşanların radyolojik incelemesinde distraksiyon alanını dolduran kallus alanları ortalamasına bakıldığında; Grup I'in ortalaması $66,79 \pm 2,7$, Grup II'nin ortalaması $74,14 \pm 3,9$ ve Grup III'ün ortalaması $88,5 \pm 3,9$ 'dur. İstatiksel olarak karşılaştırılma yapıldığında; Grup I ve II arasındaki fark istatiksel olarak anlamlı değildir, Grup I ve III arasındaki fark istatiksel olarak anlamlıdır, Grup II ve III arasındaki fark da istatiksel olarak anlamlıdır.

Grup I ve II'nin modifiye Lane ve Sendhu skorlama sistemi ile istatiksel olarak anlamlı sonuç vermesine rağmen kallus doluluk oranları karşılaştırıldığında anlamlı sonuç vermemesinin nedenleri araştırıldığında, modifiye Lane ve Sendhu skorlama sistemindeki geniş değerlendirme aralıklarının bu duruma sebep olabileceği düşünüldü. Bu skorlama sisteminde %0-%25 doluluğa 1 puan %25-%50 doluluğa 2 puan %50-%75 doluluğa 3 puan %75-%100 doluluğa ise 4 puan verilmektedir. Ancak literatürde en yaygın kullanılan yöntem olması nedeniyle bu skorlama sisteminin değerlendirmesine sadık kalındı. Diferansiye kök hücre grubunun kallus doluluk oranları hem kök hücre grubuna göre hem de kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı çıkması Grup III'ün elde ettiği yüksek doluluk oranları ile koreledir. Grup III'deki deneklerin radyolojik görüntüleri incelendiğinde Grup I ve II'ye göre daha radyopak olduğu tüm deneklerde distal ve proksimal füzyon olduğu ve tüm deneklerde uçlarda mineralizasyonun yüksek olduğu görüldü. Grup III'teki iki denekte fraktür hattının tamamen silinmiş olduğu görüldü. Grup I ile Grup II değerlendirildiğinde her iki grupta da distal ve proksimal füzyonun tüm deneklerde tamamlanmadığı, uçlardaki mineralizasyonun daha düşük olduğu, Grup II'deki radyopak görünümün Grup I'e göre daha fazla olduğu görüldü.

Bu çalışmanın radyolojik değerlendirme sonuçlarının esası distraksiyon alanının ne kadar kallus dokusuyla dolduğu değerlendirmesine dayanmaktadır. Distraksiyon alanına dolan kallusun karşılaştırılmasında Grup III'ün Grup I ve Grup II'ye oranla daha radyopak olduğu söylenebilir. Ancak daha kesin ve nitel bir değerlendirme yapmak için bu tür sonuçların değerlendirilmesinin kemik mineral dansitesi ölçümü (DEXA) ile yapılmasının daha kesin sonuçlar vereceğini

düşünmekteyiz. Bu çalışmanın esas amacı AKKH'lerin yeni kemik oluşumuna entegrasyonunun gösterilmesi olması (GFP ile) nedeniyle çalışmanın radyolojik değerlendirme parametreleri içinde düz grafi ile değerlendirme yeterli görülmüştür.

Biyomekanik değerlendirme için deneğin tibiasından, distrikte alan santralde olacak şekilde 3 cm kemik dokusu çıkarıldı, yumuşak dokulardan temizlendi ve serum fizyolojik emdirilmiş tampon içerisinde biyomekanik laboratuvarına ulaştırıldı. Üç nokta kırma testi yapacak olan makinanın alt destek aralığı 3 cm'ye ayarlandı. Distraksiyon alanı tam ortaya gelecek şekilde kemik doku yerleştirildi. Dakikada 1 mm hız ile basan makinadan bilgisayara aktarılan sonuçlar incelendiğinde osteojenik diferansiye kök hücrelerin verildiği Grup III'te en yüksek değerlerin alındığı görüldü. Grup I'in maksimum kuvvet ortalama değeri 344,092 iken Grup II'nin ortalama değeri 433,315, Grup III'ün maksimum kuvvet ortalama değeri 526,896 idi. İkili grupların ayrı ayrı değerlendirilebilmesine olanak veren Mann-Whitney U testiyle yaptığımız değerlendirme sonucu $p=0,050$ olarak sonuçlandı. İstatiksel anlamlandırma açısından sınırda olan bu değer nedeniyle sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değil olarak yorumlandı. Ayrı ayrı ikili grupların değerlendirilmesinin istatistiksel olarak anlamlı olmaması üzerine tüm gruplar arasında anlamlılık olup olmadığını anlayabilmek için Kruskal Wallis testi uygulandı. Yapılan Kruskal Wallis testinde p değeri $p=0,027$ olarak saptandı. Bu değerlendirme sonucuna göre grupların tümü değerlendirildiğinde gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır.

Biyomekanik değerlendirme için kullanılacak yöntemler temel olarak üç tip gücün kombinasyonundan oluşurlar. Bunlar; gerilim, kompresyon ve kayma (*shear*) güçleridir. Üç nokta kırma testi (*bending*) konveks tarafta gerilim oluştururken konkav tarafta kompresyon oluşturur.¹³⁸ Torsiyon veya burma (*twist*) testleri ise tüm materyal boyunca kayma stresi oluşur. Ayrıca gerilim güçleri uzatmaya çalışırken kompresyon gücü ise kısaltmaya çalışır.

Torsiyon veya burma testlerinin tüm materyal boyunca değerlendirme yapması ve genellikle kallusun çok sertlik kazanmadığı erken dönemlerde kullanılması nedeniyle çalışmamızda distraksiyon alanında oluşmuş olan kallusun gücünü direk ölçebilecek üç nokta kırma (*bending*) testini kullanmayı uygun gördük.

İkili grupları değerlendirme sonucu istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilmemesi üzerine değerlendirilen denek sayımızın az olması nedeniyle böyle bir sonuç çıkmış olabileceğini düşünerek literatürde benzer çalışmalarda elde edilen sonuçları araştırdık. Diferansiye olsun ya da olmasın adipoz dokudan elde edilmiş kök hücrelerle yapılan biyomekanik çalışmalarına literatürde rastlayamadık. Ancak periosttan elde edilmiş kök hücrelerle yapılan 36 biyomekanik değerlendirmenin olduğu tavşan deneyi çalışmasında, uygulanan üç nokta kırma testi sonuçlarında kök hücre verilen grupta daha yüksek değerler elde edilmesine rağmen bizim çalışmamızda olduğu gibi istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilemediğini gördük. (67).

Konsolidasyon periyodu, traksiyon kuvvetlerinin durdurulması sonrası rejeneratın matürasyon ve kortikalizasyonuna izin verilen dönem olarak bilinir. Distraksiyon tamamlandıktan sonra fibröz ara zon dereceli olarak kemikleşir ve belirgin bir örgü kemik zonu, boşluğu tamamlar. Distraksiyon rejeneratı predominant olarak intramembranöz kemikleşme ile form alır. Rejeneratın bulunduğu alanda kırıldak adacıklarına da rastlanabilir. Rejenerat olgunlaştıkça primer osteonlara ait zonlar belirgin biçimde azalır ve sonunda tamamen rezorbe olur. İlerleyen aylarda, başlangıçta oluşan kemik iskeleti paralel fibriller ve lamellar kemik gelişimi ile kuvvetlendirilir. Hem kortikal kemik hem de ilik kavitesi restore edilir. Kortikal rekonstrüksiyonun son aşaması olarak kemik yapısı havers sisteminin remodelingi ile normal haline gelir. Distrakte edilen kemiğin matürasyonu yani yeni oluşan kemiğin eskiden mevcut olan kemik ile aynı yapıya kavuşması yaklaşık 1 yıl veya daha fazla sürer.^{77,80,129}

Her üç grubun histolojik örnekleri (H&E, Masson Trikrom ve deney gruplarında immünfloresan) bu bilgiler ışığında ayrı ayrı değerlendirildi. Distraksiyon osteogeneze ait histolojik çalışmalarda; distraksiyon sırasında gelişen kallus dokusunun yavaş aksiyel distraksiyon ile büyüme plağına benzediği, longitudinal fibrillerin diziliminin kuvvet vektörüne paralel olduğu bildirilmiştir. Çalışmamızdaki histopatolojik incelemeler sonucunda, kemik trabeküllerinin büyük oranda distraksiyon yönüne paralel uzanmış olduğu görüldü. Oluşan trabeküllerin içerisinde osteositler ve trabekül çevresinde osteoblastlar görüldü. Grup I ve II'de lamellar yapının Grup III'e göre daha az ve düzensiz olduğu görüldü.

Osteotomilerin düşük devirli motor ile yapılması, cerrahi ardından osteotomi alanın steril serum fizyolojik ile yıkanmasına bağlı olarak histolojik preparatlarda osteotomi nedeniyle kırık alanında kalan serbest fragmanlara rastlanmadı. Ayrıca osteotomiler sırasında alan sürekli soğutulduğu için yüksek ısı nedeniyle oluşabilecek nekrotik alanlara da rastlanmadı.

Havers kanallarının içinde kapiller yapıların mevcut olduğu görüldü. Ayrıca bu materyallerin büyük bölümünde az sayıda irili ufaklı damarların mevcut olduğu tespit edildi. Yapılan Masson Trikrom boyasında bu dokuların genel görünüm olarak düzensiz bağ doku fibrilleri içerdiği ve bu bölgelerde yoğun kollajen birikimi olduğu, kollajen fibrilleri arasında osteositlerin mevcut olduğu görüldü.

H&E ile yapılan boyamada özellikle Grup III'te osteoid yapı miktarının diğer gruplara göre daha fazla olduğu görüldü. Lameller yapının azlığı, osteon yapısının tam oluşmaması, kollajen fibrillerin tam homojen dağılmaması gibi özellikler çalışmamızdaki örneklerde intramembranöz tipte kemikleşmenin daha baskın olduğunu göstermektedir. Bu durum literatür ile uyumludur.

Floresan mikroskop ile deney grupları (Grup II ve III) incelendiğinde enjekte edilen kök hücrelerin ışımaya yaptığı görülerek, distraksiyon alanına verilen bu hücrelerin canlılıkları kanıtlandı. Grup III'de aynı mikroskop alanının floresan ve ışık mikroskop incelemelerinde, ışımaya yapan hücrelerin çoğunlukla osteosit ve bir miktar da osteoblast hücreleri olduğu gösterildi. Diferansiye olmamış kök hücrelerin verildiği Grup II'de ise ışımaya yapan hücrelerin ışık mikroskopu incelemesinde, bu hücrelerin hemen hemen distraksiyon alanındaki tüm hücre tiplerini içerdiği (osteosit, osteoblast, kondrosit, fibroblast, progenitör hücreler) gözlemlendi. Bu önemli bulgu neticesinde defekt alanına sadece kök hücre verilmesi yerine kök hücrelerin osteojenik diferansiasyonunun ardından kırık alanına verilmesinin kemik iyileşmesine doğrudan çok önemli katkı sağlayabileceği sonucu çıkarılabilir.

Grup I'de milimetrekaredeki osteosit sayısı ortalama 35,0, Grup II'de 43,4 ve Grup III'de 55,0 idi. Grup I ile Grup II ve Grup III istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı artış saptandı. Bu artış kemikleşme oranının istatistiksel veriler ile paralel oranda arttığını göstermektedir. Özellikle Grup III'teki osteosit

sayılarındaki anlamlı yükseklik hem enjekte edilen osteoblast benzeri hücrelerin direkt kemik iyileşmesine katılması hem de bu enjekte edilen hücrelerin salgıladıkları sitokinler ile kemik yapımını ayrıca uyarması ile açıklanabilir.

Literatürde, konsolidasyon süresini kısaltmak için tavşanda distrakte kallus içerisine periost dokusundan elde edilen osteoblast benzeri hücreler ile enjeksiyon yapılmış olan çalışmada oluşan yeni kemik hacmi ve kemik mineral miktarının osteoblast benzeri hücre transfer edilen grupta daha iyi olduğu gösterilmiştir.⁶⁷ Bu etkinin iki şekilde olabileceği düşünülmüştür: distrakte kallustaki osteojenik hücrelerin sayısının doğrudan artışı ve membranöz-kartilaginöz osteogenezi sitokinler, kollajen gibi ajanlarla stimüle ederek.

Osteoblast sayılarının ortalaması karşılaştırıldığında Grup I'de 37,0, Grup II'de 36,5 ve Grup III'de 40,25 olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I ile Grup II arasında anlamlı fark bulunmazken Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu gözlemlendi. Preperatların sekiz haftalık konsolidasyon periyodu sonucunda değerlendirilmesi nedeniyle osteoblast sayısının görece olarak düşük olması normal olarak değerlendirilebilir.

Kondrosit hücrelerinin ortalamaları karşılaştırıldığında Grup I'de 22,7, Grup II'de 37,5 ve Grup III'de 42,5 olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak Grup I ile Grup II ve Grup I ile Grup III karşılaştırıldığında, kondrosit sayısındaki artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü. Deney gruplarındaki yüksek kondrosit miktarları endokondral kemikleşmede oluşan kırıkta taşlağın yerini kemik dokuya bıraktığını göstermektedir.

Fibroblast hücreleri karşılaştırıldığında Grup I'de 48,5, Grup II'de 32,2 ve Grup III'de 17,5 olarak bulundu. Bu değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I'e oranla Grup II ve Grup III'te anlamlı derecede azalma saptandı. Bu azalma ilk oluşan bağ doku taşlağının yerini kırıkta ve kemik dokusuna bırakmasından kaynaklanmakta olup Grup III'teki çok düşük değerler hızlı kemikleşmenin çok önemli bir göstergesidir.

Osteoklast hücrelerinin değerlendirmesinde Grup I 2,1, Grup II 1,1 ve Grup III 1,5 olarak saptandı. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup II ve Grup III Grup I'e oranla anlamlı derecede azalma saptandı. Konsolidasyon evresinin bu safhasında osteoklastlardaki bu değerler literatür ile uyumludur. Erken evrede kemik fragmaların fagositozu için yüksek sayılarda olan osteoklastlar bu aşamada artık remodelingi sağlama işlevi görmeye başlamaktadırlar.

Kemik alan oranları incelendiğinde, Grup I'de %42, Grup II'de %46 ve Grup III'de %61 olarak bulundu. Grup I ile Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yine anlamlı fark olduğu görüldü. Trabeküler alanların image tool programı kullanılarak ölçülmesiyle elde edilen bu değerler çalışmanın sonuçları ile uyumludur. Diferansiye kök hücrelerin verildiği Grup III'de yeni oluşan kemikleşmeyi gösteren trabeküler alanların yoğunluğu diğer gruplara oranla oldukça fazlaydı. Kemikleşme açısından oldukça değerli olan bu parametrede Grup III için elde edilen yüksek kemikleşme oranları diferansiye kök hücrelerin kemik oluşuma pozitif etkilerini destekler niteliktedir. Grup II'deki artış Grup III kadar yüksek oranda olmasa da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı değerler elde edilebilmiştir.

Kıkırdak alanlar incelendiğinde ise, Grup I %13, Grup II %23 ve Grup III %30 olarak bulundu. Grup I ile Grup II ve Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edildi. Grup II ile Grup III karşılaştırıldığında istatistiksel olarak yine anlamlı bir fark bulundu. Kemik alanları ile aynı bölgelerden elde edilen bu kıkırdak alan yüzdeleri bize endokondral kemikleşmeye bağlı kıkırdak alanlarının karşılaştırılmasını vermektedir. Kemik ve kıkırdak alan yüzdeleri birlikte incelendiğinde Grup III'de %91 oranında kemik ve kıkırdak hücrelerinden oluştuğu sadece %9 gibi düşük bir alanın fibroblast ve diğer bağ doku hücrelerinden oluştuğu görüldü. Bu oran Grup II'de %69 Grup I'de ise %55'dir.

Kemik yapım hücrelerinin sayısal olarak karşılaştırılmasının yanında kemik yapımında çok önemli olan ekstrasellüler matriks proteinlerinin de sayısal olarak karşılaştırılmasını uygun gördük. Konsolidasyon süresinin uzunluğu göz önünde bulundurularak, osteoblastların adezyonunu uyaran ve ekstrasellüler matriks

remodelinginde önemli rol oynayan¹³³ osteopontin ile sadece matür osteoblast ve kondrositlerden salınan ve kalsiyum bağlayan matriks proteini olan osteokalsinin milimetrekaredeki sayılarının immünohistokimyasal incelemesi yapıldı.

Elde edilen dokularda yapılan immünohistokimyasal boyamalarda kemikleşme için spesifik sayılabilecek osteokalsin pozitif boyanan hücreler sayıldığında Grup I'de 24,4, Grup II'de 31,0 ve Grup III'te 37,0 olarak bulundu. İstatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I'e göre Grup II ve Grup III anlamlı oranda arttığı gözlemlendi.

Osteopontin pozitif hücreler karşılaştırıldığında Grup I 20,0, Grup II 25,4 ve Grup III 34,3 olarak bulundu. Değerler istatistiksel olarak karşılaştırıldığında Grup I'e göre Grup II ve Grup III'ün anlamlı oranda arttığı gözlemlendi.

Yapılan tüm histopatolojik incelemeler ışığında, kök hücre verilen grupta da osteoblastik yönde aktivite artışı olduğu ancak verilen kök hücrelerin birçok hücre tipine dönüşmesi nedeniyle bu artışın sınırlı olduğu görüldü. Grup III'de ise direkt kalsiyum depolayan, sitokin salgılayan osteoblast benzeri hücreler verildiği için kırık iyileşmesi yönündeki tüm histopatolojik inceleme ve alan ölçümlerinde bu grupta en yüksek değerler elde edildi. Bu sonuçlar ışığında kırık iyileşmesinde, defektli alanlara kök hücre verilmesi yerine osteojenik diferansiasyonunu tamamlamış kök hücrelerin verilmesinin çok daha etkili olacağı söylenebilir.

Çalışmamızda elde edilen kök hücrelerin distraksiyon alanına verilmesi protokolüyle ilgili yaptığımız literatür araştırmamızda, enjeksiyon yöntemi kullanılarak perkutan olarak hücrelerin distrikte alana verilmesiyle başarılı sonuçlar elde edildiğini gördük.^{10,67,123,151} Enjeksiyon protokolü için literatürde özellikle üzerinde durulan konu enjeksiyonun yavaş yapılması ve geri akmasının önlenmesi için enjektörün mutlaka en az bir dakika daha kallus içinde tutulması gerekliliğiydi. Çalışmamızda tüm bu gereklere enjeksiyonlar sırasında uyuldu ve dışarıya taşma gibi bir komplikasyonla karşılaşılmadı. Deney grubundaki kallus alanına beş milyon hücre verilmesinin nedeni bu miktardaki hücre sayısına alınan yağ doku miktarı ile 2-3 pasajda rahatlıkla ulaşılabilmesiydi. Enjeksiyonlar sırasında enjektörün iğnesinin ve verilen 0,25 ml sıvının kallus dokusuna bir miktar harabiyet vereceği gerçektir. Bu

çalışmanın bir eksikliği olarak kontrol grubunda distraksiyon alanına enjektör sokulmamış olması ya da salin enjeksiyonu yapılmaması gösterilebilir. Çalışmanın sonunda elde ettiğimiz veriler Grup III'ün kontrol grubuyla karşılaştırıldığında iyileşme yönünde anlamlı derecede daha iyi olmasına rağmen Grup I ve Grup II'deki bazı yakın değerlerin, Grup I'in kallusunun enjektör ve sıvı ile hiç hasarlanmamış olmasına bağlanabilir. Ancak şu da bir gerçek ki literatürdeki çalışmaların çoğunda kontrol gruplarında enjeksiyon yapılmamıştır.⁶⁷

Çalışmamızda adipoz doku kaynağı olarak kullanacağımız yağ dokusunun alınması için inguinal bölgenin seçilmesinin nedeni, tavşanda bu bölgelerde bol miktarda yağ yastıkçıkları olması, cerrahi olarak kolay ulaşılabilir olması ve mortal komplikasyon riskinin çok düşük olmasıdır. Ancak çalışmamızdaki bir denekte olduğu gibi yağ doku alınırken sinir hasarı ve paralizi riski mevcuttur. Ondört denekten sadece bir tanesinde paralizi olması bu ihtimalin düşük olduğunu göstermektedir. Alt ekstremitte paralizi gelişen bu denek çalışma dışı bırakılarak yerine yeni bir denek konuldu.

Hayvan modellerinin insan fizyolojisine ne kadar uyumlu olduğu araştırıldığında, insan ve hayvanın kraniyofasiyal ve ekstremitte karakteristiklerinde belirgin farklılıklar varken, moleküler spesifikasyon ve embriyolojik kraniyal yapılarda müthiş bir benzerlik olduğu Shneider ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada gösterilmiştir.¹³¹ Yaptığımız çalışmada elde ettiğimiz başarılı sonuçlar neticesinde adipoz kökenli kök hücrelerin klinik kullanım için uygun olup olmadığı sorusuna cevap aradık. Literatürde bu konuda yapılan çalışmalara baktığımızda insandan elde edilen AKKH ile farelerden elde edilen AKKH'lerin immünojenotip, diferansiyasyon potansiyeli, hücre büyümesi karakteristikleri, yaşlanma, nükleer morfoloji açısından karşılaştırılmış ve immünojenotip yönden oldukça benzer bulunmuştur¹⁴¹ ancak aynı çalışmada farelerden elde edilen AKKH'lerde proliferasyon hızı daha yüksek ve bu hücreler insan kökenli olan hücreler göre daha anstabil bulunmuşlardır. Bu sonuçlar uzun süre kök hücre pasajlamanın en korkulan yönü olan kanserleşme riskinin insan kaynaklı kök hücrelerde daha düşük olabileceğini düşündürmektedir ki bu sonuç klinik kullanım açısından oldukça yüz güldürücüdür.

Kemik uzatılmasının erken döneminde osteoblast benzeri hücre transplantasyonu ile distrakte kallus içerisinde yeni kemik hacmi ve kemik mineral miktarında artış olur. Bu prosedürün iki farklı etkisi olduğu düşünülmektedir. Hem distrakte kallus içerisindeki osteojenik hücreler sayıca artar hem de transplante edilen bu hücrelerden kaynaklanan sitokinler kollajen ve diğer ajanlar vasıtasıyla membranöz ve kartilaginöz osteogenez stimüle edilir. Osteoblast benzeri bu hücrelerin transplantasyon sonrasında bu özel etki mekanizmalarını nasıl sağladığı ve hücrelerin transplantasyonu için ideal şartların neler olduğunun anlaşılabilmesi için daha fazla ayrıntılı deneysel çalışma yapılmasının gerekliliği aşikardır. Bizim yaptığımız çalışma göstermiştir ki tavşanda osteojenik diferansiyasyona uğramış adipoz kökenli osteoblast benzeri kök hücrelerin transplantasyonu distrakte kallus matürasyonunu uyarmış ve hızlandırmıştır. Klinik çalışmalarda da benzer başarının elde edilebilmesi kallus distraksiyonunda konsolidasyon periyodunu ve eksternal fiksasyonun toplam süresini kısaltabilir.⁶⁷

ADKK hücrelerinin osteojenik medya ile indüksiyonu osteogenezin gerçekleştiğini destekleyen birçok olayın meydana gelmesiyle sonuçlanır. Özellikle Alkalin fosfataz (AP) aktivitesi ve mineralizasyon kapasitesinin zaman içerisinde artması bunun göstergeleridir. AP aktivitesi bifazik bir patern gösterir dolayısıyla kinetikleri stabil değildir, ortam mineralizasyonun gösterilmesiyle diferansiyasyonun doğrulanması gerekir.³⁵ Çalışmamızda kullanılan alkalin fosfataz enzim kitleri ile diferansiye hücrelerin alkalin fosfataz salgılaması gösterilemedi ancak aynı hücreler kalsiyum depozitlerini boyayan alizarin red boyası ile çok belirgin boyandı. Bunun nedeni olarak, alkalin fosfataz salınımının bifazik ve gittikçe azalan nitelikte olması olduğu düşünüldü. Bu nedenle çalışmamızda osteogenez göstermek için rutin olarak kalsiyum hidroksiapatit depolanmasını gösteren alizarin red boyası kullandık. AP aktivitesi ve matriks kalsifikasyonu haricinde osteojenik diferansiyasyonun doğrulanması *RT-PCR* ile multipl gen ekspresyonu gösterilerek de doğrulanabilir (*c-fos*, *RXRalfa*, *VDR*, *PTHrP*, *OP*, *ON*, *AP*, *CBFA-1* ve *CNI*). Ayrıca *Osteonektin*, *Osteopontin* veya *Osteokalsin* ekspresyonu ile immünohistokimyasal olarak da diferansiyasyon gösterilebilir.

Adipoz kökenli kök hücreler ile ilgili bir çok çalışma yapılmış olsa da bu hücrelerin nereden orijin aldıkları hala bilinmemektedir. Bu kök hücrelerin kemik iliği

kökenli olabilecekleri düşünülmüş ve bunu gösterebilmek için GFP işaretli çalışmalar yapılmış ancak net bir sonuç alınamamıştır.⁹⁴ Zuk ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları çalışmada PLA hücreleri ile MKH'ler arasında birçok benzerlikler saptanmıştır. Bu benzerlikler neticesinde adipoz dokudaki bu kök hücreler periferik kandan gelen kök hücreler mi sorusu gündeme gelmiştir. Ancak periferik kanda kök hücrelerin bulunup bulunmadığı tartışmalıdır. Ayrıca zaten kemik iliğinde oldukça az olan kök hücrelerin (1 MKH/10⁵ stroma hücresi) periferik kanda daha da az olması gerekir. Ancak yapılan çalışmalarda elde edilen yüksek orandaki diferansiye hücrelerin bu az sayıda hücreden elde edilmesi mümkün görülmemektedir.³⁵ Yüzey belirteçleri ve eksprese edilen maddelere bakılarak PLA ve MKH'lerin benzer olduğu ancak tamamen aynı olmadıkları gösterilmiştir (Lennon 1996). Ancak yine de PLA hücrelerinin dolaşımdaki MKH'lerin klonal bir varyantı olabileceği de göz ardı edilmemelidir.

Mezenkimal kök hücreler, hastalarda intravenöz yolla (damardan), kateter yolu ile veya direkt olarak hasar bulunan bölgeye enjeksiyon veya cerrahi esnasında verilebilmektedir. Klinik uygulamalar sonucunda emboli gelişimi, infüzyona bağlı ciddi sorunlar da bildirilmemiş ancak MKH çoğaltılmasında kullanılan fetal calf (buzağı) serumuna (FCS) bağlı, orta derecede alerjik reaksiyon gelişmiştir.

In vitro kültür ortamında uzun süren (haftalarca) manipülasyonların hücre tedavileri için dezavantaj sağladığı bilinmektedir. Mikroorganizma kontaminasyonu yanında sitogenetik bozukluk gelişimi, kültürde hücre yaşlanması, telomer kısalması, onkogenik transformasyon riski gibi ciddi riskler söz konusu olabileceği düşünülmekle beraber, günümüze kadar yapılan klinik çalışmalarda önemli soruna yol açtığı gösterilmemiş, ancak az sayıda bildirilen deneysel araştırmalarda özellikle kültürde ilerleyen pasajların muhtemel sakıncalarına değinilmektedir. Bu hücrelerin kanser geliştirme potansiyelinin embriyonik hücrelerle kıyaslandığında çok düşük olduğu bilinmektedir. Hematopoetik kök hücrelerle kıyaslandığında çok yönlü farklılaşma potansiyelinin daha yüksek olduğu kabul edilen MKH'lerin, laboratuvar ortamında çoğaltılma sonucu bazı riskler taşıyabileceği kabul edilmekte, rejeneratif tıpta bu denli potansiyel vadeden hücrelerle ilgili en ideal hücre kültür koşullarının sağlanması konusunda çalışmalar sürdürülmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanım için dezavantajlarından biri, hücrelerin kültürde çoğaltılması, için gerekli olan, başta FCS olmak üzere, diğer ürünlerin de klinik kullanıma uygun bulunmasında yaşanan zorluktur. Bu konuya alternatif olarak insan serumu, plazması, trombositten zengin plazma kullanımı veya klinik kullanım için uygun kültür yöntemleri ve ürünler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Halen, optimal yöntem ve ürünler olmaması, klinik çalışmaların hız kazanmasını önlemektedir.

Mezenkimal kök hücre tedavilerinde birbaşka önemli sorun ise, bu hücrelerin verilen organizmada uzun süreli canlılığının ve fonksiyonunun sağlamasındaki zorluklardır. Bu nedenle tekrarlayan infüzyonlar gerekmektedir. Bizim çalışmamızda ise tek infüzyonla distraksiyon alanına verilen ve dokuda takiplerinin yapılabilmesi amacıyla GFP ile işaretlenen kök hücrelerin incelenen histolojik örneklerinde ışımaya yapan kök hücrelerin sayısının oldukça fazla olduğu görüldü. Bu durum verilen hücrelerin büyük oranda canlılıklarını devam ettirdiğini gösterir niteliktedir.

Hücrelerin lezyon bulunan alana direkt implantasyonu ile daha verimli sonuçlar elde edilebileceği hayvan deneylerinde bildirilmişse de, sistemik veya lokal verilişte benzer sonuçların olduğunu bildiren çalışmalar da vardır. Klinik uygulamalarda ise daha ziyade sistemik yolla veriliş tercih edilmektedir.

Yaptığımız bu deneysel çalışmanın sonuçları değerlendirildiğinde adipoz kökenli osteojenik diferansiye kök hücrelerin distraksiyon sürecine uyum sağladığı, distraksiyon alanına verilen hücrelerin büyük oranda canlı kaldığı ve kemik yapımına entegre olduğu kesin olarak gösterilebildi. Kırık iyileşmesine olan katkı gözönüne alındığında diferansiye olmayan kök hücrelerin (Grup II) *invivo* birçok hücre tipine dönüşmesi nedeniyle osteoblast benzeri hücrelerin verildiği gruba (Grup III) kıyasla kırık iyileşmesine olan katkılarının daha düşük olduğu görüldü. Osteojenik kök hücrelerin kırık iyileşmesine yaptığı bu katkılar neticesinde distraksiyon osteogenezin konsolidasyon periyodunun bu hücreler kullanılarak kısaltılabileceği ve kemik iyileşmesinin hızlandırılabileceği söylenebilir.

8.SONUÇ VE ÖNERİLER

Kök hücrelerin birçok organda (kas, kalp, karaciğer) (Lucas 1992, Young 1995) ayrıca deri (Toma 2001), plasenta ve yağ (Zuk 2001) gibi dokularda bulunabildiği gösterilmiştir. Bu da göstermektedir ki günümüzde kök hücrelerle ilgili araştırma yapmak için ulaşılabilecek birçok kök hücre kaynağı mevcuttur.

Hücre kültür ortamında çoğaltılan MKH'lerin, hastalarda kullanılabilmesi için, hücre hazırlığında gerekli tüm in vitro işlemlerin uluslararası kabul edilmiş standartlarda GMP (Good Manufacturing Practice = İyi Üretim Uygulamaları) yapılması gerekmektedir. Hücrelerin kalite kontrolleri yapılmış olarak haftalar süren kültür ortamında çoğaltılabilmeleri için, en başta, dış ortamdan gelebilecek enfeksiyonların önlenmesi, ayrıca işlemlerden geçirilirken hücrelerde stres oluşmasına bağlı gelişebilecek istenmeyen etkilerin (kanser geliştirme potansiyeli, hedeflenen dışında başka hücre gelişmesi gibi) önlenmesi gerekmektedir. Bu koşulları sağlamak için gerekli altyapıyı oluşturmada zorluklar nedeniyle hastaların uzun süreli takibine ait sonuçlar henüz bilinmemektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin en büyük dezavantajı olarak bildirilen düşük miktarlarda elde edilebilme ve uzun pasaj süresi gerektirme gibi olumsuzlukları barındırmayan adipoz doku ve uygulamalarının özelliklerinin daha iyi anlaşılabilmesi için in vivo çalışmalar gerekliliği literatürde belirtilmiştir.³⁵ Yaptığımız çalışmanın çıkış kaynaklarından biri de bu hücreler ile ilgili literatürdeki in vivo çalışma sayısının az ve yetersiz olmasıdır. Çalışmanın yapıldığı ve tamamlandığı süreç içerisinde literatürde adipoz kaynaklı kök hücre ile distraksiyon osteogenez çalışmasına rastlanmadı. Çalışmamız bu özelliğiyle literatürde yapılan ilk çalışma olmuştur.

Ilizarov'un kemik onarımına getirdiği en yenilikçi katkı olarak değerlendirilen⁷⁶ interkalar kemik nakli, sağlam kemikte osteotomi sonrası bir kemik segmenti oluşturularak distraksiyon ile defektin kapatılmasıdır. Bu çalışmada özellikle diferansiye kök hücrelerin verildiği üçüncü grupta elde ettiğimiz başarılı sonuçlara dayanarak bu hücrelerin, segmental kemik defekti oluşturulmasının ardından interkalar yöntemle onarım yapılacak deneysel çalışmalarda kullanılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

Kemik defekti onarımlarının önemli bir elemanı olan distraksiyon osteogenez'de kullanılmak üzere gelecekte daha küçük, absorbe olabilen ve otomatik distraktörlerin kullanılacağı düşünülmektedir. Bu apareyler ile birlikte osteojenik kök hücrelerin kullanılmasının, kemik onarımındaki doku mühendisliği çalışmalarının başarısını daha da arttıracığı öngörülebilir.

Yaptığımız çalışma neticesinde kazandığımız tecrübe ile sunacağımız önerilerin başında, gelecekte yapılacak distraksiyon osteogenez çalışmalarında sistemik ve lokal verilecek adipoz kökenli kök hücre karşılaştırılması gelmektedir. Osteojenik kök hücrelerin sistemik olarak verilmesinin, enjeksiyonun kallusta oluşturabileceği hasarı minimuma indireceğini ve daha homojen bir dağılım sağlayacağını düşünmekteyiz. Çalışmamızda kök hücrelerin enjeksiyonu distraksiyon periyodunun sonunda yapıldı, böylece bu süre zarfında oluşan kallus dokusu verilen hücreler için bir nevi skafold vazifesi gördü. Ancak osteoblastların mekanik stres ile kollajen ve sitokin salgılamasını arttırdığı düşünüldüğünde,¹³³ bu durumun osteojenik diferansiyasyona uğramış kök hücreleri de etkileyip etkilemediğinin saptanması açısından distraksiyon periyodunun başında kök hücre verilmesi ile ilgili çalışmaların literatüre katkısı olacağını düşünmekteyiz.

9.KAYNAKLAR

¹ Mandu-Hrit M, Seifert E, Kotsiopriftis M, Lauzier D et al. OP-1 injection increases VEGF expression but not angiogenesis in a rabbit model of distraction osteogenesis. *Growth Factors* 2008;26(3):143–151

² Özdemir H, Akyıldız F F. Basic principles of circular external fixators in the treatment of bone defects and deformities. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2000;34:434-443

³ Li X Q, Stevenson S, Klein L, Davy D T et al. Differential patterns of incorporation and remodeling among various types of bone grafts. *Acta Anat (Basel)* 1991;140(3):236-44

⁴ Başbozkurt M. Uzun kemik defektlerinin ve kemik doku kayıplarının distraksiyon osteogenezis yöntemi ile tedavisi. İleri ilizarov Kursu Ders Notları Adana,1997;47-62

⁵ Özeç İ, Öztürk M. Distraksiyon Osteogenezisi Cumhuriyet Üniv. Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 2000;3(1):47-51

⁶ Annio D, Goguen L A. Distraction osteogenezis for reconstruction of mandibular symphyseal defects. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;120:911-16

⁷ Aksu A E. Adipöz kök hücrelerin osteojenik farklılaşması, *Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi* 2007;15(2): 36-38

⁸ Zuk P A, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001;7:211–228.

⁹ Ilizarov G A. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. *Clin Orthop* 1990;(250):8-26

¹⁰ Richards M, Huibregtse B, Caplan A, Gulet J et al. Marrow derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. *Journal of Orthopedic Research* 1999;17:900-908,

¹¹ Fischgrund J, Paley D, Suter C. Variables affecting time to bone healing during limb lengthening. *Clin Orthop Relat Res* 1994;301:31–37

¹² Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop Relat Res* 1990;250:81–104

¹³ Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA, Marrow-derived New Bone Progenitor Cell Injections Enhance Formation during Distraction Journal of Orthopaedic Research 1999;17:900-908

¹⁴ Noonan KJ, Leyes M, Forriol F, Canadell J. Distraction osteogenesis of the lower extremity with use of monolateral external fixation. A study of two hundred and sixty-one femora and tibiae. J Bone Joint Surg 1998;80(6):793-806

¹⁵ Muschler G F, Lane J M. Clinical applications of bone grafting in orthopaedic surgery. In: Bone Grafting: From Basic Science to Clinical Applications. 1992;375-407

¹⁶ Muschler GF, Huber B, Ullman I, Barth R et al. Evaluation of bone-grafting materials in a new canine segmental spine fusion model. J Orthop Res 1993;11:514-524.

¹⁷ Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium: a complication of lumbar spine fusion. J Bone Joint Surg 1989;71:677-680,

¹⁸ Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. J Orthop Trauma 1989;3:192-195

¹⁹ Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A et al. Factors effecting callus distraction in limb lengthening. Clin. Orthop 1993;293:55-60

²⁰ Shimazaki A, Inui K, Azuma Y, Nishimura N et al. Low intensity pulsed ultrasound accelerates bone maturation in distraction osteogenesis in rabbits. J Bone Joint Surg 2000;82:1077-1082

²¹ Hagiwara T, Bell WH. Effect of electrical stimulation on mandibular distraction osteogenesis. J Cranio-Maxillofac Surg 2000;28:12-19,

²² Cho BC, Moon JH, Chung HY, Park JW. The bone regenerative effect of growth hormone on consolidation in mandibular distraction osteogenesis of a dog model. J Craniofac Surg 2003;14:417-425,

²³ Eckardt H, Bundgaard KG, Christensen KS, Lind M. Effects of locally applied vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-inhibitor to the rabbit tibia during distraction osteogenesis. J Orthop Res 2003;21: 335-340

²⁴ Hamdy RC, Amako M, Beckman L, Kawaguchi M et al. Effects of osteogenic protein-1 on distraction osteogenesis in rabbits. Bone 2003;33:248-255

²⁵ Rauch F, Lauzier D, Travers R, Glorieux F. Effects of locally applied transforming growth factor-beta 1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. Bone 2000;26:619-624,

²⁶ Mengchun QI, Jing HU, Shujuan ZOU, Haixiao ZHOU et al. Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone marrow mesenchymal stem cells in rats. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2006;34:283–289

²⁷ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143–147,

²⁸ Cop JB, Samchukov ML, Cherkashin AM. Continuing education article, mandibular distraction osteogenesis; A historic perspective and future directions. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 1999;115(4): 448-60

²⁹ Weil Ts, Sickles JEV. Distraction osteogenesis for correction of transverse mandibular deficiency: A preliminary report. *J oral maxillofacial surgery* 1997;55:953-960

³⁰ Block MS, Brister GO. Use of distraction osteogenesis for maxillary advancement. *J Oral Maxillofacial Surgery* 1994;52: 282-286

³¹ Block MS, Daire J. Changes in the inferior alveolar nerve following mandibular lengthening in the dog using distraction osteogenesis. *J. Oral Maxillofacial Surgery* 1993;51:652-660

³² Cari FR, Schüpbach P. Distraction osteogenesis for lengthening of the hard palate : Part II histological study of the hard and soft palate after distraction. *Plastic and Reconstructive Surgery* 1997;1648-54,

³³ Howell JC, Lee WH, Morrison P, Zhong J. Pluripotent stem cells identified in multiple murine tissues. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 2003;996:158-173.

³⁴ Arai F, Ohneda O, Miyamoto T, Zhang XQ. Mesenchymal stem cells in perichondrium express activated leukocyte cell adhesion molecule and participate in bone marrow formation. *J. Exp. Med* 2002,195:1549-1563

³⁵ Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol. Biol. Cell* 2002;13:4279-4295

³⁶ Gronthos S, Zannettino AC, Hay SJ, Shi S et al. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow. *J. Cell Sci* 2003;116: 1827-1835,

³⁷ Boquest AC, Shahdadfar A, Fronsdal K, Sigurjonsson O. Isolation and molecular profiling of human stromal stem cells derived from adipose tissue. *Mol. Biol. Cell* In press, 2005

³⁸ Rickard DJ, Kassem M, Hefferan TE, Srkan G. Isolation and characterization of osteoblast precursor cells from human bone marrow. *J. Bone Min. Res*1996;11:312

³⁹ Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem* 1997;64:278

⁴⁰ Hausman GJ, Campion DR. Histology of the stroma in developing rat subcutaneous adipose tissue. *J. Anim. Sci* 1982;55:1336

⁴¹ Loffler G, Hauner H. Adipose tissue development: the role of precursor cells and adipogenic factors. Part II: The regulation of the adipogenic conversion by hormones and serum factors. *Klin. Wochenschr* 1987;65:812

⁴² Wall ME, Rachlin A, Otey CA, Lobo. Human adipose-derived adult stem cells upregulate. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007;293:1532-1538

⁴³ Gross RH. An evaluation of tibial lengthening procedurs. *J bone joint surg* 1971 53(4):693-700

⁴⁴ Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S et al. Bone Lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J bone Joint surg* 1988 70:543-9

⁴⁵ Shvyrkov MB, Shamsudinov AH. Non-Free osteoplasty of the mandile in maxillofacial gunshot wounds: mandibular reconstruction by compression-osteodistraction. *British J. Of Oral and Maxillofacial Surgery* 1999,37:261-267,

⁴⁶ Stoeltinga Pj. Distraction from the ground rules. *Int. J. Oral Maxillofacial Surgery* 1998,27(6):414-5,

⁴⁷ Fernyhough ME, Hausman GJ, Guan LL, Okine E. Mature adipocytes may be a source of stem cells for tissue engineering. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2008;368:455–457,

⁴⁸ Rachmel A, Levy M. Lengthening of the mandible by distraction osteogenezis: Report of cases. *J. Oral maxillofacial surgery* 1995;53:838-846

⁴⁹ Wei G, Schubiger G, Harder F, Muller AM. Stem Cell Plasticity in Mammals and Transdetermination in Drosophila: Common Themes? *Stem Cells* 2000;18:409–414

⁵⁰ Woodbury D, Reynolds K, Black IB. Adult bone marrow stromal stem cells express germline, ectodermal, endodermal and mesodermal genes prior to neurogenesis. *J. Neurosci. Res* 2002;96:908–917

⁵¹ Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patell B. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008;45:115–120

⁵² Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues. Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. *Clin Orthop Relat Res* 1989;238:249-81

⁵³ Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop Relat Res* 1989;239:263-85

⁵⁴ Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 2005;1(15):48-56

⁵⁵ Öztürk A, Timuçin M, Bayramlı E, Kahraman S et al. Kemik ve kırıldak dokusu onarımına yönelik olarak yağ dokusundan farklılandırılmış hücre ve seramik/polimer kompozit içeren yapay dokuların geliştirilmesi. *Tübitak MAG Proje 106M063* 2008:1-58

⁵⁶ Can A, Karahüseyinoğlu S, Çınar Ö, Erdemli E, Özdağ H. İnsan kök hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma aşamalarında yapısal protein dinamiğinin belirlenmesi, *Tübitak SBAG Proje 3314106S036* 2008:1-39

⁵⁷ Embriyonel ve mezodermal kök hücreler. Prof.Dr Ali Uğur Ural Ders notları. *GATA Hematoloji A.D. Ankara*

⁵⁸ Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A et al, Stem Cells Associated with Macroporous Bioceramics for Long Bone Repair: 6 to 7 Year Outcome of a Pilot Clinical Study. *Tissue Engineering* 2007;13:5:947-955,

⁵⁹ Aronson J. The Ilizarov technique for bone regeneration and repair. *2005;195-223,*

⁶⁰ Bağcı V. Alt ekstremitte kırıklarının plak ile biyolojik tespiti. Tez çalışması *Şişli Etfal Eğitim ve Arş. Hastanesi* 2005, İstanbul

⁶¹ Ovalle WK, Nahirney PC, *Netter Essential Histology*, 131-156

⁶² Yamane K, Okano T, Kishimoto H, Hagino H. Effect of ED-71 on modeling of bone in distraction osteogenesis. *Bone* 1999;24(3):187-93.

⁶³ Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y, Tanaka S. Bone mineral density of lengthened rabbit tibia is enhanced by transplantation of fresh autologous bone marrow cells. An experimental study using dual X-ray absorptiometry. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(303):250-5.

⁶⁴ Reddi AH. Bone morphogenetic proteins, bone marrow stromal cells, and mesenchymal stem cells. Maureen Owen revisited. Clin Orthop Relat Res 1995;(313):115-9.

⁶⁵ Hagino T, Hamada Y . Accelerating Bone Formation and Earlier Healing after using Demineralized Bone Matrix for Limb Lengthening in Rabbits. Journal of Orthopaedic Research 1999;17(2):232-237

⁶⁶ Takamine Y, Tsuchiya H, Kitakoji T, Kurita K. Distraction osteogenesis enhanced by osteoblastlike cells and collagen gel. Clin Orthop Relat Res 2002;399:240-6.

⁶⁷ S. Tsubota, H. Tsuchiya, Y. Shinokawa, K Tomita. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. J Bone Joint Surg 1999;81-B:125-9.

⁶⁸ Bayram N. Histoloji. Anadolu Üniv. Yayınları 1995;125-132

⁶⁹ Kotan LD. Silika metodu ile kemikten DNA ekstraksiyonu. Tez çalışması. Çukurova Üniversitesi 2010, Adana

⁷⁰ Demirdöver C. Kollajen, hidroksiapatit ve sinir büyüme faktörü'nün, kraniyal kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine etkileri: Sıçanlarda deneysel çalışma. Tez çalışması. D.E.Ü.T.F 2003, İzmir

⁷¹ Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. AÜTF Mecmuası 2002;55(2):143-150

⁷² Altunatmaz K. Kırık iyileşmesinin biyolojisi ve biyolojik osteosentez. İÜVF dergisi 2004;30(1):141-147

⁷³ B.McKibbin. The biology of fracture healingin long bones. J Bone Joint Surg Br.1978;60-B(2):150-62

⁷⁴ D Bastiani G, Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Trivella G. Limb lengthening by callus distraction (callotasis). Journal of Pediatric Orthopaedics 1987;7(2):129–34.

⁷⁵ Ateşalp A.S, Başbozkurt M, Erler K, Şehirlioğlu A. Treatment of tibial bone defects with the Ilizarov circular external fixator in high-velocity gunshot wounds. International Orthopaedics 1998;22:343–347

⁷⁶ Mutlu Z, Özsoy S. Köpeklerin ekstremitelerinde ilizarov eksternal fiksator uygulamaları üzerine klinik çalışmalar.İÜVF dergisi 2003;29(1):119-135

⁷⁷ Keçeli HG, Demiralp B, Muhtaroğulları M, Demiralp B. Distraction Osteogenesis: New Bone Formation, History and Biologic Principles: Part 1. Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 2006;30(1):31-41

- ⁷⁸ Eski M. Kraniyofasiyal distraksiyon osteogenezinin tarihçesi. Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi 2007;15(3):76
- ⁷⁹ Ateşalp AS, Demiralp B, Bek D. Tibianın Kemik Defektlerinde Sirküler Eksternal Fiksator ile Kemik Transportu. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi 2004;3:1-2
- ⁸⁰ Arık AM, Gümgüm S. Distraksiyon osteogenezinin biyolojik temeli. AÜ Diş Hek. Fak. Dergisi. 2005;15(2):71-79
- ⁸¹ Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker MT. The molecular biology of distraction osteogenesis. J. Cranio-Maxillofac Surg 2002; 30:1-11
- ⁸² Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. Clin Orthop Relat Res 1990;(250):81-104
- ⁸³ Shyam A, Singh SU, Modi HN, Song HR. Leg lengthening by distraction osteogenesis using the Ilizarov apparatus: a novel concept of tibia callus subsidence and its influencing factors. International Orthopaedics 2010;34(5):773-774
- ⁸⁴ Keçeli HG, Demiralp B, Muhtoroğulları M, Demiralp B. Distraction Osteogenesis in Dentistry: Part 2. Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi 2006;30(2):20-30
- ⁸⁵ Roberts W, Turley P, Brezniak N, et al. Bone physiology and metabolism. Calif Dent Assoc J 1987;15:54-61.
- ⁸⁶ Raghoobar G, Heydendrijk K, Vissink A. Vertical distraction of the severely resorbed mandible. The Groningen distraction device. Int J Oral Maxillofac Surg 2000;29:416-20.
- ⁸⁷ Karsu E. Kök hücre biyolojisinde temel kavramlar ve doku mühendisliği . Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi 2007; Supp.1:13-19
- ⁸⁸ Karaöz E. Nedir bu kök hücreler? Türkiye kök hücre araştırmalarının neresinde? Cumhuriyet Bilim ve Teknik Dergisi 2004;18(884):2-14.
- ⁸⁹ Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ et al. The human adipose tissue is a source of multipotent cells. Biochimie 2005;87:125-128
- ⁹⁰ Lendenckel S, Jödicke A, Christophis P et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery 2004;32:370-373
- ⁹¹ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999;284:143-147 .

- ⁹² Dani C, Casteilla L. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* 2006;32:393-401
- ⁹³ Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage *Cell Prolif.* 2004;37:97-110
- ⁹⁴ Tomiyama K, Murase N, Stolz DB, Toyokawa H et al. Characterization of transplanted green fluorescent protein bone marrow cells into adipose tissue. *Stemcells* 2008;26:330–338
- ⁹⁵ Baran Y, Ural A, Avcu F, Sarper P et al. Optimization of transfection of green fluorescent protein in pursuing mesenchymal stem cells in vivo *Turk J Hematol* 2008;25:172-175
- ⁹⁶ Köm M, Bulut S. Köpeklerde bifokal ve monofokal distraksiyon osteogenezisinin karşılaştırılması: Tibia defektlerinde deneysel bir çalışma. *F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi* 2005;19(1):13-20
- ⁹⁷ Karaoğlu S, Baktir A, Kabak Ş, Arasi H. Experimental repair of segmental bone defects in rabbits by demineralized allograft covered by free autogenous periosteum. *Injury, Int. J. Care Injured* 2002;33:679–683
- ⁹⁸ Ateşalp AS, Başbozkurt M, Erler K, Şehirlioğlu A et al. Treatment of tibial bone defects with the Ilizarov circular externalfixator in high-velocity gunshot wounds. *International Orthopaedics* 1998; 22:343–347
- ⁹⁹ Forriol F, Denaro L, Longo U G, Taira H. et al. Bone lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep. *Strat Traum Limb Recon* 2010;5(2):71-78
- ¹⁰⁰ Becker A J, McCulloch E A, Till J E. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963;197:452–4.
- ¹⁰¹ Friedenstein A J, Gorskaja J F, Kulagina N N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267–74.
- ¹⁰² Cannon B, Nedergaard J. *Developmental Biology: Neither fat nor flesh.* *Nature* 2008;21:947-8.
- ¹⁰³ Minguell J J, Erices A, Canget P. Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Biology and Medicine* 2001;266:507-520

¹⁰⁴ Nobusue H, Kano K. Establishment and characteristics of porcine preadipocyte cell lines derived from mature adipocytes. *Journal of Cellular Biochemistry* 2010;109(3):542-552

¹⁰⁵ Çetinkaya DU. Mezenkimal kök hücrelerin klinikte kullanımı. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:99-103*

¹⁰⁶ Elçin Y M. Klinik doku mühendisliği. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:93-98*

¹⁰⁷ Can A. Kök hücre tanımları. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:15-23*

¹⁰⁸ Can A, Karahüseyinoğlu S. Concise Review: Human Umbilical Cord Stroma with Regard to the Source of Fetus-Derived Stem Cells. *Stem Cells* 2007; 25:2886-2895

¹⁰⁹ Elçin YM. Embriyonik kök hücreler. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:23-29*

¹¹⁰ Beksaç M. Kök hücre kaynağı olarak kordon kanı. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:29-39*

¹¹¹ Çamurdanoğlu B Z, Kansu E. Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:41-51*

¹¹² Çetinkaya D U. Mezenkimal kök hücreler. *Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:53-62*

¹¹³ Acartürk O. Bone tissue engineering: Plastic surgery perspectives. *Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi* 2007;15(2):94

¹¹⁴ Uysal A Ç, Mizuno H, Tobita M, Itoi Y et al. Yağ dokusu hücrelerinin in vitro osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşması. *Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi* 2007;15(2):55

¹¹⁵ Keskin M, Kelly CP, Gonzales A, Lobocki C et al. Rat kalvariyal kemik defektlerinin onarımında osteoblastların ekildiği ince bağırsak submukoza kullanımı. *Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi* 2007;15(2):53

¹¹⁶ Hasırcı V. Doku mühendisliğinde hücre taşıyıcıları: malzeme ve form. Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi 2007;15(2):43

¹¹⁷ Ural AU. Hematopoetik kök hücrenin farklılaşma kapasitesi. Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi 2007;15(2):22

¹¹⁸ Özçelik T. Kök hücre araştırmalarında ülkemizde ve dünyada yasal düzenlemeler. Türk Plastik Rekonstrüktif Cerrahi Dergisi 2007;15(2):20

¹¹⁹ Wang Q, Steigelman M B, Walker J A, Chen S et al. In Vitro Osteogenic Differentiation of Adipose Stem Cells After Lentiviral Transduction With Green Fluorescent Protein. J Craniofac Surg. 2009;20(6):2193–2199.

¹²⁰ Meier J, Vannier C, Serge A, Triller A, Choquet D. Fast and reversible trapping of surface glycine receptors by gephyrin. Nat Neurosci 2001;4:253-60

¹²¹ Bethesda M D. How Do Researchers Use Markers to Identify Stem Cells? National Institutes of Health U.S. Department of Health and Human Services. 2006; Appendix E: Stem Cell Markers

¹²² Shao Z, Liu, B, Peng Q, Liu W, et al. Transplantation of osteoblast like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. Plastic and Reconstructive Surgery 2007;119(2):500-507

¹²³ Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T et al. Stimulation of Bone Formation by Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 in Callotaxis Bone Lengthening of Rabbits. Calcic Tissue Int 1999;64:542-546

¹²⁴ Kitoh H, Kitakoji T, Tsuchiya H, Mitsuyama H et al. Transplantation of marrow derived mesenchymal stem cells and platelet rich plasma during distraction osteogenesis a preliminary result of three cases. Bone 2004;35(4):892-898

¹²⁵ Richards M, Waanders NA, Weiss JA, Bhatia V, et al. Reduced gap strains induce changes in bone regeneration during distraction. *J. Biomech. Eng* 1999;121,(3):348-356

¹²⁶ Rivas R, Shapiro F. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84-A(1):85-100

¹²⁷ Öztürk A, İlman AA, Sağlam H, Yalçinkaya U et al. The effects of phytoestrogens on fracture healing: experimental research in New Zealand white rabbits. *Ulusal Travma Acil Cerrahi Derg* 2008;14(1):21-27

¹²⁸ Özeç İ, Yeler H. Bone morphogenetic proteinler ve osteoindüksiyon. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2003;6(1):31-35

¹²⁹ Swennen G, Schliephake H, Demof R, Schierle H, et al. Craniofacial distraction osteogenesis: a review of the literature Part 1: clinical studies. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg* 2001;30:89-103

¹³⁰ Pfeilschifter J, Erdmann J, Storch S, Ziegler R et al. Changes in the concentration of Insulin-Like Growth Factor I and Transforming Growth Factor β in rat femoral bone during growth. *Calcif Tissue Int* 1999;64:78–82

¹³¹ Schneider R A, Hu D, Helms J A. From head to toe: conservation of molecular signals regulating limb and craniofacial morphogenesis. *Cell Tissue Res* 1999;296:103–109

¹³² Sevin K. Doku mühendisliği. Ders notları, Ankara

¹³³ Bouletreau PJ, Warren SM, Longaker MT. The molecular biology of distraction osteogenesis. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 2002;30:1-11

¹³⁴ Murray JH, Fitch R D. Distraction Histogenesis: Principles and Indications. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 1996;4(6):317-327

¹³⁵ Hwang Y J, Choi J Y. Addition of Mesenchymal Stem Cells to the Scaffold of Platelet-Rich Plasma Is Beneficial for the Reduction of the Consolidation Period in Mandibular Distraction Osteogenesis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2010;68(5):1112-1124

¹³⁶ Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T et al. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1997;79-B:824-830

¹³⁷ Ali MN, Ejiri S, Kobayashi T, Anwar RB et al. Histologic study of the cellular events during rat mandibular distraction osteogenesis. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2009;107:325-335

¹³⁸ Meyer U, J Kleinheinz J, Joos U. Biomechanical and clinical implications of distraction osteogenesis in craniofacial surgery. Journal Of Cranio-Maxillofacial Surgery 2004;32:140-149

¹³⁹ Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. Orthop Clin North Am 1987;18:213-25

¹⁴⁰ Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational Research for Injectable Tissue-Engineered Bone Regeneration Using Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma: From Basic Research to Clinical Case Study. Cell Transplantation 2004;13(4):343-355

¹⁴¹ Danoviz ME, Bassaneze V, Nakamuta JS, Santos-Junior GR et al. Adipose tissue-derived stem cells from humans and mice differ in proliferative capacity and genome stability in long-term cultures. Stem Cells Dev. 2010

¹⁴² Steen H and Fjeld TO. Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis. Clin Orthop Rel Res 1989;247:297-305

¹⁴³ Yasui N, Kojimoto H, Sakaki K et al. Factors affecting callus distraction in limb lengthening. Clin Orthop Rel Res 1993;293:55-60.

¹⁴⁴ Aronson J, Shen, X. Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. Clin Orthop Rel Res 1994;301:25-30.

¹⁴⁵ Bilgili H, Kürüm B, Yardımcı C. Ilizarov'un Sirküler Eksternal Fikzasyon Sistemi Bölüm III: Ilizarov Tekniği İle Anguler Deformitelerin Veteriner Cerrahi Dergisi 2002;8(3-4):96-106

¹⁴⁶ Kızılkaya A. Distraksiyon osteogenezinde sinir büyüme faktörünün (NGF) yeni kemik oluşumuna etkileri: Tavşanlarda deneysel çalışma. Tez çalışması. D.E.Ü.T.F. 2007, İzmir

¹⁴⁷ Uludag H, D'Augusta D, Golden J, Li J et al. Implantation of recombinant human bone morphogenetic proteins with biomaterial carriers: A correlation between

protein pharmacokinetics and osteoinduction in the rat ectopic model. *J Biomed Mater Res* 2000;50:227-38.

¹⁴⁸ Groeneveld EH, Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000;142:9-21.

¹⁴⁹ Hamanishi C, Yoshii T, Totani Y, Tanaka S. Lengthened callus activated by axial shortening. Histological and cytomorphometrical analysis. *Clin Orthop Relat Res* 1994;(307):250-4.

¹⁵⁰ Walsh S, Reindl R, Harvey E, Berry G, Beckman L et al. Biomechanical comparison of a unique locking plate versus a standard plate for internal fixation of proximal humerus fractures in a cadaveric model. *Clinical Biomechanics* 2006;21: 1027-1031

¹⁵¹ Kinoshita K, Hibi H, Yamada Y, Ueda M. Promoted New Bone Formation in Maxillary Distraction Osteogenesis Using a Tissue-Engineered Osteogenic Material. *J Craniofac Surg* 2008;19(1):80-7.

¹⁵² Codivilla A. On the Means of Lengthening, in the Lower Limbs, the Muscles and Tissues Which are Shortened Through Deformity. *Clin Orthop Relat Res* 2008;466:2903–2909

¹⁵³ Cowan C, Shi YY, Aalami OO, Choy YF et al. Adipose derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology* 2004;22:560 - 567