

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

KIRIK İYİLEŞMESİNDE HÜCRE ORİJİNİ VE
DİFERANSİASYONUNUN AKIM SİTOMETRİ
İLE İNCELENMESİ

UZMANLIK TEZİ

Dr. ADEM ERKUT

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. CELAL BAKİ

TRABZON-1999

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
3. MATERYAL VE METOD.....	16
4. BULGULAR.....	19
5. TARTIŞMA.....	37
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	43
7. ÖZET.....	44
8. İNGİLİZCE ÖZET.....	45
9. KAYNAKLAR.....	46

GİRİŞ

Artan teknolojik gelişmeyle beraber, trafik iş ve spor kazaları alınan tedbirlere rağmen gün geçtikçe artmaktadır. Bu kazalarda travmaya uğrayan kişilerde meydana gelen yaralanmaların büyük bir kısmı kendini kas-iskelet sisteminde kırık şeklinde gösterir. Yaralının fiziksel ızdırabı yanında sosyo-ekonomik ve özel şartlar, kişinin bir an önce iyileşip normal hayata döndürülmesini zorunlu kılmaktadır. Bu nedenle kırık tedavisi ortopedik cerrahinin en fazla uğraşılan konularından biridir (1).

Ortopedik cerrahide kırık iyileşmesinin biyolojik yönü, sosyo-ekonomik ve ekolojik şartlara göre daha cezbedicidir. Kırık iyileşmesinde temel olay hücre proliferasyonu ve hücre farklılaşmasıdır. Fakat kırık kallusunu meydana getiren hücrelerin anatomik orijini ve farklılaşması konusunda literatürde halen tam fikir birliği yoktur. Kırık iyileşmesinde görev alan hücrelerin anatomik orijinini ve farklılaşmasını saptamak için ışık mikroskobu, elektron mikroskobu, x ışını difraksiyonu sintigrafi, otoradyografi ve insitu hibridizasyon düzeyinde bir çok çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalarda hangi bölgede hangi hücrelerin sayıca arttığı ve mitotik faaliyet gösterdiği tespit edilmesine rağmen kemik ana hücrelerinin anatomik orijini ve diferansiasyonu hakkında kesin kanaate varılamamıştır (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 17, 19, 20).

Son yıllarda lazer ışınlarının tıpta kullanılmasıyla yeni metotların geliştirilmesi sonucu bir çok fizyo-patalojik olayın biyomoleküler düzeyde incelenmesi mümkün hale gelmiştir. Floresan aktiviteli analiz ve ayırma yöntemi başka bir ifade ile akım sitometri veya flowcytometry (FCM) başvuru alan yeniliklerden bir tanesidir. Günümüzde bir çok alandaki çalışmalarda kullanılan akım sitometri orijinal olarak hücre ve bileşenlerini analiz etmek için geliştirilmiş, tek hücre düzeyinde, hızlı, istatistiksel ve kantitatif tayin sağlayan bir sistemdir. Bu sistemle hücrenin fiziksel özellikleri, yüzey antijenleri, reseptörleri, hücre içi bileşenleri DNA-RNA tayinleri ve diğer hücresel parametrelerin kantitatif tayinleri yapılabilmektedir (7, 36, 37, 38, 39, 40, 41).

Bu çalışmanın amacı kırık iyileşmesinde hücre orijini ve farklılaşmasını son yıllarda kullanılmaya başlanan akım sitometri ile incelemektir. Bunun için Sprague-Dawley cinsi erişkin rat tibialarında dijital kompresyon yöntemiyle kırık oluşturularak belirli periodlarda akım sitometrik DNA analizleriyle, kırık iyileşmesinde hücre orijini ve farklılaşması hücre siklusunun G2/M fazı dikkate alınarak araştırılmıştır.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Ana Hücresinin Orijini

Kırık iyileşmesi bir çok hücre tiplerinin katılımıyla oluşan koordineli kompleks fizyolojik bir süreçtir. Ancak esas biyolojik hadise, yalnız kemik dokusuna farklılaşan kemik ana hücresinin proliferasyonu ve osteoblasta farklılaşmasıdır. Farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden köken alan bu ana hücrenin anatomik orijini; kemik iliği, kemik korteksi, periost ve eksternal yumuşak dokudan biri veya bir kaçı olabileceği bildirilmiştir. Çünkü kırık iyileşmesinde olaylar bu dört anatomik bölgede cereyan etmektedir (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 17, 20, 25).

2.1.1. Kemik İliği

Kemik iliği; kemik, kıkırdak, adale, tendon ve diğer konnektif dokuya farklılaşma yeteneğine sahip progenitor hücre popülasyonuna sahiptir (9, 10, 11, 12, 13, 14). Kırık iyileşmesinde kemik iliğinin cevabı üzerinde yapılan çalışmalarda kırıktan birkaç saat sonra kemik iliğinde düşük hücresel dansiteli ve yüksek hücresel dansiteli bölgeler tespit edilmiştir. Düşük dansiteli alanda kan damarları ve normal kemik iliği elemanları kaybolmaya devam ederken, yüksek dansiteli bölgede endotelial hücrelerin osteogenik öncü hücrelere transformasyonu gözükür. Kırıktan sonra 24 saat içinde hızlı bir osteoblastik fenotip ve kemik oluşumu başladığı gösterilmiştir (2, 45).

2.1.2. Kemik Korteksi

Kırık olayında korteksin verdiği cevap primer kemik iyileşmesi yönündedir. Primer kortikal iyileşmede fragmanların kaynaması için korteksin mekanik devamlılığının yani anatomik reduksiyonun sağlanması ve stabilizasyonu gerekir. Bu durum ancak rijit internal fiksasyon ile olur. Bu şartlar altında kırığın bir tarafındaki kemik rezeksiyon hücreleri kan damarlarının penetrasyonu için yeni haversion sistemlerinin kurulmasını sağlar. Yeni kan damarları, osteoblastlar için osteoprogenitor hücrelerden oluşan perivasküler mezenşimal

hücreler ve endotelial hücrelere eşlik ederler. Böylece hücrel ve vasküler temas sağlanır ve olay kaynama ve yeniden şekillenmeyle ile sonuçlanır (2, 9, 17, 20).

2.1.3. Periost

Bütün kemiklerde komşu bağ dokusuyla kemik arasında yer alan ve kemik yüzeyini dıştan örten doku periost olarak adlandırılır. Periost dışta fibroz tabaka içte hücreden daha zengin daha vaskuler olan osteogenik tabakadan meydana gelir (14, 15). Kırık iyileşmesinde en önemli katkıyı sağlayan oluşum periosttur(2,4,8,17). Kırık iyileşmesinde periost, kemik, kas dokusu ve kemik medullası uyum içinde bulunurlar. Periosta bağımlı osteoprogenitor hücreler ve bağımsız indiferansiye mezenşimal hücreler intramembranöz ossifikasyon ve kondroprogenitor hücre farklılaşmasıyla enkondral kemik formasyonu ile kırık iyileşmesine katkıda bulunurlar (16,17,19).

2.1.4. Eksternal Yumuşak Doku

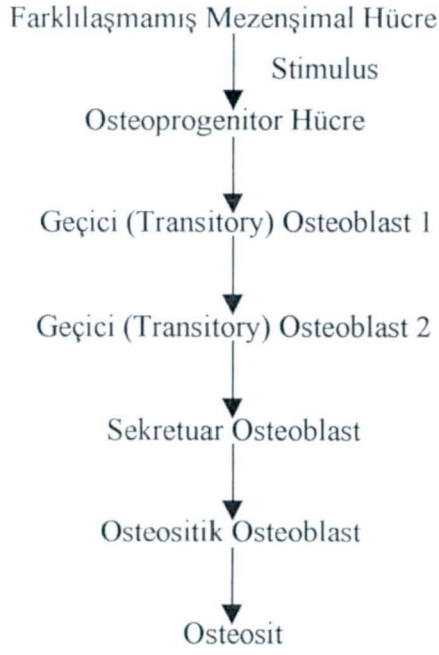
Kırık iyileşmesinde eksternal yumuşak doku cevabı hızlı hücrel aktivite ve stabilize kırık fragmanlarının erken kallus oluşumuna yardımcı olma yönündedir. Bu fonksiyon mekanik faktörlerin ağırlığına bağlıdır ve rijit immobilizasyonla deprese edilebilir. Miyozitis ossifikans olayında osteoblast orijini yumuşak doku kaynaklı olmasına rağmen eksternal yumuşak dokuların kırık kallusuna direkt hücrel katkıları halen tartışmalıdır (1, 2, 5, 6, 17, 20).

2.2. Kırık İyileşmesinde Rol Oynayan Hücreler

Kırık iyileşmesinde rol oynayan hücrelerin tümü farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden orijin alırlar(1,2,9,10,11). Bu hücreler ya intramembranöz ya enkondral kemik formasyonu ile, ya da kemik rezorpsiyonuyla kırık iyileşmesine yardımcı olurlar (1,15,16,17,18,19,20).

2.2.1. Osteogenik Seri Hücreleri

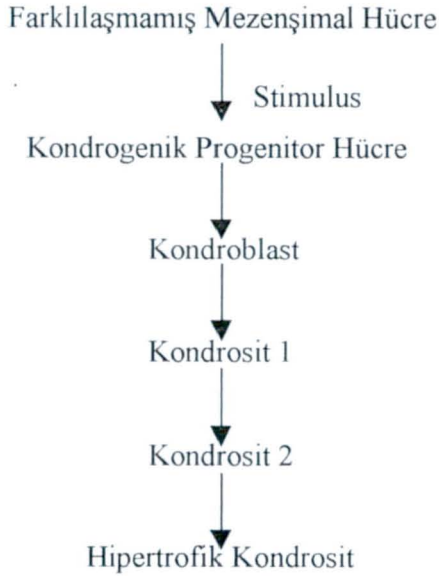
Bu hücreler; intramembranöz ossifikasyon ve sekonder kemik yapımıyla kırık iyileşmesine katkıda bulunurlar. Bunlar; osteoblast, osteosit ve bu hücrelerin ana hücresi osteoprogenitor hücrelerdir. Ancak osteoprogenitor hücrenin sentez ve sekresyon kabiliyeti yoktur (2, 10, 14, 15, 16, 17, 19) (Şekil 1).



Şekil-1: Osteogenik seri hücrelerinin proliferasyonunu ve diferansiasyonu

2.2.2. Kondrogenik Seri Hücreleri

Kırık iyileşmesine endokral ossifikasyon yolu ile katkısı olan kondroblast ve kondrositler farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden köken alan kondrogenik progenitör hücrelerin proliferasyon ve diferansiasyonu sonucu oluşurlar (9, 10, 19) (Şekil 2).



Şekil-2: Kondrogenik seri hücrelerinin proliferasyon ve diferansiasyonu

2.2.3. Kemik Rezorbe Eden Hücreler

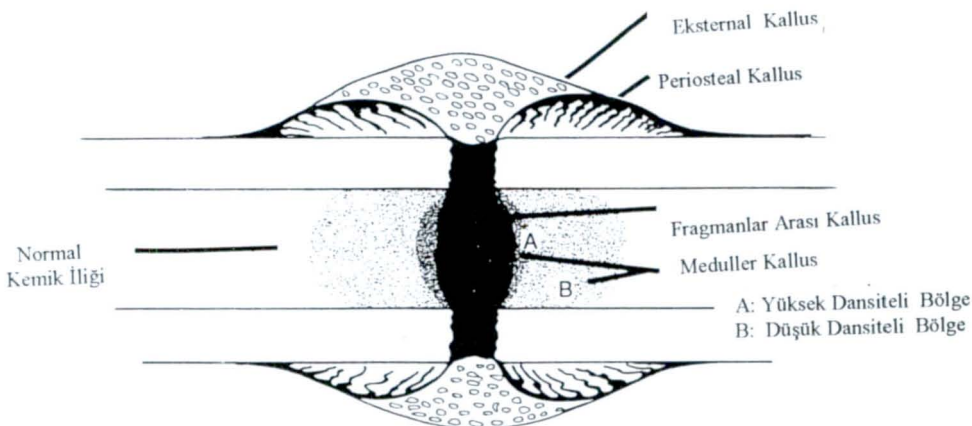
Major belki de tek kemik rezorbe eden hücre olan osteoklastların orijinleri hakkında çeşitli görüşler vardır. Sirkulasyondaki monositlerin farklılaşması (20), kemik iliği mononükleer hücrelerinin asenkronize füzyonu (15,16), osteogenik hücrelerin birleşmesi veya osteositlerin maturasyonu (14), ya da kemik iliği mononükleer fagositik sistemde klonal stimülasyon sonucu oluştuğu (16) bildirilmiştir.

2.3. Kırık İyileşmesinin Morfolojisi

Kırık iyileşmesi, kırık oluştuğu an başlar ve olgun organize kemik dokusu ile kırık uçları bütünleşinceye kadar devam eder. Kırık iyileşmesinde kemiğin oluşumu; iskeletin gelişimi, büyümesi ve devamlılığını sağlayan mekanizmanın aynısı ile gerçekleşir. Bu mekanizmaya osteoblast tarafından sentezlenen kemiğin özelleşmiş organik matriksinin yüksek derecede organize mineralizasyonu ve matür kemik oluşumundaki yeniden şekillenme de dahildir (1, 19, 20).

Klasik histolojik dönemlerde kırık iyileşmesi; direkt kortikal temas sağlanmasını gerektiren primer iyileşme, periost ve eksternal yumuşak doku cevabını gerektiren kallus oluşumuyla sekonder iyileşme diye sınıflandırılırdı (1, 2, 20).

Kırık iyileşmesinde en hızlı iyileşme konservatif tedavi edilen ve erken kas egzersizleri başlatılan eksternal veya periostal kallus ile olan iyileşmedir. İkinci kırık iyileşmesi eksternal kallus yetersizliği halinde rijit tespit ve kompresyon plak tespiti ile yardım edilen ve geç görülen meduller kallustur. Üçüncü iyileşme şekli ise rijit tespite bağlı direkt kortikal teması gerektiren çok yavaş ilerleyen primer iyileşmedir(1,17)(Şekil3)



Şekil-3: Kırık iyileşmesinde, Eksternal kallus, periostal kallus ve meduller kallus oluşumu.

2.3.1. Kırık İyileşmesinde Enkondral Ossifikasyon

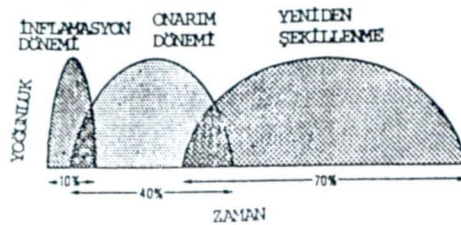
Deplase hareketli kırık bölgesinde yeni kemik formasyonuna önderlik eden enkondral ossifikasyon kondrositlere farklılaşan ve bir kartilojen matriks salgılayan farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin proliferasyonu ile başlar. Hiyalen veya hiyalen benzeri kırıkta oluşur. Sonra kondrositler matüre olarak matriks vezikülleri taşıyan bir miktar mineralizasyon yapabilen hipertrofik kondrositlere dönüşür. Kalsifiye matriks kırıktan iki hafta sonra kan damarlarının invazyonuna uğrar. Hipertrofik kondrositler apoptozise uğrar yerlerini vasküler invazyonla gelen farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden köken alan osteoprogenitor hücrelere bırakır. Osteoprogenitor hücre osteoblasta farklılaşır. Yeni osteoblastlar mineralize kartilaj üzerine bir kemik matriksi oluştururlar. Sonra osteoklastlar bu immatür kemiği rezorbe ederler ve osteoblastlar olgun, lamelli kemiği yeniden oluştururlar. Bu olay demineralize kemik matriksinden salınan büyüme faktörleriyle stimule edilir (2, 16, 19).

2.3.2. Kırık İyileşmesinde İntramembranöz Ossifikasyon

Kırıktan sonra farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin periost ve membranlara agregasyonu intramembranöz ossifikasyonu başlatır. Bu hücrelerden önce osteoprogenitör hücre ve nihayet kemik formasyonunu sağlayan osteoblast oluşur. Osteoblastlar ürettikleri matriksle kendilerini sınırlayıp osteosite dönüşürler. Oluşan immatür kemik osteoklast tarafından rezorbe olurken osteoblastlar yeni lameller kemiği oluşturur (2, 15, 16, 19, 20).

2.3.3. Kırık İyileşmesinin Safhaları

Kırık iyileşmesi uygun bir şekilde safhalara bölünebilir. Ancak bir safha, daha sonra gelen bir safhanın içinde daima vardır ve her bir safha, bir sonra gelen safhanın içinde bu safhanın erken bir dönemi olarak görülür. Bu olaylar üç safhada gerçekleşir. Bunlar; kırık hematomu ve organizasyonu (inflamatuvar) safha, Onarım (kallus) safhası, Yeniden şekillenme (Remodelig) safhasıdır (1, 17, 20) (Şekil 4).



Şekil-4: Kırık iyileşmesinin inflamasyon, onarım ve remodeling dönemlerinin yaklaşık sürelerine ait şema

2.3.3.1. İnflamutuar Safha veya Hematom Dönemi

Kemikte kırık oluşurken aynı anda kan damarları, periost, kemik iliği yırtılır ve çevre yumuşak dokular hasar görür. Kırık çevresine bol miktarda kan sızar. Aynı zamanda mast hücrelerinden vazoaktif aminler salınır. Koagulasyon faktörlerinin etkisiyle kan koagüle olur, kırık hematomu şişlik ve klasik inflamutuar cevap oluşur (1, 17, 20).

Kırık hematomunda osteogenik hücre bir çok çalışmada gösterilememiştir. Bunun için kırık hematomunun kallus oluşumuna katkısı daima tartışılmıştır. Ancak son zamanlarda yapılan biyomoleküler çalışmalar, kırık hematomunun hücrel olay zincirini tetiklemesini sağlayan moleküllerin kaynağı olduğunu göstermiştir. Kırık iyileşmesinin erken döneminde kemotaksis, mitozis, proliferasyon, diferansiyasyon, apoptozis, matriks sentezi, kemik rezorpsiyonu ve anjiogenezis olaylarının düzenlenmesinde rol oynayan bir çok molekül gösterilmiştir. Bunlar; İnterleukin 1,6 (IL-1, IL-6) gibi gizli sitokinler, trombosit degranulasyonu ile salınan Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ve Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), kırık uçlarının demineralize matriksinden salınan TGF- β süper familyasının bir alt grubu olan Bone Morfogenetic proteinler (B.M.Ps), Asidic ve Bazik Fibroblast Growth Factorler (aFGF, bFGF), İnsulinlike Growth Factor (IGF) gibi morfogenik ve mitogenik moleküllerdir (2, 8, 16, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29).

2.3.3.2. Onarım (Kallus) Dönemi

Kırık iyileşmesinin bu döneminde, gizli stokinler ve morfogenik ve mitogenik moleküllerin etkisiyle intramembranöz ve enkodral kemik formasyonu ile kırık kallusu oluşur. Erken dönemde kallus; kanlanmanın iyi olduğu O₂ saturasyonunun yüksek olduğu periost yakınında intramembranöz kemik formasyonu ile oluşan sert kallustan ve O₂ saturasyonunun düşük olduğu bölgelerde enkondral ossifikasyonla oluşan yumuşak kallustan oluşur (1, 2, 17, 20).

Onarım fazının geç döneminde Tip1 kollajenden zengin organik matriksin Osteokalsin, Osteonektin, Osteopontin, Fibronectin, Trombopontin, Biglikan, Decorin ve Kemik Sialoprotein gibi non-kollegen proteinlerin etkisiyle mineralizasyonu sonucu immatür kemik yapımı tamamlanır ve kırık uçlar kallus vasıtasıyla birbirine tutunur. Sonuç olarak klinik kaynama ortaya çıkar ve radyolojik incelemede kırık bölgesinde fusiform kallusla bir birleşme olduğu görülür. Buna rağmen kırık iyileşmesi tamamlanmamıştır.

Oluşan bu immatür kemik normal kemikten daha zayıftır. Tam sağlamlığına yeniden şekillenmeden sonra kavuşur ve kırık iyileşmiş olur (1, 2, 16, 17, 19, 20).

2.3.3.3. Yeniden Şekillenme Dönemi (Remodeling)

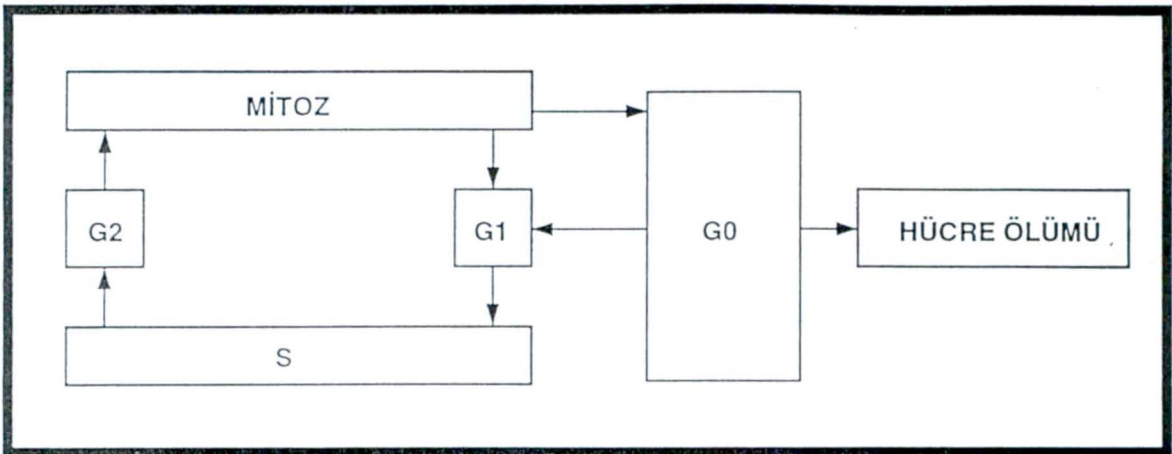
Tamirin son fazında kallus dokusu yeniden şekillenerek immatür kemiğin yerini matür lameller kemik dokusu alır. Fazla kemik dokusu rezorbe edilir. Yeniden şekillenme; Paratroid hormon (P.T.H), kalsitonin, insulin, Growth Hormon (GH), 1, 25. Dihidroksi vitamin D₃ ve troid hormonları gibi sistemik hormonların, TGF- β süper familyasına ait Bone Morphogenetic Proteinler (BMPs), İnsulinlike Growth Factor (İGF), Fibroblast Growth Factors (FGFs), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) interleukin ve prostoglandinler gibi lokal faktörler tarafından düzenlenen kompleks bir işlemdir (1, 16, 20).

Kırık kaynayıp, hastanın fonksiyonlarının tamamen yerine geldikten sonra ve radyografide kompakt kemik teması görüldükten sonra da kırık bölgesinde yeniden şekillenme aktivitesi devam eder. Tüm immatür kemik lameller kemiğe değiştirildikten sonra, yeniden şekillendirme; gereksiz olan trabeküllerin osteoklastik aktiviteyle ortadan kaldırılması, osteoblastik aktiviteyle kuvvet çizgisi boyunca yeni lameller kemik formasyonu şeklinde devam eder (1, 16, 19, 20).

HÜCRE SIKLUSU

Canlı organizmaların büyüme ve gelişmesi kendilerini oluşturan hücrelerin büyüme, proliferasyon ve diferansiasyonu ile sağlanır. Çok hücreli diploid organizmalarda tüm hücreler ovumun fertilizasyonu sonucu oluşan zigottan köken alır. Zigotun mitotik aktivitesi organizma gelişiminin temelidir. Zigottan proliferasyon ve diferansiasyon sonucu bölünebilme yeteneği açısından zigotla aynı DNA'yı taşıyan üç çeşit hücre teşekkül eder. Kemik iliğinin hematopoieziste rol alan hücreleri, derinin germinal tabakası ve barsak epitel hücreleri gibi hücreler sürekli yenilenirken hepatositler gibi bazı hücre grupları ancak hücre kaybı gibi bazı özel şartlarda özel stimulasyonla çoğalırlar. Matür nöronlar ise hayat boyu hiç bölünmezler (30, 31, 32, 33).

Hücre siklusu bir hücrenin mitoz hazırlanması (interfaz) ve mitoz bölünmeyi ihtiva eden iki interfaz arasındaki devredir. Memelilerin somatik hücrelerinde hücre siklusunun beş dönemi vardır. Bunlar G₀ (Postmitotik istirahat fazı G=gap), G₁ (Proliferasyon fazı), S (Sentez fazı), G₂ (Premitotik) faz ve M (Mitoz fazı) dönemleridir. G₁, S ve G₂ fazları interfazı (İF) oluşturur ve interfaz hücre siklusunun %90'ından fazlasını ihtiva eder (34, 35) (Şekil-5).



- G₀= Prolifere olmayan, siklus dışı hücreler
 G₁= RNA ve protein sentezinin başladığı dönem
 S = DNA sentezinin başladığı, RNA sentezinin sürdüğü, hücrelerin protein içeriğinin en fazla olduğu dönem.
 G₂= DNA sentezinin tamamlandığı dönem. RNA ve protein sentezi G₁'deki kadardır.
 M = Somatik hücre bölünmesi

Şekil-5: Hücre siklusu.

3.1. G₀ Fazı (Postmitotik İstirahat Fazı)

Hücre siklusunun bölünmeyen istirahat halinde olan ve DNA sentezinin bulunmadığı dönemdir. Hücrenin DNA içeriği sabittir. Kromozomlar diploiddir. G₀ fazında; aktivitesi geçici veya sürekli durdurulan hücreler, bir anlamda siklustan çekilir, metabolizmalarını değiştirir veya büyümelerini durdururlar. Bu hücreler fonksiyonlarını tamamladıktan sonra ölür veya bir stimülasyonla bölünme uyarısı alırlarsa siklusa girerler (34, 35).

3.2. G₁ Fazı (Proliferasyon Fazı)

DNA sentezinin hemen önündeki evredir. Hücreler için G₁ fazı proliferasyona geçişte spesifik yollar kapsar ve hücreler DNA sentezine hazırlanır. İnsan vücudundaki farklılaşmamış hücrelerin %95'inden çoğu bu fazdadır. Hücre bölünme yönünde çevreden aldığı stimulus ile mRNA sentezini başlatır. Bu hücrelerin DNA içerikleri 2N olarak ifade edilen diploid özelliktedir. Bu fazın sonunda DNA sentezi başlar (34, 35).

3.3. S Fazı (Sentez Fazı)

Aktif DNA sentez ve replikasyonunun gerçekleştiği bu dönemde hücrelerin DNA içeriği 2N-4N arası artış gösterir. Yaklaşık 7-8 saat sürer. S fazı hücrenin DNA'sı replike olana kadar devam eder. DNA içeriği 4N olması ile S fazı sonlanır bunu kısa bir G₂ fazı izler (34, 35).

3.4. G₂ Fazı (Premitotik Faz)

Sentez ve mitoz fazları arasında gerçekleşen bu kısa dönemde hücrenin DNA içeriği tetraploiddir (4N). Ortalama dört saat kadar sürer. Protein ve RNA sentezi bu fazda da devam eder (34, 35).

3.5. M. Fazı (Mitoz Fazı)

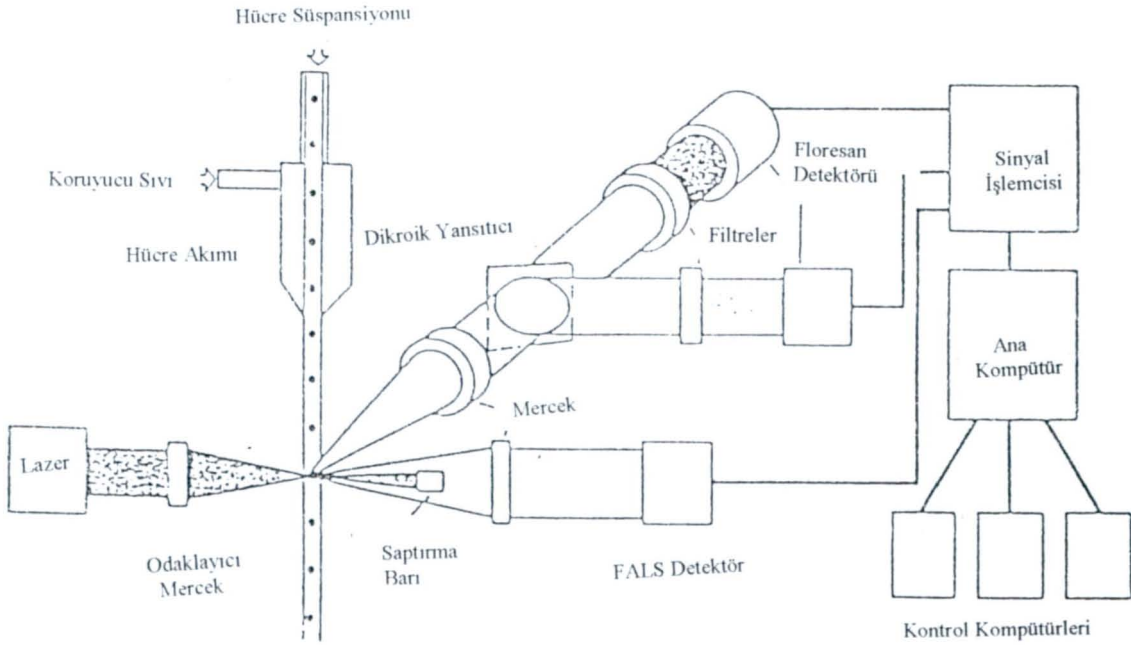
Ökaryotik hücreler mitozda kromozomlarını ikiye ayırırlar. Bu dönemde önce nükleer bölünme ve bunu takiben şitokinezis meydana gelir. Sitokinezisin tamamlanmasıyla diploid ana bir hücreden iki diploid yavru hücre meydana gelir. Bu yeni iki hücrenin her biri intërfazın S fazında DNA replikasyonu ile oluşan, birbirinin ve ana DNA molekülünün tamamen aynısı olan iki DNA'dan birini alır ve kalıtım yükü olarak

birbirinin aynısı olurlar. Mitoz bölünme tamamlandıktan sonra hücreler hücre siklusundan çıkarak G0 veya G1 fazından birine geri dönerler. Genellikle Profaz, Metafaz, Anafaz ve Telofaz bölümleriyle incelenen mitoz, memeli hücrelerinde 30 dakika ile 2,5 saat kadar sürmesine karşın ortalama bir saat olarak kabul edilir (34, 35).

Bir hücrede proliferasyon ve diferansiasyon ancak mitoz olayının varlığında gerçekleşebilir. Kırık iyileşmesinde rol alan osteoprogenitor ve kondroprogenitor hücrelerin hangi dokudan köken aldığını tespit etmek için o dokuda mitoz varlığını incelemek gerekir. Bir hücre siklusunda mitozu G2/M fazı gösterir (14, 34, 35). Bunun için bu çalışmada G2/M fazının değerleri esas alınarak iatistiksel çalışmalar yapılmıştır.

AKIM SİTOMETRİ

Akım sitometri; tek tek hücrelerin veya diğer biyolojik partiküllerin, cihaz içine bir sıvı içerisinde tek sıra halinde alınarak fiziksel ve kimyasal özelliklerinin değerlendirildiği bir yöntemdir. Bu düzenek, bir çok farklı sistemin birleşimi ile ortaya çıkan oldukça karmaşık bir yapıya sahiptir (7, 34, 36, 37, 38) (Şekil 6).



Şekil-6: Akım sitometri düzenekinin şematik görünümü

Akım sitometri çalışmasının ilk aşamasında özel yöntemlerle taze veya parafine gömülü dokulardan hazırlanan ve nükleik asitlere bağlanan, bağlandıkları yerde floresan veren florokrom boyalarla işaretlenen örneklerin akım sistemi içinden geçirilerek akım odasına ulaşmaları sağlanır. Bu geçiş esnasında hücreler tek sıra halinde olup, lazer ışığı altında uyarılarak görünür hale gelirler. Lazer kaynağı olarak genellikle Argon iyonu kullanılır. Alternatif olarak Crypton, Helium, Cadmium gibi yüksek yoğunluktaki ışık kaynakları da uygulanabilir. Bu şekilde, hücreye bağlı florokromun lazer ışınlarıyla aktifleşmesi, ışığın yoğunluğuna bağlı olarak hücrenin boyutu, iç yapısı, yüzey morfolojisi ve hücrenin canlılığı hakkında bilgi edinme imkânı doğurur. Boyanın floresan emisyonu hassas fotodiodlarda toplanır ve "photomultiplier tubes" denilen özel sistemle elektrik sinyaline çevrilerek amplifiye edilir ve bilgisayar sistemine aktarılır. Böylece birkaç dakikalık süre içinde 10.000-1.000.000 hücrenin her birinin özellikleri teker teker belirlenebilir (34, 36, 37).

Akım sitometri son yıllarda, hematopatoloji, immunopatoloji ve sitopatolojide temel olarak; kantitatif tek hücre düzeyinde hızlı ve çok parametrelili analiz, hücrelerin fonksiyonel, morfolojik veya sitogenetik yapılarının tanımlanması, hücre subgruplarının ayırımı işlemi ve yapısal farklılaşmalarının belirlenmesi amacıyla ileri bir tanı yöntemi olarak kullanılmaktadır (7, 36, 38).

Akım sitometri ile prognostik olarak hücre süspansiyonlarında hücrelerin DNA içeriği ve proliferatif aktivitelerinin tayini mümkün olabilmektedir. DNA'ya spesifik olan boyaların kullanılmasıyla yapılan DNA analizi sonucu, uzun ve pahalı olan konvansiyonel yöntemlerle gözden kaçabilen aneuploidik küçük hücre grupları bile saptanabilir. DNA analizi ile G_0 ve G_1 fazında bulunan hücrelerin ortalama DNA içeriği ve hücre siklusunda her fazda bulunan hücreler ile birbirlerine oranı tespit edilebilir. Pratikte DNA analizi yapılırken normal ve anormal hücrelerin mitotik aktiviteleri ve proliferasyon kapasiteleri hakkında da eş zamanlı olarak doğru ve güvenilir bilgiler elde etmek mümkündür (36, 38).

DNA analizi temelinde; hücrelerin "propidium iodide", "ethidium bromide", "mithramycine" gibi DNA'ya spesifik boyalarla boyanması yatmaktadır. Rutin uygulamada hata payı az olduğundan propidium iodide tercih edilmektedir (37, 39).

DNA'ya bağlanan boyanın miktarı ve dolayısıyla fotodedektörlerce algılanan ışığın yoğunluğu hücrenin DNA içeriği hakkında doğru orantılı bilgi verir. Böylece hücre popülasyonunda DNA'da ortaya çıkan bir kayıp veya ilave (aneuploidi) tespit edilebilir (40).

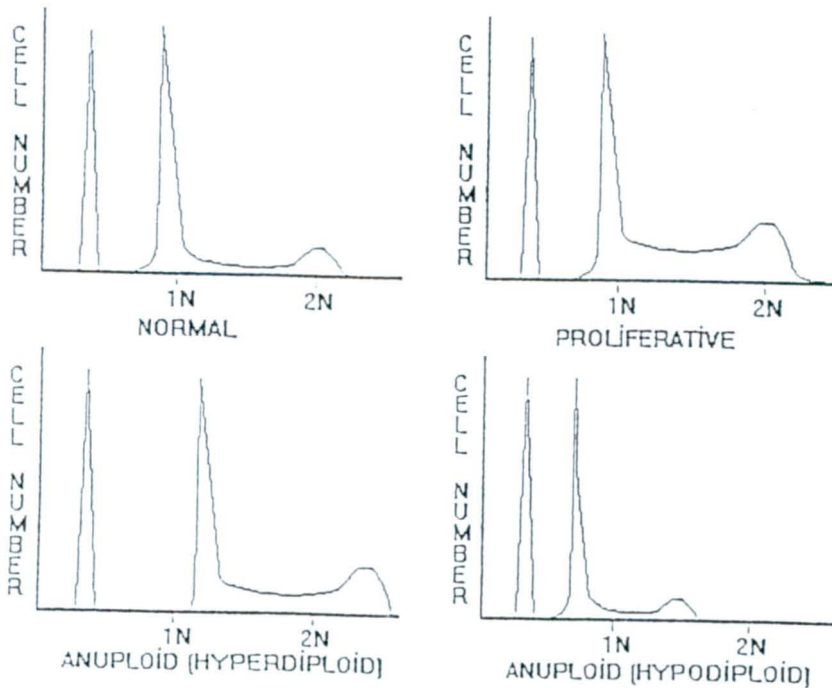
Normal bir DNA histogramında G_0/G_1 fazında bulunan hücreler, daima en yüksek fraksiyona ve diploid DNA ($2N$) içeriğine sahiptirler. DNA içeriği kromozomların sayısı ve büyüklüğü ile ilgili olup her canlı için sabittir. Hücreler G_2 ve M fazına ulaştıklarında DNA içeriği tam iki katına çıkar ($4N$) ve G_2/M fazındaki hücreler G_0/G_1 pikinden daha uzakta ve histogramın sağında yer alırlar. Siklusun S fazındaki hücreler ise $2N$ 'den fazla $4N$ 'den daha az sayıda DNA içeriğine sahip hücreler olup DNA histogramında söz konusu iki hücre grubu arasında izlenirler (38, 41).

DNA histogramlarında y eksenini hücre nükleusu ve dolayısıyla hücre sayılarını x eksenini ise artmakta olan floresanı (DNA miktarını) temsil etmektedir. Aktif proliferasyon göstermeyen bir hücre popülasyonunun analizinde hücre siklusunun S ve G_2/M fazı

fazlaca saptanamaz. Halbuki normal kemik iliği gibi biyolojik olarak aktif bir dokunun analizinde daha yüksek S ve G2/M fazı hücreleri görülebilir (38).

Histogramlarda DNA içeriğinin yayılımı hücre popülasyonunu yansıtan pik çevresinde bir miktar değişiklik gösterir. Bu değişiklik; boyama yöntemine, cihaza ait hatalara veya boya DNA'ya bağlanırken hücreler arasında ortaya çıkan farklılıklar gibi nedenlere bağlı olabilir ve "Coefficient of Variation" (CV) olarak ifade edilir. CV hücre popülasyonunun ortalama pik kanal numarasının standart sapmaya bölünmesiyle belirlenir. Yani CV değeri analizin kalitesini gösterir ve bu değer ne kadar düşükse çalışmanın o kadar güvenilir olduğunu gösterir (37).

Araştırılan popülasyonun DNA içeriği ploidisinin değerlendirilmesinde kullanılan kriter DNA indeksi (DI)'dir. DI değeri örnekteki Go/G1 pik ortalamasının diploid referans hücre Go/G1 pik ortalamasına bölümü ile elde edilen bir değerdir. Diploid bir popülasyonda $DI=1$ olmalıdır. Malign hücreler çoğunlukla normal diploid DNA içeriğinden sapmalar gösterir ve histogramda extra pikler verir. DNA içeriği artmışsa hiperploid azalmışsa hipoploid olarak tanımlanır (36, 37) (Şekil 7).



Şekil-7: Sık rastlanan DNA histogramlarının grafiksel anlamları

MATERYAL VE METOT

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Ana Bilim Dalı tarafından planlanarak, Patoloji Anabilim Dalı'nın katkılarıyla Cerrahi Araştırma ve Uygulama Merkezi Laboratuvarında Mart-Eylül 1999 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada Fizyoloji Ana Bilim Dalı Deney Hayvanları Laboratuvarından temin edilen, ağırlıkları 120-150 gram arasında olan 99 adet Sprague-Dawley türü erişkin rat kullanıldı. Ratların %50'si erkek, %50'si dişi idi. Ratlar Akşehir Yem ve Gıda Ürünleri A.Ş. tarafından üretilen Akyem Buzağı Yemi ile beslenip, su ihtiyacı için musluk suyu kullanıldı.

4.1. Kırık Oluşturma Metodu

Ratlara anestezi için intraperitoneal yolla 30 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar-Parke Davis) verildi. Anestezi sağlandıktan sonra dijital kompresyon yöntemiyle sağ tibia cisim seviyesinde kapalı kırık oluşturuldu. İşlemden sonra hayvanlar normal beslenme ve yaşama şartlarında kafeslerinde bırakıldı.

4.2. Cerrahi Gruplar

Onbir rat kırık oluşturmadan akım sitometri ve patolojik inceleme için ayrıldı (Grup I= Kontrol Grubu). Diğer ratlar 11'erli gruplar halinde ketamin anestezisiyle dijital kompresyon yöntemiyle sağ tibia cisim kapalı kırık oluşturularak Grup-2 birinci gün, Grup-3 üçüncü gün, Grup-4 beşinci gün, Grup-5 yedinci gün, Grup-6 onuncu gün, Grup-7 ondördüncü gün, Grup-8 yirmibirinci gün ve Grup-9 yirmisekizinci gün akım sitometrik ve patolojik inceleme için gruplandırıldı. Her gruptan bir hayvan patolojik inceleme ve on hayvan akım sitometrik DNA analizi için ayrıldı.

4.3. Tibiaların Akım Sitometrik DNA Analizi İçin Hazırlanması

Dijital kompresyon yöntemiyle sağ tibiasında kapalı kırık oluşturulan hayvana inceleme zamanı geldiğinde intraperitoneal 100 mg Pentothal Sodium (Thiopentane Sodium) injekte edilerek sakrifiye edildi. Sonra kırık tibia derisi anterior longitudinal insizyonla sıyrıldı. Tibia dizden ve ayak bileğinden dezartiküle edildi. Disseksiyonla kırık çevresi yumuşak dokular ve periost sıyrılarak ayrı ayrı tüplere Phosphate Buffer (Bio systems) solusyonuna konuldu. Ardından kırık bölgesinin proksimalinden ve distalinden tibia kesildi. Kırık bölgesindeki medulla Phosphate Buffer solusyonu çekilmiş 21 G uçlu enjektörle ayrı bir tüpe yıkandı (Meduller lavaj). Kalan kortikal kısım bisturi ile Phosphate Buffer solusyonlu tüp içine yontuldu. Böylece eksternal yumuşak doku, periost, korteks ve meduller dokular ayrı ayrı dört tüpte Phosphate Buffer solusyonunda ayrılmış oldu.

Disseksiyon ile ayrılmış dokular DNA analizi için tek tek petri kutusu için aktarılarak bisturi ile defalarca parçalandı. Parçalanmış materyaller 16 G uçlu enjektörden defalarca geçirildi. Son olarak parçalı dokular ihtiva eden solusyon DNA Mech (47 mikronmetrelik filtre) li enjektörden geçirilerek kaba partiküllerden ayrıldı. Süzölmüş hücre solusyonu Coulter DNA-Prep Work station cihazına yerleştirilerek Coulter DNA Prep Reagents kitle hücre DNA'ları otomatik olarak boyandı. Yarım saatlik inkubasyondan sonra DNA kontrol ile standandize edilmiş 488 nm argon iyon lazer ışınli akım sitometri cihazında (Coulter Epics elite Esp) DNA analizleri yapıldı. En az 10.000 hücre sayılarak bilgisayar sistemine aktarıldı. DNA histogramında G0/G1, S, G2/M fazındaki hücrelerin oranları, CV değerleri Multicycle programı kullanılarak değerlendirildi. Aynı işlem kontrol grubundaki (Grup-1) 10 sağlam tibiaya da uygulandı.

4.4. Tibiaların Histopatolojik İnceleme İçin Hazırlanması

Her gruptan birer hayvan sakrifiye edildikten sonra kırık tibia derisi anterior longitudinal insizyonla sıyrıldı. Tibia ayak bileği ve dizden dezartiküle edildi. Alınan dokular fosfat tamponlu %10'luk formalinde 24 saat tespit edildi, %10'luk nitrik asitle bir haftada dekalsifiye edildi. Dekalsifiye dokular musluk suyu ile yıkanıp yeniden tespit için %10'luk formol'de 24 saat daha bekletildikten sonra rutin takip sonucu parafin bloklara gömüldü. Bloklardan Reichert marka mikrotomla 5 mikron kalınlığında kesit alındı. Kesitler Hematoksilen-Eozin (H-E)'le ve Masson Trikromla (M-T) boyandı. Boyalı

kesitler Olympus marka ışık mikroskobuyla incelendi. Fotomikroskopta resimleri çekildi ve mikrografları hazırlandı.

4.5. İstatistiksel Değerlendirme

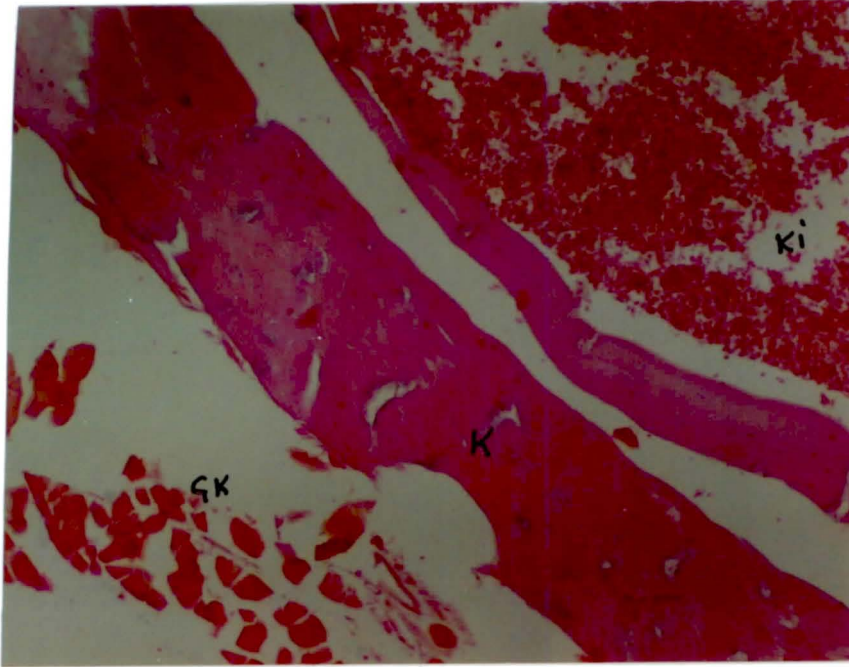
Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 7,5 for Windows paket programı kullanıldı. Gruplar arası istatistiksel farkı araştırmak için gruplar bağımsız ve parametrik varsayımları yerine getirmediğinden nonparametrik Kruskal Wallis varyans analizi uygulandı. Post-Hoc ikili karşılaştırmalarda Mann-Whitney-U testi uygulandı.

Tüm gruplardan elde edilen bulguların istatistiksel incelenmesinde Friedman testi, tek grup için de dokuların birbirleriyle mukayesesinde Wilcoxon testi uygulandı.

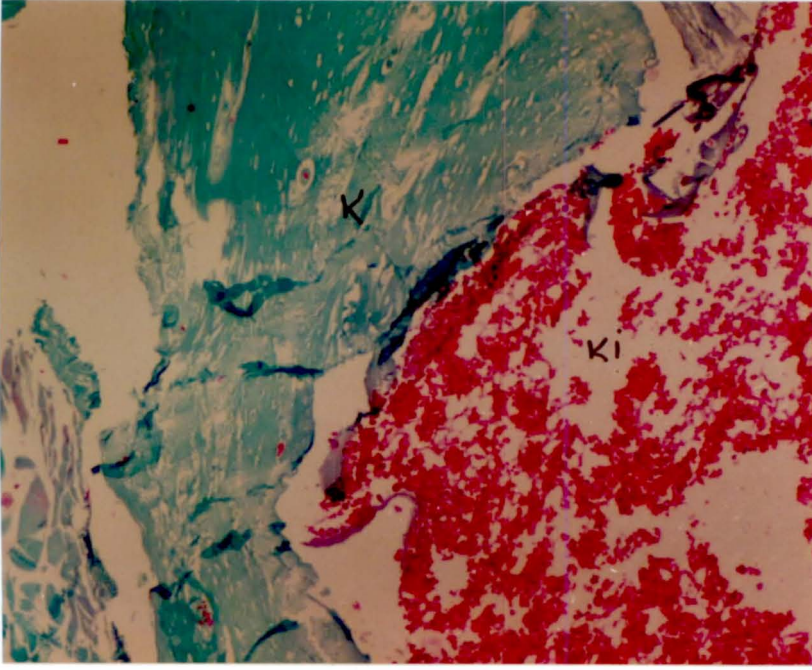
BULGULAR

IŞIK MİKROSKOBİK BULGULAR

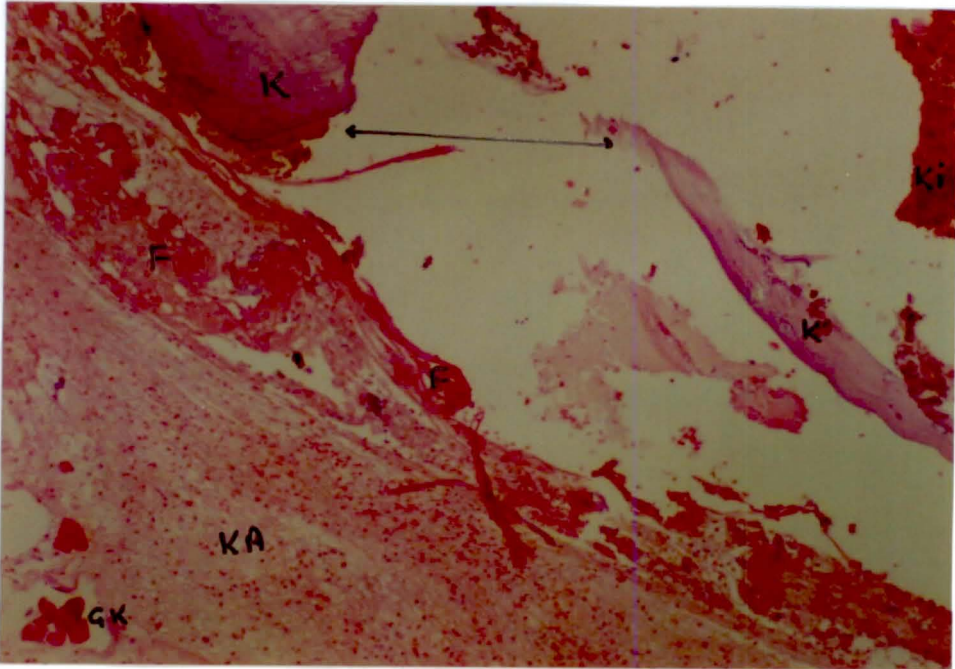
Hematoksilen-Eozin (H-E) ve Mossan Trikrom (M-T) ile boyanan preparatlardan elde edilen kırık iyileşmesi ile ilgili ışık mikroskobu bulguları mikrograflarıyla birlikte aşağıda verilmiştir (Resim-1-17).



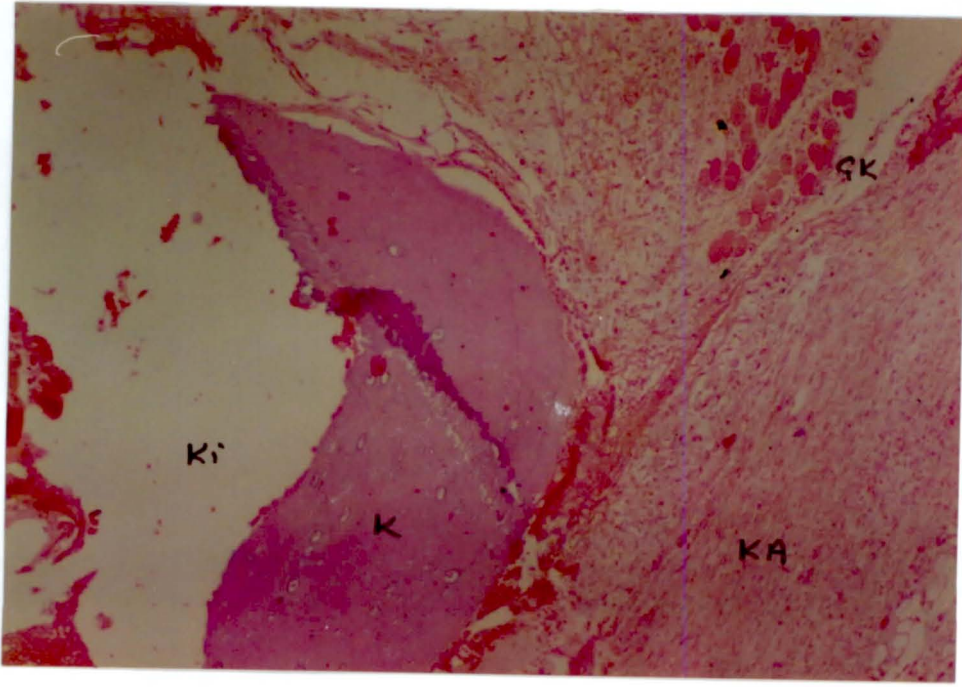
Resim-1: Kontrol grubunda kemik iliği (Kİ), kemik spikülü (K) ve çizgili kas (Ç.K.) görülmekte (H-EX100)



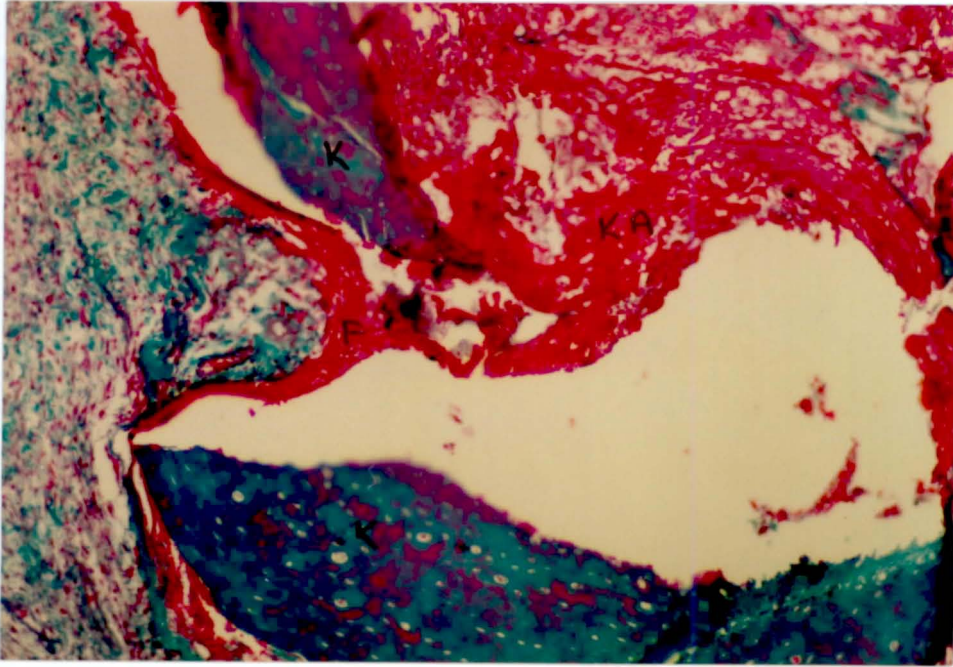
Resim-2: Kontrol grubunda histokimyasal reaksiyon ile kemik iliği (Kİ), mavi renkte boyanan kemik spikülü görülmekte (M-TX100).



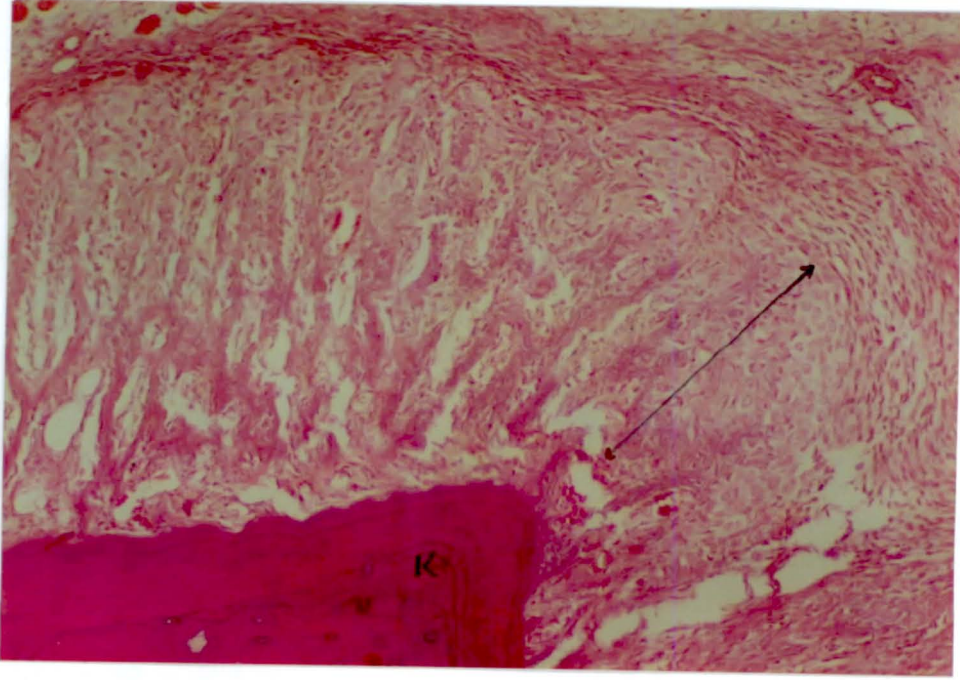
Resim-3: Kırıktan sonraki 1. günde kırık alanı (↔), kemik spikülü (K), kemik iliği (Kİ), kırığa bağlı fibrin (F) kümeleri, kanama alanı (KA) ve çizgili kas (ÇK) görülmekte (H-EX100).



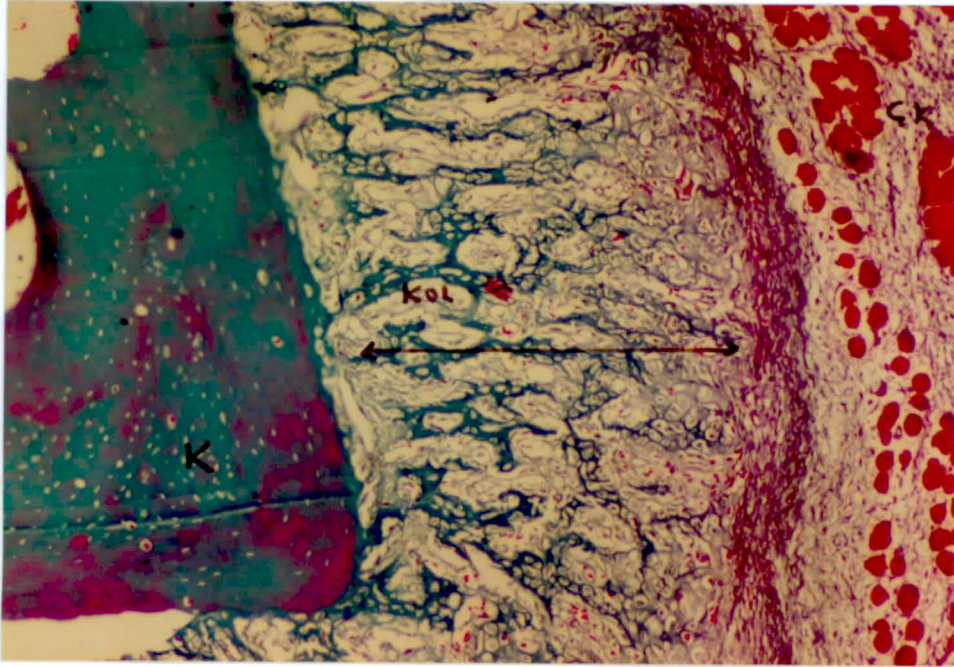
Resim-4: Kırıktan sonraki 3. günde kanama alanı (KA), çizgili kas (Ç.K), kemik iliği (Kİ) ve kemik spikülü (K) görülmekte (H-EX100).



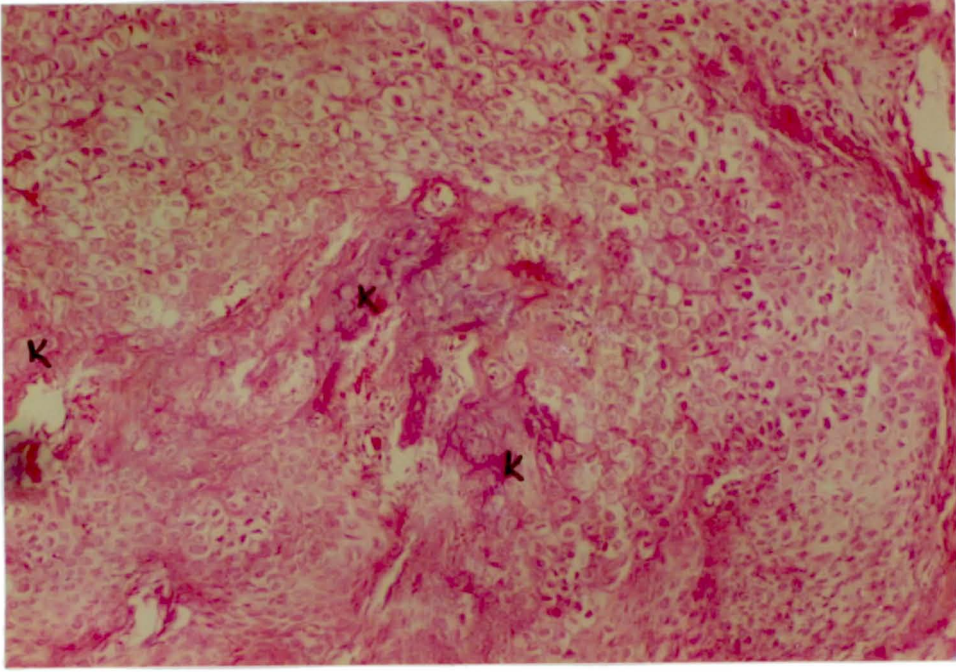
Res-5: Kırıktan sonraki 3. günde kırık alanı (KA), kemik spikülü (K) ve fibrin (F) görülmekte (M-TX100).



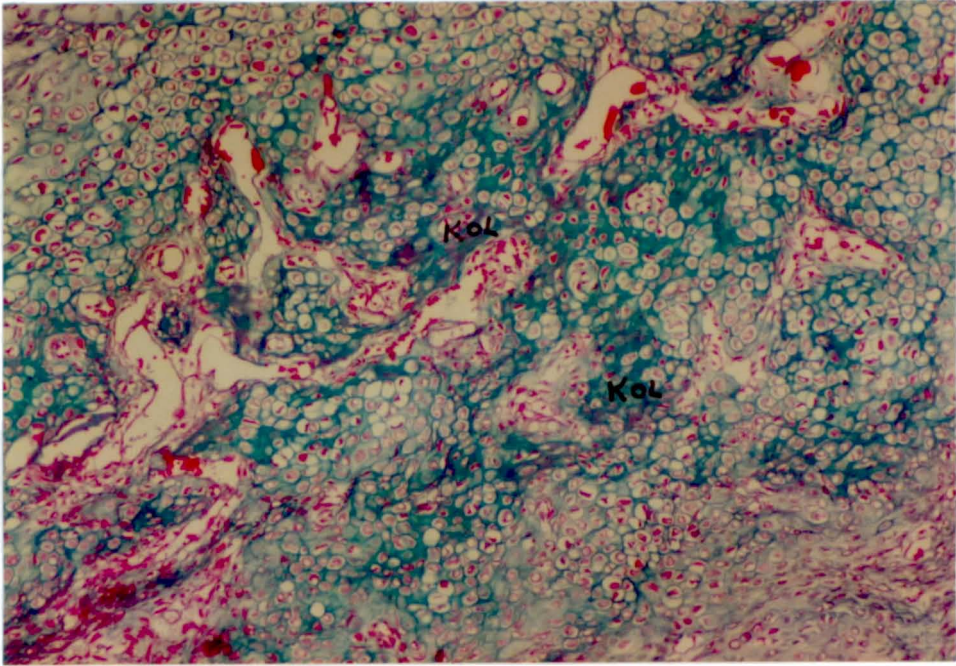
Resim-6: Kırıktan sonra 5. günde kemik spikülü (K) ile periost arasında belirgin kalınlaşmaya (\leftrightarrow) neden olan proliferasyon dikkat çekmekte (H-EX100).



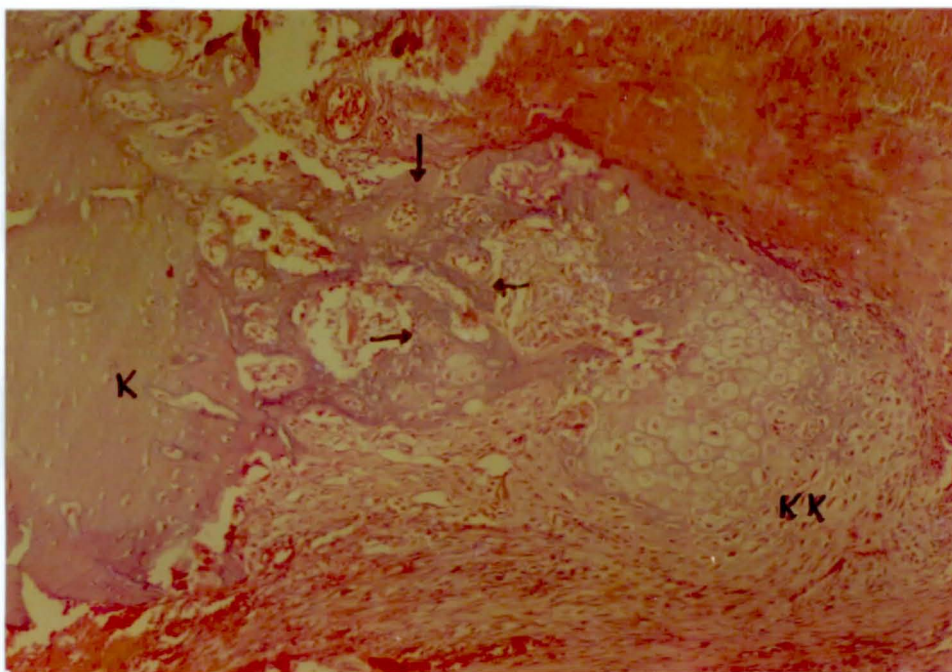
Resim-7: Kırıktan sonra 5. günde periost reaksiyonu alanında (\leftrightarrow) kollagen oluşumunun başladığı (KOL) görülmekte, (K=Kemik, ÇK=Çizgili Kas) (M-TX100).



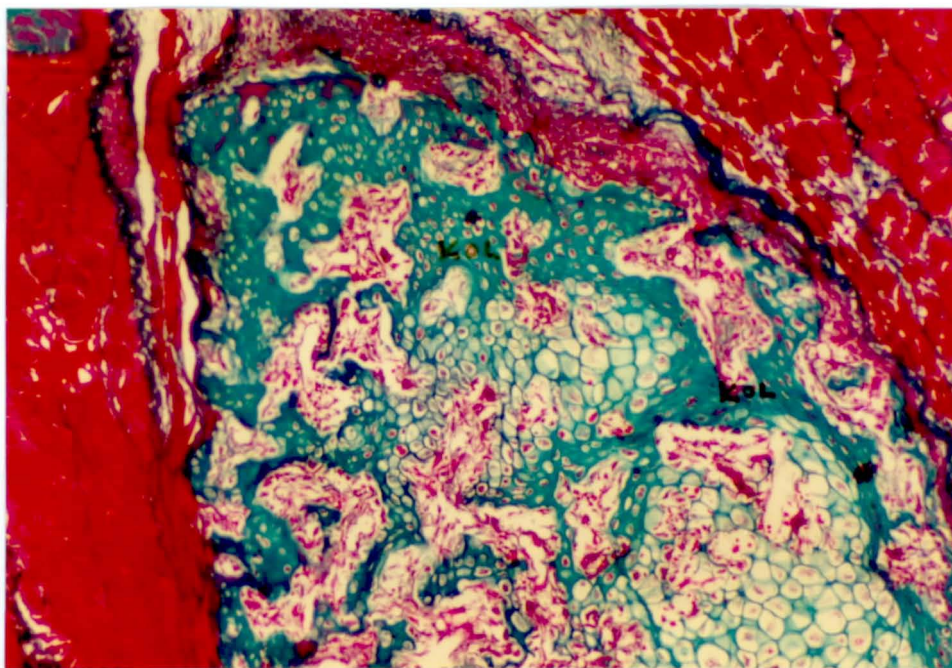
Resim-8: Kırıktan sonra 7. günde periost reaksiyonun alanında kemikleşme odakları (K) görülmekte (H-EX100).



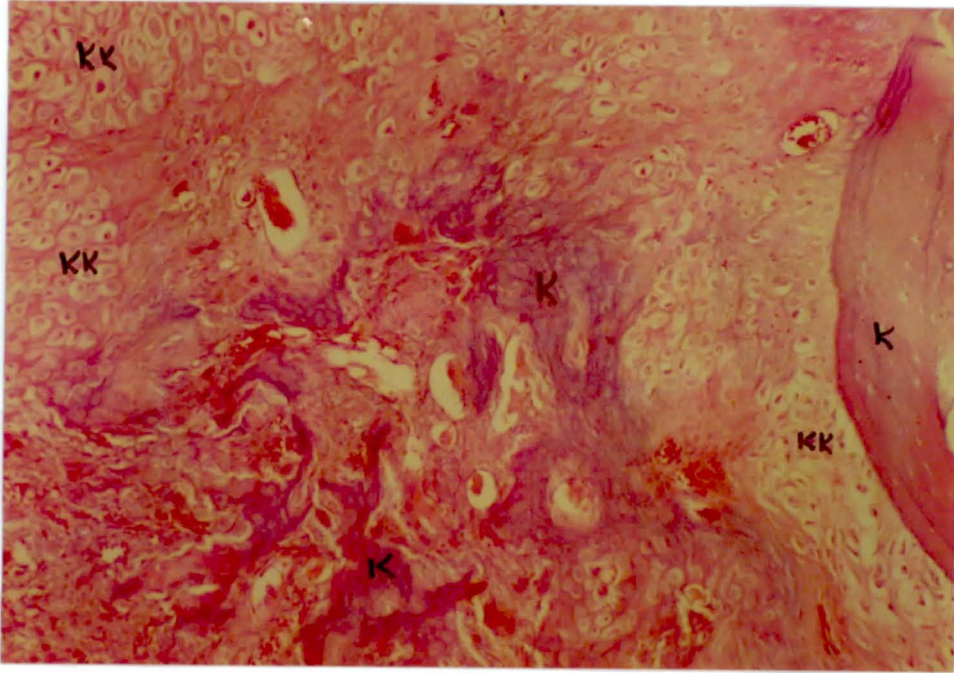
Resim-9: Kırıktan sonraki 7. günde periost reaksiyon alanında kemikleşmeye zemin teşkil eden kollagen birikimi (KOL) mavi renkte görülmekte (M-TX100).



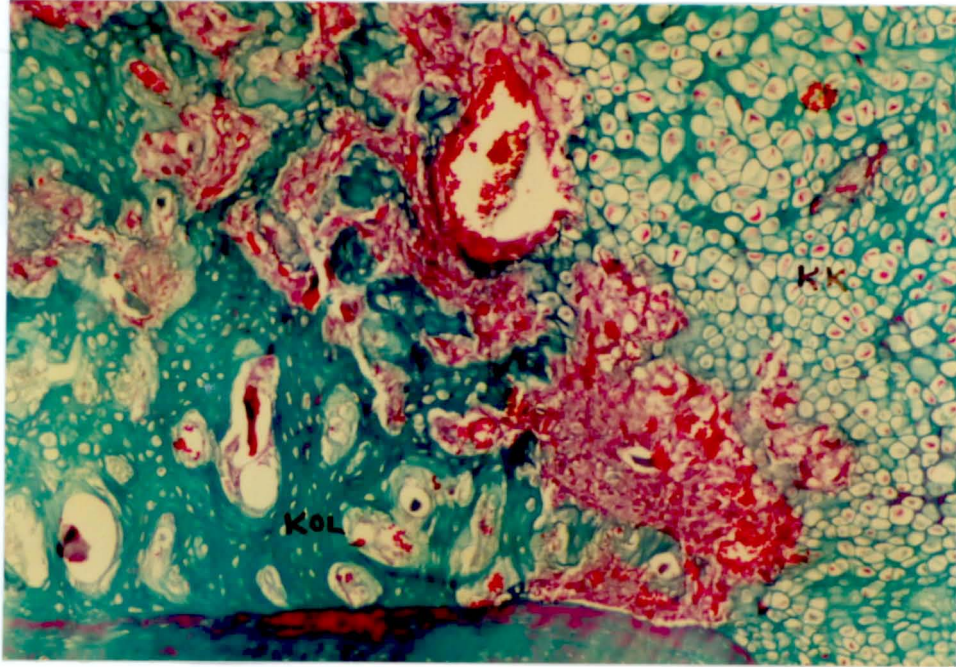
Resim-10: Kırıktan sonra 10. günde kemik dokusunun (K) daha organize biçimde speküllerin birbirleriyle birleşmesi (Ok) görülmekte (KK= Kıkırdak) (H-EX100).



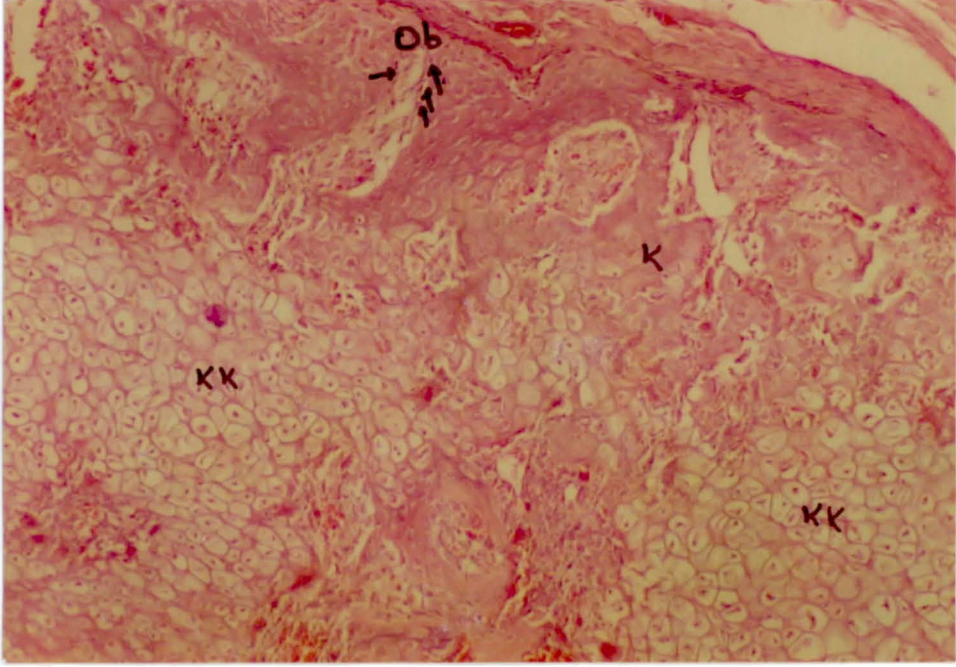
Resim-11: Kırıktan sonra 10. günde birbirleriyle birleşen kollagen ana çatısı (KOL) mavi renkte dikkat çekmekte (M-TX100).



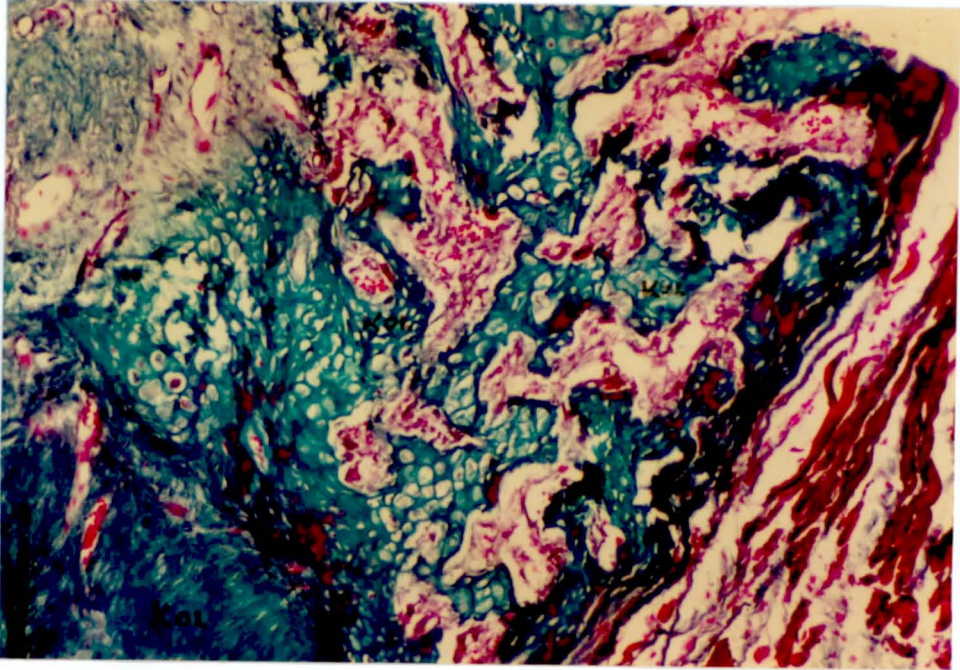
Resim-12: Kırıktan sonra 14. günde enkontral kemikleşme, kemik spiküllerinin birbirleriyle birleşmesinde artış ve speküllerde kalınlaşma görülmekte (K.K= Kıkırdak, K= Kemik) (H-EX100).



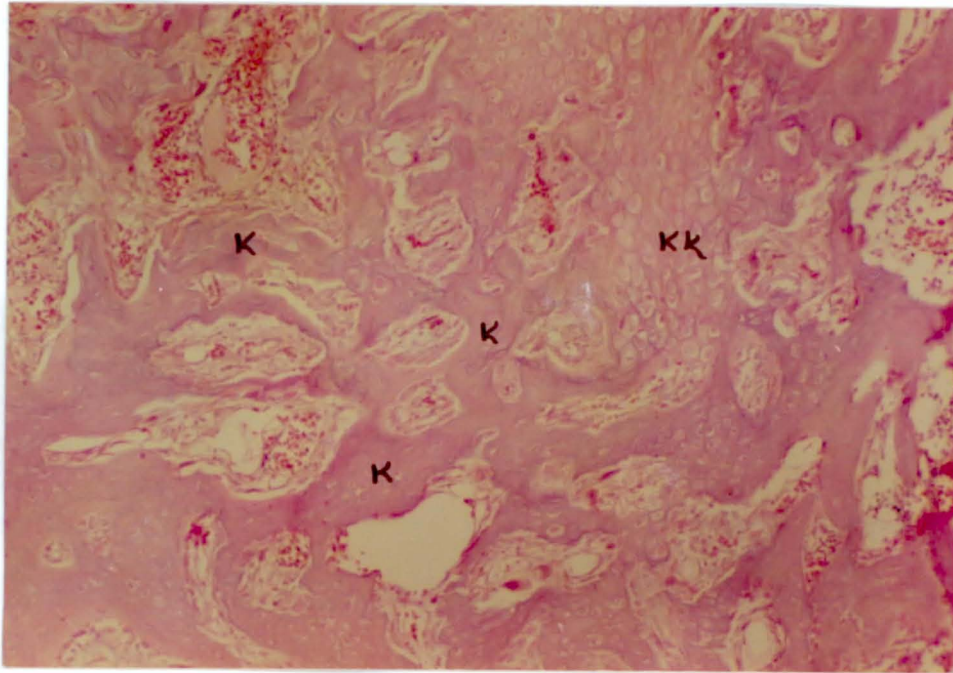
Resim-13: Kırıktan sonra 14. günde kemikleşme alanında kollagen birikimi (KOL) mavi renkte geniş alanlar işgal etmekte, buna karşın kıkırdak alanda bulunmadığı görülmekte (M-TX100).



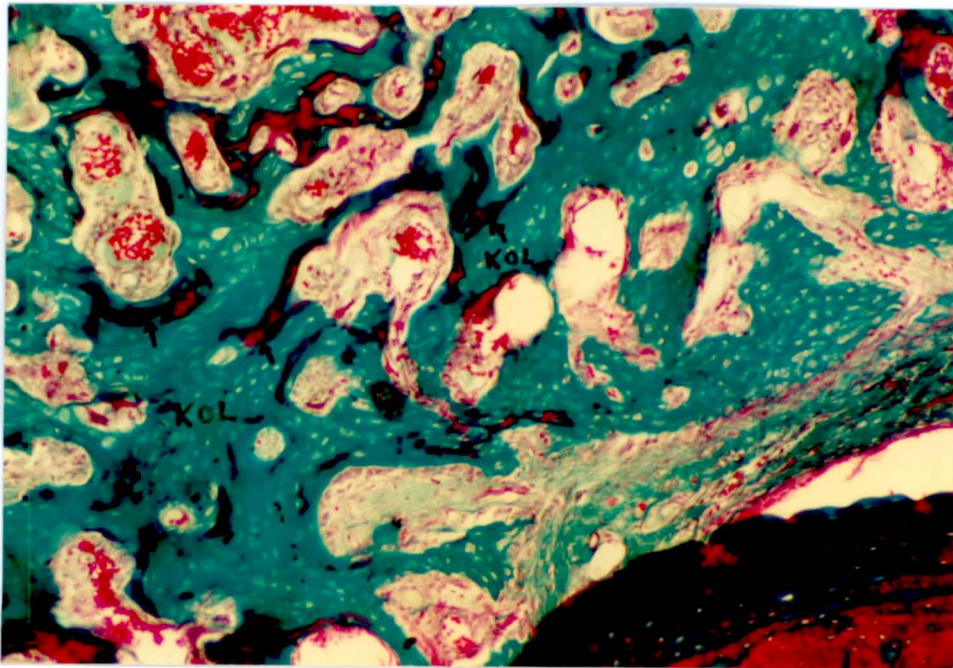
Resim-14: Kırıktan sonra 21. günde kemik spiküllerinin kalınlaştığı kırıkta (K.K) encondral kemikleşmenin arttığı görülmekte (Ob= osteoblast) (H-EX100).



Resim-15: Kırıktan sonra 21. günde mavi renkli kemik spiküllerine zemin oluşturan kollagen doku (KOL) görülmekte (M-TX100).



Resim-16: Kırıktan sonra 28. günde tama yakın maturasyon gösteren birbirleriyle birleşmiş kemik spikülleri, spiküllerde kalsifikasyon mor renkte görülmekte, endokondral kemikleşme kıkırdak doku (KK) üzerinden devam etmekte (H-EX100).



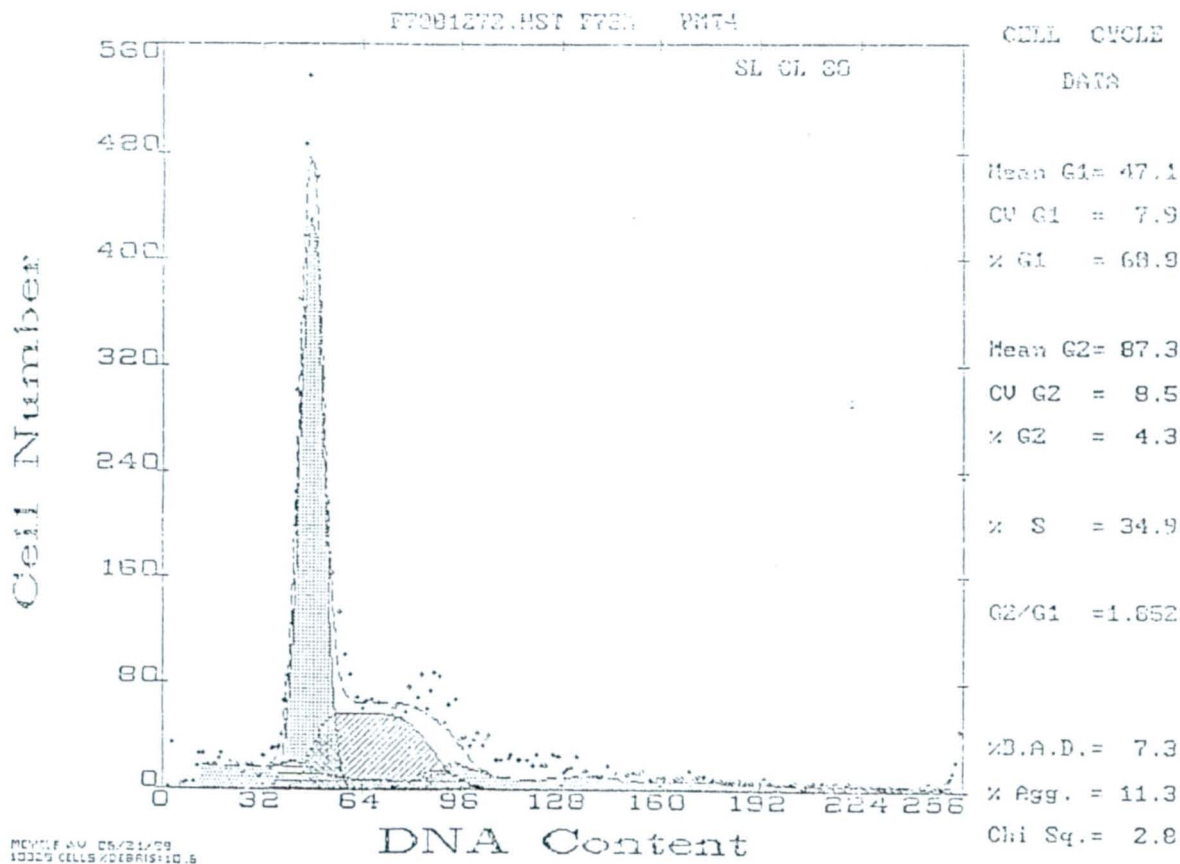
Resim-17: Kırıktan sonra 28. günde birbirleriyle ağzlaşan kemik spiküllerinde mavi renkli kollagen doku (KOL) ve üzerinden mor renkli (Ok) kalsifikasyon alanları görülmekte (M-TX100).

AKIM SİTOMETRİK BULGULAR

Meduller dokuların akım sitometrik analizleri ile grupların G0/G1, G2/M ve S fazlarıyla CV değerleri bulunarak ortalamaları (Ort) ve standart sapmaları (SD) hesaplanıp Tablo-1'de gösterilmiştir.

Grup	Sayı	% G1 Ort±SD	CV G1 Ort±SD	% G2 Ort±SD	CV G2 Ort±SD	%S Ort±SD
1	10	66,68±6,39	8,01±1,51	3,91±1,09	8,55±1,36	29,88±5,47
2	10	74,36±6,65	7,76±1,49	6,04±2,59	8,29±1,03	20,60±5,50
3	10	72,03±4,74	8,38±1,67	5,65±1,83	8,21±1,59	22,42±4,72
4	10	79,13±7,47	8,45±1,64	4,29±1,84	8,20±1,58	17,28±6,32
5	10	71,86±6,69	8,25±1,81	4,41±1,85	8,34±1,54	23,74±7,98
6	10	72,82±5,39	8,26±1,50	5,48±2,64	8,91±0,84	21,80±4,13
7	10	73,37±6,22	8,23±1,59	3,59±2,22	8,72±1,68	22,98±4,70
8	10	76,02±5,92	8,18±2,01	3,49±2,32	7,85±1,82	21,49±4,99
9	10	73,33±8,77	8,25±2,10	3,30±1,10	8,21±1,75	25,34±8,49
Toplam	90	73,29±7,02	8,19±1,65	4,46±2,15	8,36±1,46	22,83±6,58

Tablo-1: Meduller dokuların akım sitometrik analiz sonuçları.

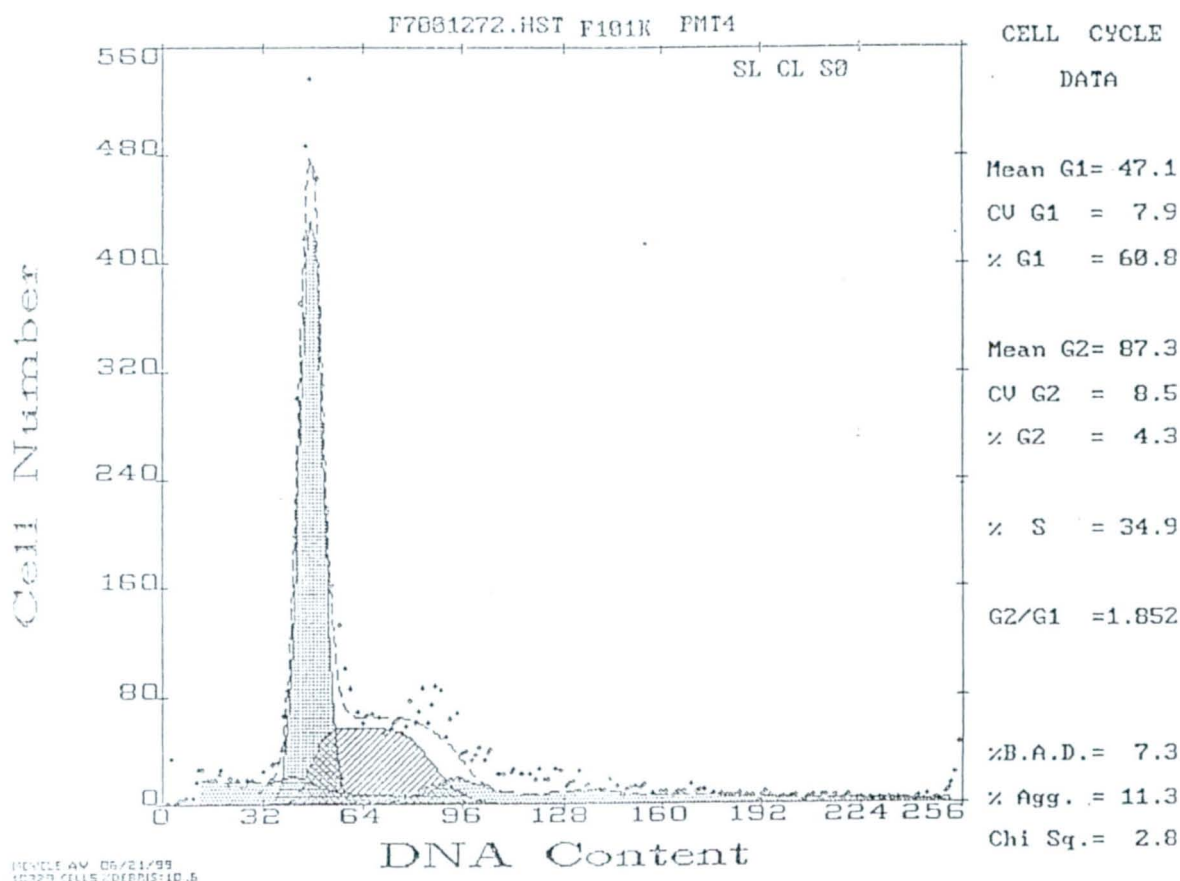


Şekil-8 : Meduller dokuların histogram örneği

Kortikal dokuların akım sitometrik analizleri ile grupların Go/G1, G2/M ve S fazlarıyla CV değerleri bulunarak ortalamaları (Ort) ve standart sapmaları (SD) hesaplanıp Tablo-2'de gösterilmiştir.

Grup	Sayı	% G1 Ort±SD	CV G1 Ort±SD	% G2 Ort±SD	CV G2 Ort±SD	% S Ort±SD
1	10	81.75±7.97	8.67±1.77	1.63±2.18	8.21±2.13	15.63±7.80
2	10	84.95±6.41	9.07±1.98	1.30±1.05	8.90±1.47	12.85±5.59
3	10	85.75±5.68	8.40±1.70	1.30±1.08	8.85±1.11	11.91±4.58
4	10	85.88±5.74	9.01±1.05	1.17±0.77	8.24±2.02	14.64±6.85
5	10	91.90±5.24	8.66±1.35	1.20±0.97	8.18±1.35	6.40±5.41
6	10	87.22±4.85	8.10±1.39	3.59±1.56	9.02±1.36	9.19±4.50
7	10	79.74±5.59	8.51±1.03	4.73±1.66	8.94±1.51	16.53±6.41
8	10	92.03±3.82	8.65±1.47	1.32±1.06	8.29±1.18	6.66±4.99
9	10	91.16±7.63	8.78±1.69	1.41±1.26	8.50±1.63	6.10±5.62
Toplam	90	96.70±7.21	8.65±1.48	1.96±1.77	8.55±1.58	11.10±6.81

Tablo-2: Kortikal dokuların akım sitometrik analiz sonuçları

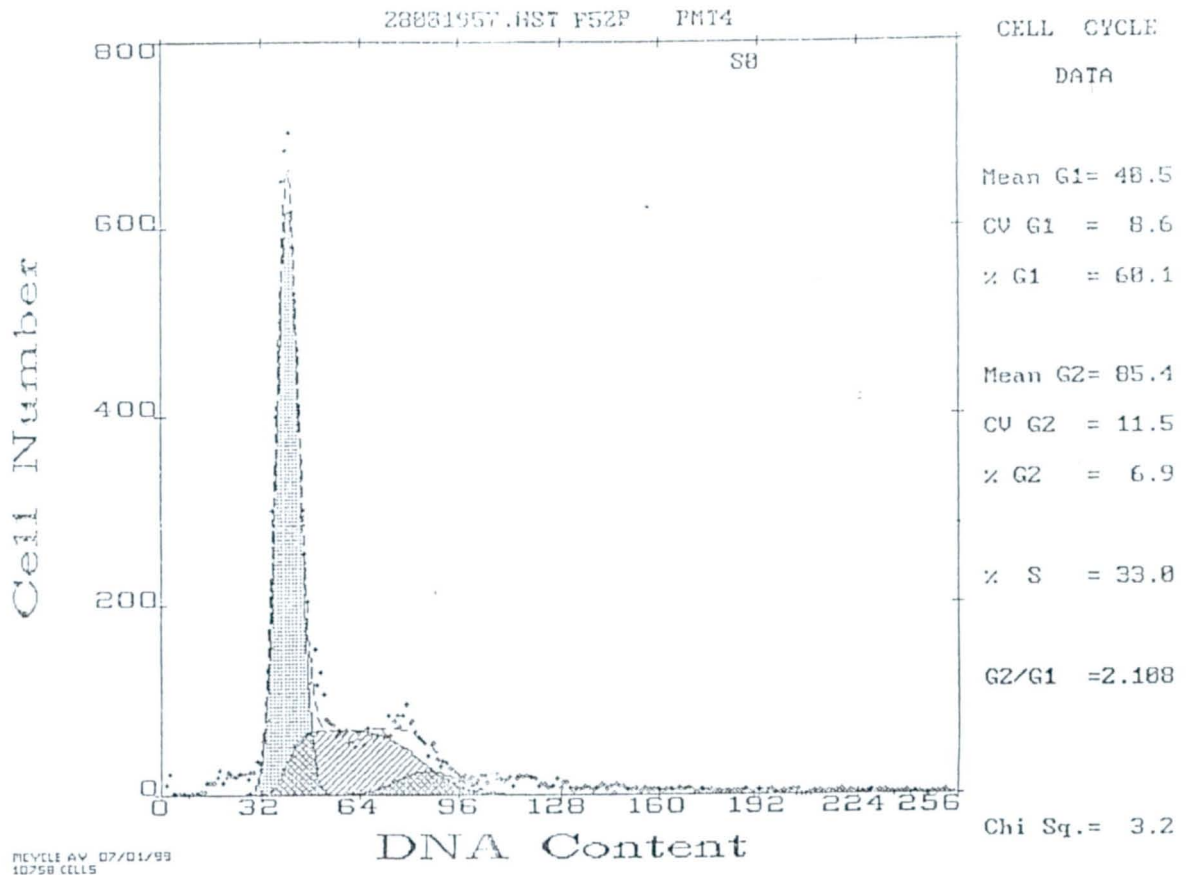


Şekil-9: Kortikal dokuların histogram örneği

Periosteal dokuların akım sitometrik analizleri ile grupların G0/G1, G2/M ve S fazlarıyla CV değerleri bulunarak ortalamaları (Ort) ve standart sapmaları (SD) hesaplanıp, Tablo-3'de gösterilmiştir.

Grup	Sayı	% G1 Ort±SD	CV G1 Ort±SD	% G2 Ort±SD	CV G2 Ort±SD	% S Ort±SD
1	10	85.19±6.63	8.99±1.18	1.88±1.59	7.79±1.31	12.94±6.55
2	10	78.72±3.41	7.97±1.12	2.89±1.14	8.30±1.20	18.40±3.29
3	10	77.46±6.25	9.42±1.02	5.40±3.02	8.86±1.53	17.04±6.92
4	10	76.80±5.47	8.11±1.33	8.23±3.74	8.99±1.52	16.51±4.40
5	10	74.69±5.08	8.38±1.32	7.50±2.89	8.72±1.51	16.81±4.51
6	10	74.91±9.31	9.12±0.13	6.56±3.23	8.25±1.83	18.73±7.17
7	10	86.06±6.31	8.54±1.49	1.50±1.01	8.75±1.46	12.37±5.69
8	10	88.65±7.60	8.71±2.00	2.02±2.44	8.38±2.17	8.34±5.20
9	10	86.90±8.37	9.59±1.48	1.73±1.65	8.33±1.51	10.30±6.88
Toplam	90	81.04±8.30	8.64±1.35	4.19±3.50	8.54±1.55	14.61±6.53

Tablo-3: Periosteal dokuların akım sitometrik analiz sonuçları

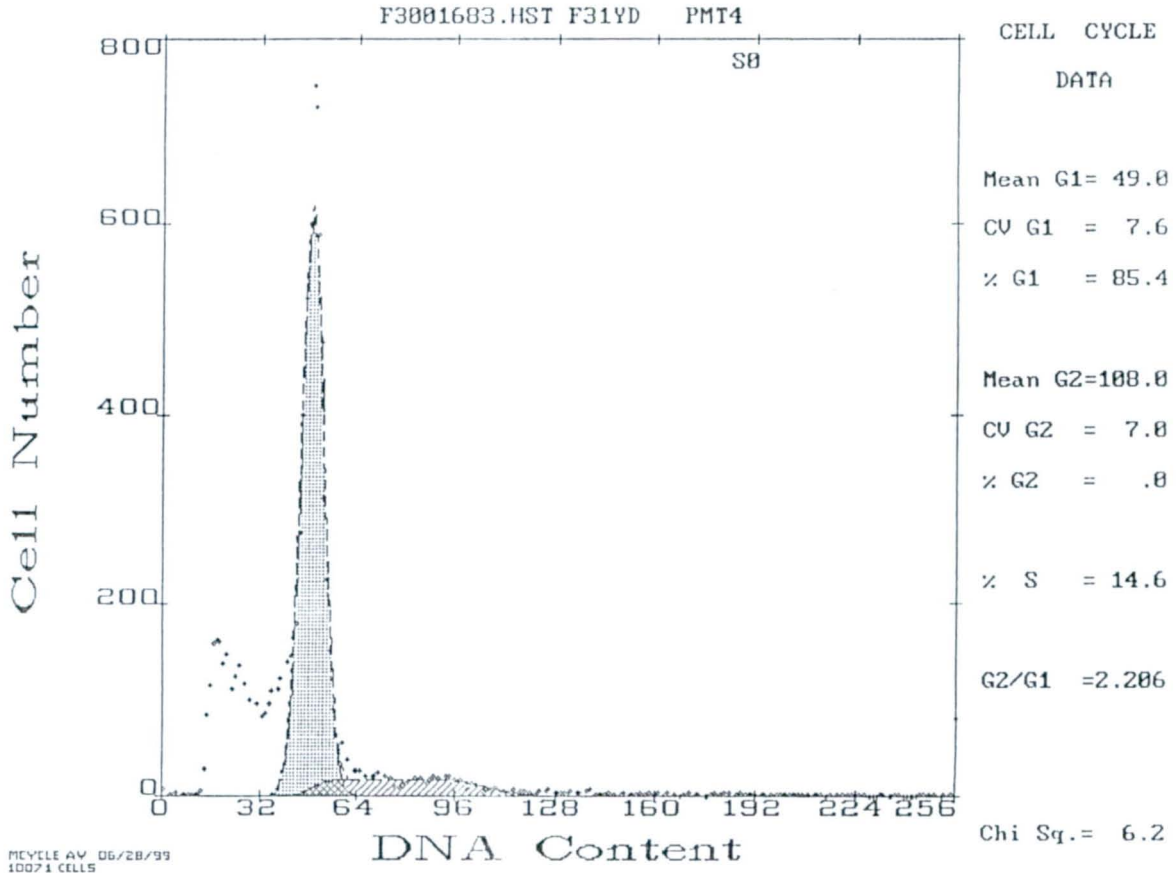


Şekil-10: Periosteal dokuların histogram örneği

Eksternal yumuşak dokuların akım sitometrik analizleri ile grupların G0/G1, G2/M ve S fazlarıyla CV değerleri bulunup ortalamaları (Ort) ve standart sapmaları (SD) hesaplanarak Tablo-4’de gösterilmiştir.

Grup	Sayı	% G1 Ort±SD	CV G1 Ort±SD	% G2 Ort±SD	CV G2 Ort±SD	% S Ort±SD
1	10	91,08±8,46	9,08±1,46	0,53±0,67	8,55±1,28	6,36±6,79
2	10	86,41±6,22	8,99±1,35	0,99±0,98	8,76±1,04	12,79±5,73
3	10	85,89±4,46	9,05±1,40	1,11±0,63	9,25±1,44	13,00±4,28
4	10	86,65±5,39	8,75±2,21	1,13±0,97	8,52±1,97	12,22±4,74
5	10	90,36±7,82	9,30±1,30	0,82±1,32	8,68±1,53	8,68±7,69
6	10	92,37±5,42	8,91±1,45	1,05±1,01	8,59±1,22	5,87±5,19
7	10	87,27±6,88	8,39±1,89	1,45±1,01	8,61±1,29	10,28±6,53
8	10	87,26±8,42	8,41±1,58	1,64±1,78	8,15±1,11	8,50±8,77
9	10	92,44±6,89	8,81±1,14	1,28±1,50	8,77±1,14	8,28±5,72
Toplam	90	88,85±6,89	8,85±1,49	1,11±1,14	8,65±1,33	9,55±6,53

Tablo-4: Eksternal yumuşak dokuların akım sitometrik analiz sonuçları



şekil-11: Eksternal yumuşak dokuların histogram rneęi

GRUPLARIN İSTATİSTİKSEL OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI

Bir hücrede proliferasyon ve diferansiyasyon ancak mitoz olayının varlığında gerçekleşebilir. Kırık iyileşmesinde rol olan osteoprogenitor ve kondroprogenitor hücrelerin hangi dokudan köken aldığını tespit etmek için o dokuda mitoz varlığını incelemek gerekir. Bir hücre siklusunda mitozu G2/M fazı gösterir (14, 34, 35). Bunun için bu çalışmada G2 fazının değerleri esas alınarak istatistiksel çalışmalar yapılmıştır.

Tüm gruplar üzerinde uygulanan Friedman testinde Medulla, korteks, periost ve eksternal yumuşak dokuların G2 fazı arasındaki farklılıkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P=0,001$). Bunun için önce her bir dokunun grupları aralarındaki farklılığın anlamlı olup olmadığını araştırmak için Kruskal-Wallis Varyans analizi, her bir grubun kontrol grubuyla mukayesesi için Mann-Whitney U testi, anlamlı çıkan grupta dokular arası G2 mukayesesi için Wilcoxon testi uygulandı.

Meduller Dokuların Mitoz Yönünden İstatistiksel Karşılaştırılması

Meduller dokulardan elde edilen G2 değerlerle (Tablo-1) yapılan istatistiksel analizde gruplar arası farkların anlamlı olduğu görüldü ($P=0,039$). G1 ve S fazları arasındaki gruplar arası farklarda anlamlı bulunurken ($P<0,05$), G1 ve G2 fazlarının CV değerleri arasında istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı fark yoktur ($P>0,05$). Her bir grubun kontrol grubuyla (Grup-1=Kırık oluşturulmayan grup) mukayesesinde sadece Grup-3'de (Kırıktan sonra 3. gün incelenen grup) G2 fazı oranındaki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($P=0,029$). Diğer gruplardaki G2 fazındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$). Ancak Grup-2'de (Kırıktan sonra 1. gün incelenen grup) G2 fazı arasındaki artış istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen ($P=0,075$) ortalama değeri Grup-3'den daha yüksekti (Tablo-5).

Kontrol Grubu=Grup 1	Karşılaştırılan Grup	%G2 Ort±SD	P Değeri
3,91±1,09	2	6,04±2,59	0,075
	3	5,65±1,83	0,029
	4	4,29±1,84	0,481
	5	4,41±1,85	0,353
	6	5,48±2,64	0,165
	7	3,59±2,22	0,684
	8	3,49±2,32	0,796
	9	3,30±1,10	0,247

Tablo-5: Meduller dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının kontrol grubuyla mitoz yönünden istatistiksel olarak karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi).

Kortikal Dokuların Mitoz Yönünden İstatistiksel Karşılaştırılması

Kortikal dokulardan elde edilen G2 değerlerle (Tablo-2) yapılan analizde gruplar arası farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P=0,001$). G1 ve S fazları değerleri arasındaki gruplar arası farklarda istatistiksel olarak anlamlı iken ($P<0,05$) G1 ve G2 fazlarının CV değerleri arasında istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark yoktu ($P>0,05$). Her bir grubun kontrol grubuyla (Grup-1=Kırık oluşturulmayan grup) istatistiksel mukayesesinde Grup-6 (Kırıktan sonra 10. gün incelenen grup) ve Grup-7 (Kırıktan sonra 14. gün incelenen grup) G2 değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0,05$). Diğer grupların kontrol grubuyla mukayesesinde farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$) (Tablo-6).

Kontrol Grubu=Grup1 %G2 Ort±SD	Karşılaştırılan Grup	%G2 Ort±SD	P Değeri
1,63±2,18	2	1,30±1,05	0,853
	3	1,30±1,08	0,853
	4	1,17±0,77	0,911
	5	1,20±0,97	0,970
	6	3,59±1,56	0,018
	7	4,73±1,66	0,002
	8	1,32±1,06	0,739
	9	1,41±1,26	0,795

Tablo-6: Kortikal dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının kontrol grubuyla mitoz yönünden istatistiksel karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi).

Periosteal Dokuların Mitoz Yönünden İstatistiksel Karşılaştırılması

Periosteal dokularda elde edilen G2 değerlerle (Tablo-3) yapılan analizde gruplar arası farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P=0,001$): G1 ve S fazları arasındaki gruplar arası farklarda istatistiksel olarak anlamlı iken ($P<0,05$) G1 ve G2 fazlarının CV değerleri arasında istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı fark yoktu ($P>0,05$). Her bir grubun kontrol grubuyla (Grup1=Kırık oluşturulmayan grup) istatistiksel karşılaştırılmasında Grup-3 (Kırıktan sonra 3. gün incelenen grup), Grup-4 (Kırıktan sonra 5. gün incelenen grup), Grup-5 (Kırıktan sonra 7. gün incelenen grup) ve Grup-6 (Kırıktan sonra 10 gün incelenen grup) da G2 değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı idi ($P<0,05$). Grup-2 (Kırıktan sonra 1. gün incelenen grup), Grup-7 (Kırıktan sonra 14. gün incelenen grup), Grup-8 (Kırıktan sonra 21. gün incelenen grup) ve Grup-9 (Kırıktan sonra 28. gün incelenen grup) da G2 değerlerindeki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0,05$) (Tablo-7).

Kontrol Grubu=Grup 1 %G2±SD	Karşılaştırılan Grup	%G2 Ort±SD	P Değeri
1,88±1,59	2	2,89±1,14	0,075
	3	5,40±3,02	0,004
	4	8,23±3,74	0,000
	5	7,50±2,89	0,000
	6	6,56±3,23	0,001
	7	1,50±1,01	0,796
	8	2,02±2,44	0,684
	9	1,73±1,65	0,912

Tablo-7: Periosteal dokuların akım sitometrik analiz sonuçlarının kontrol grubuyla mitoz yönünden istatistiksel karşılaştırılması (Mann-Whitney U Testi).

Eksternal Yumuşak Dokuların Mitoz Yönünden İstatistiksel Karşılaştırılması

Eksternal yumuşak dokuların G2 değerleriyle (Tablo-4) yapılan analizlerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($P=0,475$). G1 fazı değerleriyle gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ($P=0,092$) S fazı değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($P=0,041$). G1 ve G2 fazlarının CV değerleri arasında istatistiksel olarak gruplar arası anlamlı bir yoktu ($P>0,05$).

Eksternal yumuşak dokularda mitoz yönünden gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığından grupların kontrol grubuyla istatistiksel karşılaştırılmasına gerek görülmedi.

Gruplar İçinde Mitoz Yönünden İstatistiksel Olarak Anlamlı Farka Sahip Dokuların Birbirleriyle İstatistiksel Karşılaştırılması

Kırık oluşturulmayan grupta (Kontrol grubu=Grup1) meduller dokularda %G2 değerleri akım sitometrik analizlerde diğer dokulara nazaran daha yüksek olduğu görüldü (%G2 Ort±SD=3,91±1,09). Meduller dokular; kortikal, periost ve eksternal yumuşak dokularla karşılaştırıldığında aralarındaki farkların istatistiksel olarak anlamlı olduğu görüldü ($P<0,05$) (Tablo-8) aynı dokuların CVG2 değerleri arasında istatistiksel olarak farklar anlamlı değildi ($P>0,05$).

Meduller Doku %G2±SD	Mukayese Edilen Doku ve %G2±SD	P Değeri	
3,91±1,09	Kortikal Doku	1,63±2,18	0,037
	Periosteal Doku	1,88±1,59	0,028
	Eksternal Yumuşak Doku	0,53±0,67	0,005

Tablo-8: Grup-1'de (Kırık oluşturulmayan grup=Kontrol Grubu) mitoz yönünden meduller dokunun diğer dokularla istatistiksel karşılaştırılması (Wilcoxon Signed Ranks Test).

Grup-2'de (Kırıktan sonra 1. gün incelenen grup) hiçbir dokuda kontrol grubuna nazaran G2 fazında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilemedi ($P>0,05$). Ancak meduller dokuların G2 fazı değerleri Grup-1'de olduğu gibi diğer dokulara nazaran daha yüksekti ve bu farklılık istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0,05$).

Grup-3'de (Kırıktan sonra 3. gün incelenen grup) hem meduller dokuların hem de periosteal dokuların G2 fazındaki yükseklik Kontrol Grubuna (Kırık oluşturulmayan grup=Grup-1) nazaran istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($P<0,05$) (Tablo-5, Tablo-7). Bu dokuların CVG2 değerleri aralarında kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($P=0,441$) Grup-3'de meduller doku %G2 değerleri ile periost dokusu %G2 değerleri karşılaştırıldığında aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($P=0,767$) (Tablo-9).

Meduller doku %G2±SD	Periosteal Doku %G2±SD	P Değeri
5,65±1,83	5,40±3,02	0,767

Tablo-9: Grup-3'de (Kırıktan sonra 3. gün incelenen grup) mitoz yönünden anlamlı çıkart dokuların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması (Wilcoxon Signed Ranks Test).

Grup-4 (Kırıktan sonra 5. gün incelenen grup) ve Grup-5 (Kırıktan sonra 7. gün incelenen grup)'de sadece periost dokusunda G2 fazı değerlerinde kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak artış anlamlıydı ($P<0,05$) (Tablo-7) CVG2 değerleri arasında kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($P>0,05$).

Grup-6'da (Kırıktan sonra 10. gün incelenen grup) hem periost hem de kortikal dokuların G2 fazı değerlerinde kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak artış anlamlıydı ($P<0,05$). CVG2 değerleri arasında kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($P>0,05$). Grup-6'da periost doku % G2 değerleriyle kortikal doku % G2 değerleri birbirleriyle karşılaştırıldığında aralarındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P=0,066$) (Tablo-10).

Kortikal Doku %G2±SD	Periosteal Doku %G2±SD	P Değeri
3,59±1,56	6,56±3,23	0,066

Tablo-10: Grup-6’da (Kırıktan sonra 10. gün incelenen grup) mitoz yönünden anlamlı çıkan dokuların birbirleriyle istatistiksel karşılaştırılması (Wilcoxon Signed Ranks Test).

Grup-7’de (Kırıktan sonra 14. gün incelenen grup) sadece kortikal doku G2 fazlı değerlerindeki artış kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlıydı (P=0,002) (Tablo-6) CVG2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (P=0,529).

Grup-8 (Kırıktan sonra 21. gün incelenen grup) ve Grup 9 (Kırıktan sonra 28 gün incelenen grup)’da hiçbir dokunun G2 fazı değerleri ile kontrol grubunun G2 fazı değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (P>0,05).

Tüm gruplar üzerinde yapılan Friedman testinde dokuların G2 fazı değerleri arasında istatistiksel olarak farkların anlamlı olduğu görüldü (P=0,001): Kruskal-Wallis testinde yumuşak dokuların hiçbir grubunda G2 fazı değerlerindeki artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (P=0,475). Diğer dokularda G2 fazı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış vardı (P<0,05). Artış olan dokuların birbirleriyle mukayesesinde Meduller doku ve periost dokusu kortikal dokuya nazaran mitoz yönünden istatistiksel olarak anlamlı farka sahipken (P<0,05) meduller dokuyla periost dokusu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu (P>0,05). Bu dokuların CVG2 değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmedi (P<0,05) (Tablo-11, Tablo-12).

Meduller Doku %G2±SD	Mukayese Edilen Doku ve %G2±SD	P Değeri
4,46±2,15	Kortikal Doku 1,96±1,77 Periost Doku 4,19±3,50	0,001 0,174

Tablo-11: Tüm gruplar üzerinde meduller dokuların, mitoz yönünden istatistiksel olarak anlamlı artışa sahip diğer dokularla karşılaştırılması (Wilcoxon Signed Test).

Periosteal Doku %G2±SD	Kortikal Doku %G2±SD	P Değeri
4,19±3,50	1,96±1,77	0,001

Tablo-12: Tüm gruplar üzerinde Periosteal Dokunun mitoz yönünden Kortikal Dokularla istatistiksel olarak karşılaştırılması (Wilcoxon Signed Ranks Test).

TARTIŞMA

Kırık iyileşmesi artan teknolojik ve bilimsel gelişmelerle birlikte biyomoleküler yönden halen cezbedici bir olaydır. Bir çok hücre tipinin katılımıyla gerçekleşen koordineli, kompleks bir süreç olan kırık iyileşmesinde esas hadise kemik ana hücrelerinin (osteokondroprogenitor hücreler) proliferasyonu ve diferansiasyonudur. Farklılaşmamış mezenşimal hücrelerden köken alan bu hücrelerin anatomik orijini hakkında ışık mikroskobu, elektron mikroskop, x ışını difraksiyonu, sintigrafi otoradyografi ve insitu hibridizasyon düzeyinde bir çok çalışma yapılmıştır. Anatomik orijin hakkında tam fikir birliği olmamasına rağmen, periost kemik iliği, kemik korteksi ve eksternal yumuşak dokulardan birinin veya bir kaçının orijin olabileceği literatürde bildirilmiştir (1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 17, 20).

Bu çalışmasının hedefi kırık iyileşmesinde hücre orijin ve diferansiasyonunu incelemektir. Akım sitometrik analizle kırık iyileşmesi ile ilgili bir çalışmaya henüz rastlanmamıştır. Bunun için çalışmamızdaki akım sitometrik analiz sonuçları histopatolojik inceleme ve literatürde kırık iyileşmesi ile ilgili çalışmalarla mukayese edilmiştir.

Kırık iyileşmesinin deneysel modeli için en popüler hayvanlardan biri ratlardır (2, 4, 43). Bundan dolayı çalışmamızda Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanılmıştır. Çalışmayı oluşturan grupların akım sitometrik inceleme sonuçları tartışılmadan önce tekniğin incelenerek tartışılması uygun görülmüştür.

Kırık iyileşmesinde matür kemiğin yeniden oluşması için osteoblastların varlığına ihtiyaç vardır. Bunun için köken aldıkları farklılaşmamış mezenşimal dokuda, proliferasyon ve diferansiasyon gerekir (1, 2, 19, 20). Proliferasyon ve diferansiasyon ancak mitoz olayının varlığında gerçekleşir. Bir hücre siklusunda mitozu G2/M fazı gösterir (14, 34, 35). Akım sitometri tekniğinde DNA analizi yapılarak G0/G1, G2, M ve S fazları tayin edilebilir. G2/M fazı DNA miktarının iki katına çıkıp mitozun gerçekleştiği fazdır. Bu da proliferasyon ve diferansiasyonun olduğu noktadır (7, 14, 38, 41).

Akım sitometri dakikada 1.000-100.000 hücreyi bir çok özellik açısından tarayarak verileri analiz eden bir sistemdir. Ancak hücre örneklerinin hazırlanması en önemli aşamalardan birisidir. Hücrelerin tek tek dağılabildikleri bir süspansiyon halinde olmaları şarttır. Kullanılacak örnek cerrahi işlemle elde edilen taze doku veya parafinde bloklanmış dokular olabilir (7, 36, 37, 38, 42, 43). Bu çalışmada taze dokular kullanılmıştır. Taze dokuların akım sitometrik analizde avantajı düşük CV (Coefficient of variation) değerli çalışmalar elde edilmesidir. Dezavantajı ise taze dokularda yeterli oranda ve doğru örnekleme yapılmasının zorluğudur (37).

Akım sitometrik analiz yapılacak hücre süspansiyonlarında yeterli oranda hücre bulunması gereklidir. Hedley kendi metoduna göre 10.000-30.000 hücre arasını yeterli bulmaktadır (44). Bu çalışmada en az 10.000 hücre sayılmış, hücre sayısı açısından literatürde uyumludur.

Tümörlü dokularda ve kromozom anomalisi bulunan bazı dokularda akım sitometrik analizlerde aneuploidi tespit edilebilir (37). Bu çalışmada örneklerin hiç birinde aneuploidi tespit edilmemiştir.

Akım sitometrik analizlerde CV değerlerinin %10'u aşması çalışmanın güvenilirliğini bozan bir göstergedir (37). Homojen canlı bir hücre solusyonunda CV değeri 2 civarında olmalıdır (37). Bu çalışmada CV değerleri 7,76-9,42 arasında bulunmuştur. Bunun sebebi hücre solusyonlarının heterojen oluşudur. Bu da hücre solusyonunda iki ya da daha fazla hücre popülasyonu olduğunun bir işareti sayılabilir. Buna rağmen elde ettiğimiz CV değerleri literatürde sınır kabul edilen %10 değerinin altındadır.

Meduller dokuların akım sitometrik analizlerinde sadece bir grupta G2/M fazı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı artış vardı. Bu grup kırıktan sonra 3. gün incelenen grup (Grup-3) idi. Diğer gruplarda G2/M fazının değerleri %3'ün üzerinde olmasına rağmen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artış kaydedilmedi. Tüm gruplarda meduller dokuların G2/M fazındaki bu yüksek değerler meduller dokuların hücresel yönden heterojen bir doku oluşundan kaynaklanmaktadır. Kemik iliğindeki bu heterojeniteyi osteogenik hücrelerle miyeloretiküler hücreler sağlarlar. Dolayısıyla kemik iliğinde osteogenik hücrelerin yanında, eritrosit, granülosit, lenfosit, monosit, trombosit'lerin oluştuğu, yüksek proliferasyon ve diferansiyasyon kabiliyetine sahip,

hematopoietik granülopoietik ve megakoryositik seri hücreleri mevcuttur. Bundan dolayı kemik iliği normalde mitoz yönünden daima aktif bir dokudur (14).

Kırık iyileşmesini incelemek için yaptığımız histopatolojik çalışmada kemik iliğinde kırıktan sonra 1. ve 3. günde kanama ve hematoma dışında bir bulgu izlenmedi (Resim-5, Resim-6).

Alpar E.K. yaptığı otoradyografik çalışmada ratların meduller dokularında 4. güne kadar mitotik faaliyet gösteren osteoblasta farklılaşan Tritiyumlu timidinle işaretlenmiş hücreler belirleyebilmiştir (5). Brighton ve Hunt yaptıkları çalışmalarda kırıktan birkaç saat sonra kemik iliği alanında kemik iliği elemanlarının kaybının sürdüğü, kan damarlarının kaybının olduğu düşük hücreli dansiteli bölge ve endotelial hücrelerin pleomorfik hücrelere transformasyonu ve 24 saat içinde osteoblastik fenotipin tespit edildiği yüksek hücreli dansiteli bölge belirlemişlerdir (45). Böylece kırık iyileşmesinin erken döneminde kemik iliğinin kemik formasyonuna direkt katkıda bulunduğunu kanıtlamışlardır.

Wittbjer J. Demineralize kemik matrisi ve kemik iliğiyle muamele edilmiş demineralize kemik greftleriyle tavşanlarda yaptığı deneysel çalışmada kemik defeklerinin tedavisinde kemik iliğiyle muamele edilmiş kemik greftlerinin radyolojik, otoradyografik ve sintigrafik olarak daha etkili olduğunu rapor etmiştir (12). Tiedeman ve arkadaşları kendi çalışmalarında benzer sonuçlar bildirmişlerdir (46).

Connolly ve arkadaşları enfekte tibia nonunionlarında perkutan kemik iliği ile greftlemede başarılı sonuçlar rapor etmişlerdir (47). Majors ve arkadaşları kemik iliği hücre kültürlerinde osteoblastik diferansiasyonu göstermişlerdir (2).

Bu tez çalışmasında meduller dokularda elde edilen G2/M fazında değerlerindeki artış literatürde tespit ettiğimiz meduller dokulardaki osteogenik aktiviteyle uyumlu idi.

Kortikal dokuların akım sitometrik analizlerinde Grup-6 (Kırıktan sonra 10. gün incelenen grup) ve Grup-7 (Kırıktan sonra 14. gün incelenen grup) da G2/M fazı değerlerinde kontrol grubuna (Kırık oluşturulmayan grup= Grup-1) nazaran istatistiksel olarak anlamlı artış vardı. Yaptığımız histopatolojik çalışmada kırığa ait kortikal fragmanlarda hiçbir grupta bir değişiklik tespit edilemedi. Ancak 10. günde başlayan ve 28. güne kadar devam eden periost kaynaklı perikortikal enkontral kemikleşme sahaları görüldü (Resim-12-19).

Alpar E.K. otoradyografik çalışmasında 4. güne kadar kortekste trityumlu timidinle işaretlenmiş hiçbir hücre tespit edilemediğini 4. günden sonra korteksin yüzeyel kısmında tirtyumlu timidinle işaretlenmiş osteoblastlar gözlendiğini bunun 20. güne kadar devam ettiğini, korteksin diğer kısımlarında hiç aktivite görülmediğini rapor etmiştir (5).

Kırık iyileşmesinde korteksin asıl cevabı, kırık fragmanlarının anatomik reduksiyonu ve rijit fiksasyonunu gerektiren primer iyileşme yönündedir. Anatomik reduksiyondan sonra kırığın bir tarafındaki osteoklastlar, rezorbsiyon sonucu yeni haversian kanallar oluşturarak kan damarlarının penetrasyonunu sağlar. Bu penetrasyonla birlikte perivaskuler mezenşimal hücreler, endotelial hücrelere eşlik ederler. Bu hücreler osteogenik seri hücrelerine farklılaşarak yeni kemik formasyonu ile primer iyileşmeyi sağlarlar (1, 2, 5, 17, 19, 20). Primer kırık iyileşmesi uzun süre gerektirdiğinden erken dönemde kortekste mitotik aktivite beklenmeyebilir.

Bu çalışmada Grup-6 (Kırıktan sonra 10. gün incelenen grup) ve Grup-7 (Kırıktan sonra 14. gün incelenen grup) da kortikal dokuların G2/M fazı değerlerindeki artış dikkat çekicidir. Ancak disseksiyon esnasında; periost kaynaklı, 10. günde başlayan 28. güne kadar devam eden encondral kemikleşmeye ait dokuların bulaşması bu aktiviteye sebep olabilir.

Reddi ve Anderson yaptıkları çalışmalarda kırık iyileşmesinde kondroblast diferansiasyonunu 5. günde, maksimum kondrogenезisi 8. günde tespit ettiklerini rapor etmişlerdi (21). Brighton ve Hunt histokimyasal çalışmalarda kondrogenезis pikini kırıktan sonra 9. günde tespit etmişlerdir (2).

Periosteal dokuların akım sitometrik analizlerinde, Grup-3 (Kırıktan sonra 3. gün incelenen grup), Grup-4 (Kırıktan sonra 5. gün incelenen grup), Grup-5 (Kırıktan sonra 7. gün incelenen grup), Grup-6 (Kırıktan sonra 10. gün incelenen grup)'da G2/M fazı değerlerinde ki artış kontrol grubuna (Kırık oluşturulmayan grup=Grup-1) nazaran istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0,05$). Histopatolojik incelememizde 5. günde pik yapan periost proliferasyonu gözlendi. 10. günde başlayan 14. günde pik yapan 28. güne kadar devam eden periost kaynaklı encondral ossifikasyon tespit edildi. İntramembranöz kemikleşme 7. günde başlayıp 28. güne kadar devam ettiği gözlendi (Resim-8-19).

Alpar E.K. otoradyografik çalışmasında periostta 1. günde başlayan, 3. günde pik yapan, 5. günde periost reaksiyonunun pikiyle devam eden trityumlu timidinle işaretlenmiş osteoprogenitor ve kondroprogenitor hücrelerin proliferasyonunu, osteoblasta ve kondroblastla farklılaşmasını tespit etmiş ve bunun 16. güne kadar azalarak devam ettiğini rapor etmiştir (5).

Kırık iyileşmesinde periost tarafından intramembranöz kemik oluşumu, kırıktan sonra hemen başlar fakat hücrelerdeki proliferatif aktivite 2. hafta dolmadan durur. Kondrogenizde ise proliferasyon 14. güne kadar devam eder (2).

Periost'un yüksek kondrogenetik aktiviteye sahip olduğu bir çok deneysel ve klinik uygulamalarda ortaya konmuştur (48, 40, 59, 51, 52, 53).

Bu çalışmada periost dokularının G2/M fazı değerlerindeki artış, literatürde tespit edilen periosta ait osteogenik ve kondrogenik aktiviteyle uyumlu görüldü.

Eksternal yumuşak dokuların akım sitometrik analizlerinde hiçbir grupta kontrol grubuna (Grup-1= Kırık oluşturulmayan grup) nazaran mitoz yönünden istatistiksel olarak anlamlı artış yoktu ($P>0,005$). Histopatolojik incelememizde spesmenlerin hiç birinde eksternal yumuşak dokularda kırık iyileşmesini izah eden bir bulgu elde edilemedi.

Alpar E.K.'ın otoradyografik çalışmasında eksternal yumuşak dokularda çok az hücrede otoradyografik tanecik tespit edilmiş ve bunların osteoblasta farklılaşmadığı rapor edilmiştir (5).

Urist endomisyum hücrelerinin, McLean, Bridges ve Pritchard ise perivasküler konnektif doku hücrelerinin inductor adı verilen bir madde tesiri ile osteoblasta farklılaşması sonucu kırıkların iyileştiğini iddia etmişlerdir (1, 4, 5, 20).

Bu tez çalışmasında eksternal yumuşak dokularda kırık iyileşmesini organize edebilecek hücre proliferasyonunu ve diferansiasyonunu temin eden mitoz olayına rastlanmamıştır.

Tüm gruplar üzerinde yapılan istatistiksel çalışmalarda Medulla, korteks ve periost dokusunun akım sitometrik analizlerinde G2/M fazı değerlerindeki artış kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlıydı ($P<0,05$). Yumuşak dokuların G2/M fazı değerleri arasında kontrol grubuna nazaran istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($P<0,05$). Periost

dokusu ve meduller doku G2/M değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($P>0.05$) (Tablo 10-11). Ancak oldukça heterojen bir doku olan meduller doku kırık olmadan bile mitoz yönünden aktif bir dokudur (14). Her iki dokunun ortalama G2/M fazı değerleri kontrol grubu G2/M fazı değerleriyle orantılandığında meduller doku G2/M fazındaki artış kontrol grubu G2/M fazının 1,16 katı kadar iken periost dokularında G2/M fazındaki artış kontrol grubunun 2,77 katı kadardı. Bu yüzden periost dokusu G2/M fazı değerlerindeki artış, akım sitometrik yönden daha anlamlıydı.

Literatürde kırık iyileşmesinde osteoprogenitor hücre orijini farklı yazarlar değişik şekilde ifade etmişlerdir: Brooks; fasya, Treuta, McLean, Bridges; Perivasküler hücreler, Ostrowski; kemik iliği Urist; endomisyum, Chalmers ise periost olduğunu bildirmişlerdir (1, 2, 4, 5, 8, 17 20). Oni ve arkadaşları hücre orjininin çok kaynaklı olduğunu rapor etmişlerdir (17). Caplan yaptığı progenitor hücre araştırmalarında uygun biyoaktif faktörler sunulduğunda periost, kemik iliği, kas dokusu ve bağ dokusunun kemik oluşturma yeteneğine sahip olduklarını rapor etmiştir (10).

Bu çalışmada dokuların G2/M fazı değerleri dikkate alındığında kırık iyileşmesinde hücre orijini ve diferansiasyonunda akım sitometrik yöntem en aktif dokunun periost olduğu tespit edildi. Meduller dokularda normalde mitotik aktivite olduğu kırıktan sonra bu aktivitenin arttığı görüldü. Kortikal dokularda mitotik aktivite minimaldi. Yumuşak dokularda ise kırık iyileşmesine hücresel yönden katkısı olabilecek mitotik aktivite tespit edilemedi.

Kırık iyileşmesinde hücre orijin ve diferansiasyonunun akım, sitometrik incelenmesinde ileri çalışmalara ihtiyaç vardır. Caplan hücre kültürleriyle yaptığı çalışmalarda osteojenik seri hücrelerine karşı monoklonal antikor kullanmıştır (10). Bu tür işaretleyici antikorların kırık iyileşmesinde, akım sitometrik incelemelerde, kullanılabilmesinin daha iyi sonuçlar vereceği kanaatindeyiz.

SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu deneysel çalışmada, kırık iyileşmesinde, hücre orijin ve diferansiasyonunun akım sitometrik incelenmesinde aşağıdaki sonuçlar elde edildi:

1- Kırık iyileşmesinde hücre orijini ve diferansiasyonunda akım sitometrik yönden en aktif doku periost olduğu tespit edildi

2- Kemik iliğinde normalde mitotik aktivite vardır bu aktivite kırıktan sonra artmaktadır.

3- Kortikal dokularda, kırık iyileşmesi yönünden mitotik aktivite minimaldir.

4- Eksternal yumuşak dokularda kırık iyileşmesinde hücre orijini ve diferansiasyonuna katkısı olabilecek bir mitotik aktivite tespit edilmemiştir.

Kırık iyileşmesinde, hücre orijin ve diferansiasyonunun akım sitometrik incelenmesinde monoklonal antikorların kullanılmasının, daha iyi ve hücreye spesifik sonuçlar elde etmeği kanaatine ulaşıldı.

ÖZET

Bu deneysel çalışmada, kırık iyileşmesinde hücre orijini ve diferansiasyonu akım sitometri ile incelendi. Bu amaçla Sprague-Dawley cinsi ratlarda intraperitoneal ketamin anestezisi ile sağ tibiada dijital kompresyon yöntemiyle kapalı kırık oluşturuldu. Kırıktan sonra 1., 3., 5., 7., 10., 14., 21. ve 28 günde hayvanlar sakrifiye edilip 10'ar tibia dizden ve ayak bileğinden dezartikule edildi. Eksternal yumuşak doku, periost, korteks ve meduller dokular, disseksiyonla ayrı ayrı phosfat buffer solusyonlu tüplere alındı. Canlı doku inceleme yöntemiyle akım sitometrik DNA analizleri yapıldı. Kontrol amacıyla 10 sağlam tibiaya aynı işlem uygulandı. İlaveten her gruptan birer tibia histopatolojik incelemeye tabi tutuldu.

Akım sitometrik inceleme sonucunda kırık iyileşmesinde hücre orijin ve diferansiasyonu için en aktif dokunun periost olduğu tespit edildi. Meduller dokularda kırık olmadan bile mitotik aktivite olduğu, kırıktan sonra bu aktivitenin arttığı görüldü. Kortikal dokularda mitotik aktivite minimaldi. Yumuşak dokularda ise kırık iyileşmesine hücrel katkılabilecek mitotik aktivite tespit edilemedi.

Kırık iyileşmesinde hücre orijin ve diferansiasyonunun akım sitometrik incelenmesinde, monoklonal antikörlerin kullanılmasının, daha iyi ve hücreye spesifik sonuçlar verebileceği kanaatine varıldı.

SUMMARY

In this experimental study: in the repair of a fractured bone the cell origin and differentiation were examined with flow cytometry. To achieve this goal, in Sprague-Dawley type rats by interperitoneal ketamin anaesthesia, in the right tibia a closed fracture was formed by digital compression method. After the fracture in the 1st, 3rd, 5th, 7th, 10th, 14th, 21th and 28th days, the animals were sacrificed and in groups of ten each tibia were desarticulated from knee and ankle. By dissection; external soft tissue, periost, cortex and medullar tissues were taken into the separate tubes which contain phosphate buffer solutions. By the live tissue examination method, flow cytometric DNA analyses were performed. To control it, the same process was applied to ten healthy tibia. In addition, from each group one tibia was undergone into histopathologic examination.

As a result of flow cytometric examination it was examined that in the repair of a fractured bone periost is the most active tissue for the cell origin and differentiation. In the medullar tissues; even before fracture mitotic activity was observed and after fracture this activity increased. In the cortical tissues mitotic activity was minimum. In the soft tissues, any mitotic activity which can help as a cell to the repair of a fractured bone could not be established.

In our opinion, in the repair of a fractured bone by the flow cytometric examination of cell origin and differentiation the use of monoclonal antibody is more helpful and can give to cell specific results.

KAYNAKLAR

- 1- Ege R: Travmatoloji Kırıklar ve Eklem Yaralanmaları. Kadiođlu Matbaası, Ankara, 1989, s.1-61
- 2- Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. Clin Orthop, 355S: S7-S21, 1998.
- 3- Wittbjer J: Bone Matrix and Bone Formation. Printed in Sweden by İnfotryck ab, Malmö, 1983.
- 4- Sürel YB, Zorer G, Uđurlu S: Kırık iyileşmesi ve periostun önemi. Acta Orthop TraumaTurc, 30: 417-422, 1996.
- 5- Alpar EK: Kırık iyileşmesinde hücre orijini ve diferansiasyonunun trityumlu timidin otoradyografisi ile deneysel olarak incelenmesi. Doçentlik tezi, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ankara, 1975.
- 6- Okur A, Ezirmik N, Yana H, Çiftçiođlu A, Alparslan B: Tanısal amaçlı olarak kullanılan x-ışınlarının kırık kallusu oluşumuna etkileri. Acta Orthop Trauma Tunç, 30: 411-416, 1996.
- 7- Riley RS, Mahin EJ and Ross W: Clinical Application of Flow Cytometry. First ed. Iqaku Shoin Medical Publishers inc., New York, 1990.
- 8- Glowacki J: Angiogenesis in fracture repair. Clin Orthop, 355S: S82-S89, 1998.
- 9- Yoo JU and Johnstone B: The role of osteochondral pregenitor cells in fracture repair. Clin Orthop, 355S: S73-S81, 1998.
- 10- Caplan AI: Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 9: 641-649, 1991.

- 11- Bruder SP, Jaiswal N, Ricalton NS; Mosca JD, Kraus KH and Kadiyala S: Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. Clin Orthop, 355S: S247-S256, 1998.
- 12- Wittbjer J, Palmer B, Rohlin M and Thorngren KG: Osteogenic activity in composite grafts of demineralized compact bone and marrow. Clin Orthop, 173: 229-237, 1983.
- 13- Connolly Jf: Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. Clin Orthop, 355S: S257-S266, 1998.
- 14- Erbenli T: Histoloji 1. Beta Basım Yayım Dağıtım A.Ş., İstanbul, 1984.
- 15- Weinstein SL and Buckwalter JA: Turek's Orthopaedics. Fifth ed., J.B. Lippincott Company, California, 1986, pp. 13-67.
- 16- Favus MJ.: Primer On The Metabolic Bone Diseases And Disorders Of Mineral Metabolism. Second ed., Lippincott-Raven Publisher, Philadelphia. New York, 1993, pp. 1-37.
- 17- Oni OA: Callus formation during diaphyseal fracture repair. Orthopaedics Int. Ed., 4: 269-277, 1996.
- 18- Bostrom MPG and Asnis P: Transforming growth factor beta in fracture repair. Clin Orthop, 355S: S124-S131, 1998.
- 19- Buckwalter JA. Glimcher MI, Cooper RR and Recker R: Bone biology. J Bone Joint Surg, 77.A: 1276-1289, 1995.
- 20- Rackwood CA, Green DP and Bucholz RW: Fractures in Adults Third ed., J.B. Lippincott Company, 1991 pp. 181-222.
- 21- Reddi AH; Initiation of fracture repair by bone morphogenetic proteins. Clin orthop, 355S: S66-S72, 1998.
- 22- Reddi AH and Cunningham NS: Initiation and promotion of bone differentiation by bone morphogenetic proteins. J. Bone and Mineral Res 8: S499-S502, 1993.

- 23- Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, Mundy GR and Rosenfeld RG: Growth factors as therapeutic agents. *J. Bone Joint Surg*, 78-A: 1272-1286, 1996.
- 24- Wozney JM: The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Molecular Reproduction And Development*, 32: 160-167, 1992.
- 25- Radomsky ML, Thompson AY, Spiro RC and Poser JW: Potential role of fibroblast growth factor in enhancement of fracture healing. *Clin Orthop*, 355S: S283-S293, 1998.
- 26- Rosier RN, O'Keefe RJ and Hicks DG: The potential role of fibroblast growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop*, 355S: S294-S300, 1998.
- 27- Trippel SB: The potential role of insulinlike growth factors in fracture healing. *Clin Orthop*, 355S: S301-S313, 1998.
- 28- Bostrom MPG: Expression of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop*, 355S: S116-S123, 1998.
- 29- Bostrom MPG and Camacho NP: Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop*, 355S: S274-S282, 1998.
- 30- Sadler TW: *Langman's Medical Embriyology*, 6th Edition, Williams and Wilkins Baltimore, 1990, pp. 242-245.
- 31- Petorak İ: *İnsan Embriyolojisinin Ana Hatları*. 2. basım, Beta Basım Yayıncılık, İstanbul, 1986, s.200-202.
- 32- Tekelioğlu M: *İnsanın Üremesi ve Gelişmesi*. 1. basım, Dumat Ofset Matbaacılık, Ankara, 1995.
- 33- Gayton AC: Hücre fonksiyonlarının genetik kontrolü, protein sentezi ve hücre çoğalması. *Fizyoloji*, cilt 1, 5. baskıdan türkçeye çevrilmiş 1. baskı, Ankara, Güven Kitabevi Yayınları, 1977, s. 43-85.
- 34- Kumagai and McGuire MH: *Cellular and molecular biology. Surgery For Bone and Soft-Tissue Tumors*, Edited By M.A Simon and D. Springfield. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1998. pp. 9-20.

- 35- Sandberg AA: The chromosomes and the cell cycle. In *Diagnostic Cytology and its Histopathologic Bases*, Koss LG (ed), Vol1 4th ed., Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1992, pp.154-192.
- 36- Braylan RC: Flow cytometry. *Arch Pathol Lab Med.* 107: 1, 1983.
- 37- Koss LG: Flow cytometry. In *Diagnostic Cytology and Its Histopathologic Bases*, Koss LG (ed) Vol2, 4th ed., Philadelphia. JB Lippincott Company, 1992, pp. 1613-1657.
- 38- Conn JS, Landay AL, Weinstein RS: Biology of disease. *Advanced in flow cytometry for diagnostic pathology.* *Lab Invest* 57: 453, 1987.
- 39- Larsen JK, Munch-Peterson B, Christiansen J, et al: Flow cytometric discrimination of mitotic cells: resolution of M, as well as G1, S and G2 phase nuclei with mitramycin, proidium iodide and ethidium bromide after fixation with formaldehyde. *Cytometry* 7: 54, 1986.
- 40- Fried J: Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. *J. Cell Biol* 71: 172, 1976.
- 41- Merkel DE, McGuire WL: Ploidy, proliferative activity and prognosis. *Cancer* 65: 1194, 1990.
- 42- Safalı M, Gedikođlu G, Celasun B ve Finci R: Flow cytometry/akım sitometrisinin patolojideki yeri: *Ankara Patoloji Bülteni*, 9(1): 92-106, 1992.
- 43- Nunamaker DM: Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop*, 355S: S56-S65, 1998.
- 44- Hedley DW: Flow Cytometry using paraffin embedded tissue: five years on. *Cytometry* 10: 220-241, 1989.
- 45- Brighton CT and Hunt RM: Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *J. Bone Joint Surg*, 73-A: 832-847, 1991.

- 46- Tiedeman JJ, Connolly JF, Strates BS and Lippiello L: Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. *Clin Orthop*, 268: 294-302, 1991.
- 47- Connolly JF, Guse R, Tiedeman J and Dehne R: Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clin Orthop*, 266: 259-270, 1991.
- 48- Rubak JM, Poussa M and Ritsila V: Effects of joint motion on the repair of articular cartilage with free periosteal graft: *Acta Orthop Scand*, 53: 187-191, 1982.
- 49- Rubak JM: Reconstruction of articular cartilage defects with free periosteal grafts. *Acta Orthop Scand*, 53: 175-180, 1982.
- 50- Rubak JM, Poussa M and Ritsila V: Chondrogenesis in repair of articular cartilage defects by free periosteal grafts in rabbits. *Acta Orthop Scand*, 53: 181-186, 1982.
- 51- O'Driscoll SW and Salter RB: The repair of major osteochondral defects in joint surfaces by neochondrogenesis with autogenous osteoperiosteal grafts stimulated by continuous passive motion. *Clin Orthop* 208: 131-140, 1986.
- 52- O'Driscoll SW and Salter RB: The induction of neochondrogenesis in free intra-articular periosteal autografts under the influence of continuous passive motion. *J Bone Joint Surg*, 66-A: 1248-1257, 1984.
- 53- Niedermann B, Boe S, Lauritzed J and Rubak JM: Glued periosteal grafts in the knee. *Acta Orthop Scand*, 56: 457-460, 1985.