



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı

**KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLAN SIÇANLARDA ADİPÖZ
KÖKENLİ STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN VE
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN KEMİK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Atilla Adnan EYÜBOĞLU

ANKARA, 2017



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı

**KRONİK BÖBREK HASTALIĞI OLAN SIÇANLARDA ADİPÖZ
KÖKENLİ STROMAL VASKÜLER FRAKSİYONUN VE
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN KEMİK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Atilla Adnan EYÜBOĞLU

TEZ DANIŞMANI

Yrd. Doç. Dr. Enver ARPACI

ANKARA, 2017

TEŞEKKÜR

Başkent Üniversitesi Hastanesinin kurulması ve bugünlere gelerek bilimsellik ve sağlık alanında tıba öncülük eden bir kurum haline dönüşmesini sağlayan ve bana eğitim imkanı tanıyan değerli hocam Prof. Dr Mehmet Haberal'a,

Uzmanlık eğitimim boyunca plastik cerrahi sanatını bana öğreten, algoritmik düşünce yapısı, yaratıcılığı ve hekimlik duruşu ile bana örnek olan, bilimsel yazı yazımı ve sunulması gibi birçok konuda katkıları bulunan; özverisi, tecrübesi ile rehberliğini ve emeğini hiçbir zaman esirgemeyen değerli Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nilgün Markal Ertaş'a,

Eğitimimin başlangıç zamanından beri engin hoşgörüsü ve öğreticiliği ile her zaman yanımda olan, plastik ve rekonstrüktif cerrahi etik ve kültürünü bizlere yansıtan, kıymetli hocam Prof. Dr. Hüseyin Borman'a,

Rekonstrüktif cerrahi prensipleri, kök hücre uygulamaları, mikrocerrahi ve daha birçok alanda beni eğiten, sorumluluk bilincini bana aşıl原因, bilimsellik ve deneysel alanda kendimi örnek aldığım, tezimin yapım aşamasında da çok büyük katkıları olan değerli hocam Doç. Dr. A. Çağrı Uysal'a,

Akademik alandaki başarıları ile bana örnek olan, tezimin şekillenmesi ve güncel fikirleri ile sayısız katkıları olan değerli tez danışmanın Yrd. Doç. Dr. Enver Arpacı'ya,

Başkent Adana hastanesinde özellikle rekonstrüktif cerrahi alanında cesareti ile bana örnek olan ve tezimin ön çalışmasında katkıları bulunan değerli hocam Doç. Dr. Harun Çöloğlu'na ve Uzm. Dr. Güllü Korkmaz Solmaz'a,

Asistanlık eğitimim sırasındaki türlü zorluklara beraber göğüs gerdiğim, birlikte dostluk ve dayanışma içinde çalıştığım sevgili arkadaşlarım Dr. Abbas Albayati ve Dr. Azer Zeynalov'a ve plastik cerrahi hakkında bilgilerimin gelişmesi konusunda tecrübeleri ile bana örnek olan Uzm. Dr. Burak Özkan ve Uzm Dr. Erhan Coşkun'a,

Tezimin deneysel kısmında bana yardımcı olan Dr. Karl Micheal Lux'a,

Tezimin histopatolojik incelemeler bölümüne özenli çalışmaları ile katkıda bulunan Doç. Dr. Ayşen Terzi'ye,

Tezimin biyokimyasal incelemelerinde katkılarında dolayı Doç. Dr. Ayşegül Haberal ve Dr. Sema Bozalıoğlu'na,

Tezimin radyolojik inceleme kısmındaki katkılarında dolayı Uzm Dr. Hale Turnaoğlu'na,

Tezimin biyomekanik kısmındaki katkılarında dolayı makine mühendisliği bölümünden Doç. Dr. Cenk Balçık'a,

Tezimin biyoistatistik değerlendirmesinde yardımcı olan Prof. Dr. Ersin Öğüş'e,

Yoğun geçen poliklinik günlerinde eğitime başladığım ilk günden beri anne şevkati ile her zaman yanımda olan Endercan Zeyrek hemşire hanım'a ve çok kıymetli bölüm sekreterlerimiz Ebru Diloğlu ve Emine Sincanoğlu'na,

Tezimin tüm aşamalarında desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili nişanlım Dr. Nurdan Kol'a,

Bugün bulunduğum konuma gelmemde ve hayatımın her aşamasında bana olan desteğini ve sevgisini asla esirgemeyen anneme, Ayrıca tıbbiye sanatını aile geleneği haline getirmeme vesile olan rahmetli dedelerim; jinekoloji uzmanı Dr. Kamuran Eyüboğlu ve kardiyooloji uzmanı Adnan Sönmez'li saygı ile anarak, küçük yaşlarımdan beri bana cerrahi nosyonu aşılayan genel cerrahi uzmanı babam ve hocam Prof. Dr. M. Erhun Eyüboğlu'na,

Başkent Hastanesi bünyesinde çalışan sayısız yardımcı personel, hemşire, sekreter ve değerli meslektaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

Saygılarımla

Dr. Atilla Adnan EYÜBOĞLU

ÖZET

Günümüzde Dünya nüfusunun %10 kadarında herhangi bir seviyede böbrek hastalığına bağlı problemler gözlenmektedir. Kronik böbrek hastalığının (KBH) osteoblast/osteoklast dengesinin bozulması ve mineralizasyonun azalması gibi mekanizmalar ile kemik yapısını bozduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, kronik böbrek hastalığı olan sıçanlarda yağ hücresi kökenli kök hücreden zengin stromal vasküler fraksiyonun (SVF) ve trombositten zengin plazmanın (TZP) kemik iyileşmesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

Çalışmada kullanılan 62 adet Sprague- Dawley cinsi erkek sıçan, Grup I (n:12), Grup II (n:12), Grup III (n:12) ve Grup IV (n:16) olmak üzere dört gruba ayrıldı. 10 sıçan SVF ve TZP eldesi için kullanıldı. Sağlıklı kontrol grubu olarak kullanılan Grup I hariç diğer gruplara KBH oluşturmak için cerrahi olarak 5/6 nefrektomi modeli uygulandı. Gruplardaki tüm sıçanların sol femurlarına tur motoru ile kırık oluşturulmasını takiben intramedüller kemik fiksasyonu uygulandı. Grup II sıçanlar KBH kontrol grubu olarak takip edildi. Grup III sıçanların kemik kırığı bölgesine kalsiyum ile jelleştirilmiş TZP verildi. Grup IV sıçanlarının kemik kırığı bölgesine TZP ve SVF tedavisi uygulandı.

Sıçanların KBH tanısı ve takibine yönelik, 3 haftalık aralık ile ağırlık ölçümü yapıldı ve 0. gün, 3, 6 ve 12. haftada sıçanların kan hemoglobin, üre ve kreatinin seviyeleri ölçüldü. Kandan kemik iyileşmesi parametreleri olan parathormon, D vitamini ve kalsiyum alınarak kemik kırığı oluşturulması öncesi ve sonrası olarak karşılaştırıldı. Kemik iyileşmesi ve kallus oluşumu; biyomekanik olarak üç nokta bükme testi, radyolojik olarak bilgisayarlı tomografi ve direkt grafi, histopatolojik olarak ve immun boya olan osteokalsin ile değerlendirildi. Kök hücrelerin osteoblastik dönüşümü immunfloresan mikroskopunda DiI boyaması ile gösterilmesi amaçlandı.

Grup II, III ve IV de bulunan KBH'li sıçanların ağırlık değişimi istatistiksel olarak anlamlı olarak bulundu. Morfolojik olarak kallus dokusu miktarı ve kemiğin düzgün iyileşme bulguları sırası ile: Grup IV> GrupIII> Grup I> Grup II olarak gözlemlendi. Kemiklerin mekanik dayanıklılıkları sırası ile: Grup IV> GrupIII> Grup I> Grup II olarak ölçüldü. Kemik iyileşmesinin radyolojik değerlendirilmesi rakamsal

değeri arttıkça iyileşmeyi gösteren modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemine göre yapıldı. Skorlama sonuçları: 3.91 ±0.64 (Grup I), 3.5 ±0.64 (Grup II), 5.08 ±1.44 (Grup III), 5.43 ±0.99 (Grup IV) olarak bulundu. Kortikal kemik iyileşme bölgesinden, kallusun en dış noktasına olan kalınlıklarının ölçülmesi sonucu ortalama kallus kalınlıkları; 2.16 ±0.51 (Grup I), 1.75 ±0.50 (Grup II), 2.90 ±0.26 (Grup III), 3.23 ±0.41 (Grup IV) olarak ölçüldü. Kemik iyileşmesi skorlama sistemi sonuçları ile ölçülen kallus kalınlıklarının karşılaştırılmasında; skorlama sistemi ile kallus kalınlıkları arasında anlamlı korelasyon gözlemlendi. 0. gün, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan kan örneklerinde BUN, kreatinin seviyelerinde yükselme ve hemoglobin seviyelerindeki düşme anlamlı bulundu. Tüm denek gruplarında kan kalsiyum, PTH ve D vitamini sonuçlarında düşüş gözlemlendi. KBH'lı gruplardaki sıçanlarda kırık öncesi benzer kemik iyileşmesi parametreleri gözükmekte iken uygulanan TZP ve SVF tedavileri sonrası vitamin ve minerallerdeki azalma daha az oldu. Histopatolojik değerlendirmede kemik dokunun iyileşme skorlaması (Allen skorlaması) sonuçları 4.71±0.99 (Grup I), 4.17 ±0.62 (Grup II), 5.17 ±0.90 (Grup III), 5.38 ±0.88 (Grup IV) olarak bulundu. Kemik dokunun mineralizasyon miktarları 1.43 ±0.49 (Grup I), 1.33 ±0.47 (Grup II), 1.50 ±0.50 (Grup III), 1.68 ±0.49 (Grup IV) olarak bulundu. Kemik dokunun immunohistokimyasal incelenmesinde osteokalsin ile boyanma yoğunluklarına göre 1.43 ±0.49 (Grup I), 1.33 ±0.47 (Grup II), 2.17 ±0.37 (Grup III), 2.38 ±0.49 (Grup IV) olarak bulundu. Kemik hücrelerine özel immünolojik boya olan osteokalsin ile boyalı preparatlar aynı kesitlerin DiI boyaması ile karşılaştırıldı. Adipoz kaynaklı kök hücrelerin kemik hücrelerine dönüşüm gösterildi.

Çalışmamızda kronik böbrek hastalığının kemik iyileşmesine olan olumsuz etkilerinin TZP ve SVF tedavileri ile mekanik, histolojik, radyolojik ve biyokimyasal olarak daha olumlu parametreler elde edilebileceği gösterildi. Kemik kırığı sonrası oluşan kallus dokusunun kalınlığı kemik dokunun iyileşme sürecini uzatsa da geç dönemde daha sağlam kemik oluşumuna öncül olacağı gösterildi. KBH hastalarında kemik iyileşmesinin hızlandırılması ve regüle edilmesi amacı ile mezenkimal kök hücre uygulanması sonrası hayvan çalışmalarında elde edilen olumlu sonuçların klinik uygulamada benzer etkileri gösterebileceği düşüncesindeyiz.

Anahtar kelimeler: Adipoz Kökenli Stromal Vasküler Fraksiyon, Kronik Böbrek Hastalığı, Trombositten Zengin Plazma, Kemik İyileşmesi

ABSTRACT

Present studies show that %10 of the world population have problems related to kidney disease at any level. It is known that chronic kidney disease (CKD) impairs osteoblast/ osteoclast balance and damages bone structure with mechanisms such as diminished mineralization. In this study; we aim to investigate the effects of adipose derived stromal vascular fraction (SVF) and platelet-rich plasma (PRP) on bone healing model in rats with chronic renal failure.

In this study; 62 male Sprague- Dawley rats were used and separated into four groups as, Group I (n:12), Group II (n:12), Group III (n:12), Group IV (n:16). 10 rats were used for harvesting SVF and PRP. All groups except Group I, which was used as healthy control group, had CKD surgery using 5/6 nephrectomy operation. Both groups had intramedullary pin fixation after receiving bone fracture on their left femur with the help of drilling tools. Group II rats were used as control group for CKD. Group III rats received PRP treatment on fracture site. Group IV rats received PRP and SVF treatment on fracture site.

Rats were diagnosed and followed as CKD with weight loss parameters and hemoglobin, urea and creatinine measurements are made at the beginning, 3rd, 6th and 12th weeks. Parathormone, vitamin D and calcium levels are measured before and after bone fracture for bone healing parameters. Bone healing and amount of callus formation is compared; biomechanically with three point bending test, radiologically with computed tomography and X-ray graphy, histopathologically and immunohistochemically with osteocalcine staining. Osteoblastic transformation of stem cells were assessed with DiI staining under immunoflorescent microscope.

Group II, III ve IV rats with CKD had statistically significant weight loss. Morphological examination of callus formation and bone healing finding were as GroupIV> Group III> Group I> Group II. Biomechanical properties and resistance of bone tissue was measured as Group IV> Group III> Group I> Group II. Radiological findings are evaluated using modified Lane and Sandru scoring system which is a numerical scoring system that shows improvement as the score increases were resulted

as; 3.91 ±0.64 (Group I), 3.5 ±0.64 (Group II), 5.08 ±1.44 (Group III), 5.43 ±0.99 (Group IV). The distance between cortical bone healing zone and outer margin of callus formation is measured as; 2.16 ±0.51 (Group I), 1.75 ±0.50 (Group II), 2.90 ±0.26 (Group III), 3.23 ±0.41 (Group IV). There was a correlation between results of bone healing scoring system and thickness of callus formation.

Blood samples that were taken on first day, 3rd, 6th and 12th weeks show significant increase in plasma urea level and creatine and decrease in hemoglobin levels. All groups had decrease in calcium, parathormone and vitamin D levels. Rats with CKD had similar bone healing parameters comparing before bone fracture and after SVF and PRP treatment; decrease in vitamin and mineral levels had lower rate of decrease. Histopathologic evaluation was made using Allens scoring system which was resulted as; 4.71±0.99 (Group I), 4.17 ±0.62 (Group II), 5.17 ±0.90 (Group III), 5.38 ±0.88 (Group IV). Amount of bone mineralization was found as; 1.43 ±0.49 (Group I), 1.33 ±0.47 (Group II), 1.50 ±0.50 (Group III), 1.68 ±0.49 (Group IV). Immunohistochemical evaluation of bone tissue with osteocalcin staining resulted as; 1.43 ±0.49 (Group I), 1.33 ±0.47 (Group II), 2.17 ±0.37 (Group III), 2.38 ±0.49 (Group IV). Bone cells which are stained with osteocalcin were compared with slides with DiI staining. Transformation of adipose derived stem cells to bone cells were noted.

In this study; We proved that negative effects of chronic renal disease on bone healing can be reduced by increasing mechanical, histological, radiological and biochemically with SVF and PRP treatments. Although thickness of callus tissue delays bone healing process, it also enhances biomechanical and organisation of bone tissue in long term. We conclude that stem cell therapies were effective for bone healing in animal models which can be promising for clinical trials.

Anahtar kelimeler: Adipose Derived Stromal Vascular Fraction, Bone Healing, Chronic Renal Disease, Platelet Rich Plasma

İÇİNDEKİLER

Teşekkür.....	iii
Özet.....	v
İngilizce Özet.....	vii
İçindekiler Dizini.....	ix
Kısaltmalar.....	xiii
Şekiller Dizini.....	xvi
Tablolar Dizini.....	xx
1. Giriş ve Amaç.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1 Kemik Dokusu.....	3
2.1.1 Kemik dokunun görevleri.....	3
2.1.2. Kemiklerin sınıflandırılması.....	3
2.1.3 Kemik dokunun yapısal özellikleri.....	6
2.1.4 Kemik hücreleri.....	6
2.1.4.1 Osteojenik (Osteoprogenitör) hücreler.....	7
2.1.4.2 Osteoblastlar.....	7
2.1.4.3 Osteositler.....	9
2.1.4.4 Osteoklastlar.....	10
2.1.5 Ekstraselüler kemik matriksi.....	12
2.1.6 Kemik tipleri.....	12
2.1.7 Kemik gelişimi.....	13
2.1.7.1 İntramembranöz kemikleşme.....	14
2.1.4.1 Endokondral kemikleşme.....	15
2.1.8 Kemik kırığı ve sınıflandırılması.....	16
2.1.8.1 Kemik kırığı tanımı.....	16
2.1.8.2 Kemik kırığı sınıflandırılması.....	17
2.1.8.3 Kemik kırığı nedenleri ve oluşum mekanizması.....	18

2.1.8.4 Kemik kırığı belirti ve bulguları.....	18
2.1.8.5 Kemik kırığı radyolojik incelemesi	18
2.1.9 Kırık iyileşmesi	22
2.1.9.1 Kırık iyileşmesinin evreleri	22
2.1.9.2 Kırık iyileşmesinin düzenlenmesi	27
2.1.9.3 Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler	28
2.1.10 Kırık tedavileri.....	29
2.1.10.1 Hayati tehlikesi olan kırık hastasına yaklaşım	29
2.1.10.2 Kırık tedavi yöntemleri.....	31
2.2 Kronik Böbrek Hastalığı	37
2.2.1 Kronik böbrek hastalığı tanımı	37
2.2.2 Kronik böbrek hastalığı epidemiyolojisi	37
2.2.3 Kronik böbrek hastalığı etiyolojisi	38
2.2.4 Kronik böbrek hastalığı ile GFH ilişkisi	39
2.2.5 Kronik böbrek hastalığının sistemik etkileri	40
2.2.6 Kronik böbrek hastalığı ve kemik iyileşmesi	42
2.2.6.1 Kemik ve mineral metabolizması bozukluklarının patogenezi..	43
2.2.6.2 Kemik ve mineral metabolizması bozukluklarının değerlendirildi.	44
2.2.7 Kronik böbrek hastalığı deneysel modelleri.....	45
2.2.7.1 Cerrahi yöntemler	45
2.2.7.2 Farmakolojik yöntemler	46
2.3 Kök Hücreler	48
2.3.1 Genel bilgiler.....	48
2.3.2 Kök hücrelerin sınıflandırılması	50
2.3.3 Embriyonik kök hücreler.....	52
2.3.4 Erişkin kök hücreler	53
2.3.4.1 Mezenkimal kök hücreler.....	54
2.3.4.2 Mezenkimal kök hücre kaynakları	56
2.3.4.3 Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri.....	60
2.3.4.4 Mezenkimal kök hücrelerin dokularda gösterilmesi	60
2.3.4.5 Mezenkimal kök hücreler ve rejeneratif tıp	62
2.3.4.6 Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımı	63

2.4 Trombositten Zengin Plazma	66
2.4.1 Trombositlere genel bakış	66
2.4.2 Trombosit fonksiyonları	69
2.4.3 Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri.....	69
2.4.3.1 Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF).....	69
2.4.3.2 Fibroblast büyüme faktörü (FGF)	70
2.4.3.3 Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	71
2.4.3.4 Epidermal büyüme faktörü (EGF)	71
2.4.3.5 Transfome edici büyüme faktörü (TGF- β).....	71
2.4.3.6 İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1)	72
2.4.4 Trombositten zengin ürünler	73
2.4.4.1 Trombositten zengin plazma (TZP)	73
2.4.4.2 Trombositten zengin fibrin (TZF).....	74
2.4.5 Trombositten zengin plazma ve kemik iyileşmesi	73
3. Gereç ve Yöntem	76
3.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması	76
3.2 Deney hayvanlarının bakımı	77
3.3 Deneyde kullanılan malzemeler	77
3.4 Kırık modeli ve cerrahi işlemler	78
3.4.1 Kronik böbrek hastalığı oluşturulması (5/6 Nefrektomi).....	78
3.4.2 Stromal vasküler fraksiyonun hazırlanması	81
3.4.3 Trombositten zengin hazırlanması	85
3.4.4 Cerrahi kırık modelinin hazırlanması.....	87
3.5 Deney protokolü.....	90
3.6 Makroskopik değerlendirme	91
3.6.1 Kemik dayanıklılığı ölçülmesi (Mekanik stres testi).....	92
3.6.2 Radyolojik değerlendirme	93
3.7 Laboratuvar değerlendirme	93
3.7.1 Kronik böbrek hastalığı doğrulanması.....	94
3.7.2 Kemik iyileşmesi testleri	94
3.8. Histopatolojik değerlendirme	94
3.8.1 Kemik dokunun mikroskopik değerlendirilmesi	96

3.8.2 Kemik dokunun immunolojik boyanması.....	97
3.8.3 DiI işaretli kök hücrelerin izlenmesi.....	97
3.9 Biyoistatistik değerlendirme	98
4. Bulgular	99
4.1 Ağırlık değerlendirilmesi	99
4.2 Kemiklerin makroskopik bulguları	100
4.3 Kemik dayanıklılığı sonuçları (Mekanik yöntem)	100
4.4 Kemik iyileşmesinin radyolojik bulguları.....	101
4.5 Kan örnekleri test sonuçları	105
4.5.1 Böbrek fonksiyon testlerinin sonuçları	105
4.5.2 Kemik iyileşmesi laboratuvar testlerinin sonuçları.....	108
4.6 Histopatoloji ve immunohistokimyasal değerlendirme bulguları	112
4.6.1 Kemik iyileşmesinin histopatolojik değerlendirmesi.....	113
4.6.2 Kemik iyileşmesinin immunohistokimyasal değerlendirmesi	115
4.6.3 DiI boyalı kemik hücrelerinin gösterilmesi.....	115
5. Tartışma.....	117
6. Sonuç.....	126
7. Referanslar	127

KISALTMALAR

<i>ADP:</i>	Adenozin difosfat
<i>AKKH:</i>	Adipoz kökenli kök hücre
<i>AKS:</i>	Açık kanaliküler sistem
<i>ALS:</i>	Amiyotrofik lateral skleroz
<i>ALP:</i>	Alkalen fosfataz
<i>ark.:</i>	Arkadaşları
<i>ATP:</i>	Adenozin trifosfat
<i>BLC:</i>	Kemik döşeme hücreleri
<i>BMP:</i>	Kemik morfojenik protein
<i>BSPI/II:</i>	Kemik sialoprotein I/II
<i>BT:</i>	Bilgisayarlı tomografi görüntülemesi
<i>BUN:</i>	Kan üre azotu (Blood Urea Nitrogen)
<i>Ca:</i>	Kalsiyum
<i>CD:</i>	Farklanma kümeleri (Clusters of Differentiation)
<i>CDGF:</i>	Kondroblast kökenli büyüme faktörü
<i>CFSE:</i>	Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester
<i>dk:</i>	Dakika
<i>Dlx5:</i>	Distal-less homeobox 5
<i>DMEM:</i>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<i>DMP1:</i>	Dentin matriks proteini 1
<i>DiI:</i>	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine
<i>ECDGF:</i>	Endoteliyal hücre kaynaklı büyüme faktörü
<i>EDTA:</i>	Etilendiamin tetraasetik asit
<i>EGF:</i>	Epidermal büyüme faktörü
<i>ELISA:</i>	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
<i>ER:</i>	Endoplazmik retikulum
<i>FACS:</i>	Floresan yardımcı hücre sayımı

<i>FBS:</i>	Fetal buzağı serumu
<i>FCS:</i>	Fetal calf serum
<i>FGF:</i>	Fibroblast byme faktr
<i>G:</i>	Yer ekimi (Gravity)
<i>GAG:</i>	Glikozaminoglikan
<i>GFP:</i>	Yeşil floresan proteini
<i>GİS:</i>	Gastro-intestinal sistem
<i>GVHD:</i>	Konağın karşı vericinin hcrelerine karşı reaksiyonu
<i>H:</i>	Hidrojen
<i>H&E:</i>	Hematoksilen ve eosin
<i>Hgb:</i>	Hemoglobin
<i>HKH:</i>	Hematopoetik kk hcre
<i>HLA:</i>	İnsan lkosit antijeni
<i>HS:</i>	İnsan serumu
<i>PTH:</i>	Parathormon
<i>IGFs:</i>	İnslin benzeri byme faktr
<i>IL:</i>	İnterlkin
<i>i.p:</i>	Periton içerisine
<i>i.v:</i>	Damar içerisine
<i>K:</i>	Potasyum
<i>KBH:</i>	Kronik bbrek hastalığı
<i>kg:</i>	Kilogram
<i>M-CSF:</i>	Makrofaj koloni stimulan faktr
<i>MDGF:</i>	Makrofaj kaynaklı byme faktr
<i>MKH:</i>	Mezenkimal kk hcre
<i>ml:</i>	Mililitre
<i>MMP-9:</i>	Matrix metalloproteinase-9
<i>MR:</i>	Manyetik rezonans grntlemesi

<i>Na:</i>	Sodyum
<i>P:</i>	Fosfor
<i>PBS:</i>	Fosfat tamponlu serum fizyolojik
<i>PDGF:</i>	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<i>PIGF:</i>	Plasental büyüme faktörü
<i>PTH:</i>	Parathormon
<i>PRP:</i>	Trombositten zengin plazma
<i>RANKL:</i>	Reseptör aktivator nükleer kappa B ligandı
<i>rpm:</i>	Dakikadaki dönüş sayısı (Round Per Minute)
<i>Runx2:</i>	Runt- ilişkili transkripsiyon faktörleri 2
<i>TDGF:</i>	Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
<i>TEN:</i>	Titanyum intra-medüller çivi
<i>TGF- β:</i>	Dönüştürücü büyüme faktörü beta
<i>TRAP:</i>	Tartrate-rezistan asit fosfataz
<i>vb.:</i>	ve benzeri
<i>VEGF:</i>	Vasküler endotelial büyüme faktörü
<i>YTS:</i>	Yoğun tübüler sistem
<i>Wnt:</i>	Wingless

ŞEKİLLER

Şekil 2.1: Kemiklerin şekillerine göre sınıflandırılması

Şekil 2.2: Uzun kemiklerin yapısı

Şekil 2.3: Kemik doku hücreleri

Şekil 2.4: Osteoblast hücresinin elektron mikroskopu görüntüsü

Şekil 2.5: Osteosit hücreler arası sıkı bağlantıların elektron mikroskopu görüntüsü

Şekil 2.6: Osteoklast hücresinin elektron mikroskopu görüntüsü

Şekil 2.7: (a) Süngerimsi ve (b) lameller kemiğin mikroskopik görüntüsü

Şekil 2.8: (a) Mezenkimal hücrelerin kümelenerek kemikleşme merkezini oluşturması (b) Osteoid salgısı sonrası osteoblastların hapis olarak osteosite dönüşümü (c) Trabeküler matriks ve periost oluşumu (d) Trabeküler kemik üzerinde kompakt kemiğin oluşumu ve zengin damar ağı

Şekil 2.9: Endokondral kemikleşme 5 aşamada gerçekleşir. (a) Mezenkimal hücrelerin kondrositlere dönüşümü (b) Kemiği oluşturacak olan kıkırdak modelin oluşumu (c) Kapiller oluşumu ve perikondriumun periosta dönüşümü (d) Kıkırdak ve kondrositlerin kemik uçlarına ilerleyişi (e) Sekonder kemikleşme merkezleri oluşumu (f) Kıkırdak dokunun epifiz (büyüme) plağında ve eklem yüzlerinde kalması

Şekil 2.10: Kırık oluşturan kuvvetler ve yönleri

Şekil 2.11: Kırık iyileşmesi dönemleri

Şekil 2.12: Kırık iyileşmesi tamir evreleri a)Hematom b)Yumuşak kallus c)Sert kallus d)Remodeling

Şekil 2.13: Travmalı hastanın taşınması

Şekil 2.14: Sirküler alçı görünümü

Şekil 2.15: Cilt ve iskelet traksiyonu

Şekil 2.16: İlizarov sirküler eksternal fiksatorü

Şekil 2.17: İnternal fiksasyon: Plak, vida ve medüller çivi örnekleri

Şekil 2.18: Sağ nefrektomi ve sol 2/3 nefrektomi yöntemi

Şekil 2.19: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri

Şekil 2.20: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması

Şekil 2.21: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması

Şekil 2.22: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşabildiği dokular

Şekil 2.23: Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik farklılaşma

Şekil 2.24: Trombositlerin ultrastrüktürel yapısı

Şekil 2.25: Trombositlerin bölgesel incelemesi

Şekil 2.26: Trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin görevleri

Şekil 2.27: PRF katmanlarının şematik görünümü

Şekil 3.1: A) 4 cmlik orta hat kesisi B) Sağ böbrek için cilt barsak anslarının ekarte edilmesi

Şekil 3.2: A) Abdominal organların ekarte edilmesi. Sol böbreğin üst ve alt pollerinin kortekse zarar vermeyecek sıklıkta bağlanması B) Sol böbreğin alt ve üst pollerinin çıkartılması sonrası görüntüsü

Şekil 3.3: İnguinal bölgeden fibroadipöz doku alınması ve petri kabında tartılması

Şekil 3.4: Petri kabı içerisinde yağ dokunun doku makasıyla parçalanması ve pipetle transferi

Şekil 3.5: Yıkama sonra dokuların petri kabı içerisinde ve santrifüj tüpündeki görüntüsü

Şekil 3.6: Tip 1 kollajenin hassas terazide tartılması ve karışımın vorteks ile karıştırılması

Şekil 3.7: Santrifüj cihazının ayarlanması ve süspansiyonun santifüj sonrası görüntüsü

Şekil 3.8: Rektus kasının posterior rektus kılıfı üzerinden disseksiyonu.

Şekil 3.9: Thoma lamında ışık mikroskopu yardımıyla kök hücre sayılması ve büyük sitoplazmalı kök hücrelerin mikroskopik görüntüsü

Şekil 3.10: DiI sitoplazmik boya çözeltisinin +4 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakılması

Şekil 3.11: Sıçanlardan TZP hazırlanması için intrakardiyak kan alınması

Şekil 3.12: Sodyum sitratlı tüplerin santirfüj cihazından dikkatli alınması ve TZP'nin santrifüj sonrası görüntüsü.

Şekil 3.13: Kalsiyum glukonatın sıçanlardan hazırlanmış TZP ile petri kabında birleştirilmesi

Şekil 3.14: TZP'nin jelleştirme kontrolü ve TZP'lerin kırık üzerine uygulanmak üzere eşit parçalara bölünmesi

Şekil 3.15: Çalışmada kullanılan tur motoru ve elmas ucu

Şekil 3.16: Hayvanın cerrahi masaya sabitlenmesi ve kesi planı çizimi

Şekil 3.17: Sıçan sağ femur kemiğinin diseksiyonu ve tur aleti ile kemik kırılması sonrası görüntüsü

- Şekil 3.18: Oluşturulan kemik kırığının intramedüller olarak sabitlenmesinin aşamaları
- Şekil 3.19: Kemik kırık uçları arasında stabilizasyonun kontrolü
- Şekil 3.20: Jelleştirilmiş TZP'nin kırık hattı üzerine direkt uygulanması
- Şekil 3.21: Universal kuvvet cihazı ve bükme testi için hazırlanan test düzeneği
- Şekil 3.22: Test edilecek kemiklerin temizlenmesi. Normal kemik ve kallus oluşmuş kemiğin görüntüsü
- Şekil 3.23: Sıçanın kuyruk veninden kan alınması
- Şekil 3.24: Patoloji preparatlarının numaralandırılması ve kasetlere yazılması
- Şekil 3.25: Kemik dokunun patoloji kasetine yerleştirilmesi
- Şekil 3.26: Allen ve ark. kırık iyileşmesi skorlamaları; Kemiklerin mikroskop altında görüntüsü, H&E boyama, x20 büyütmede. A; skor 3, B; skor 4, C; skor 5, D; skor 6 örnekleri.
- Şekil 3.27: Osteokalsin yoğunluğu skorlaması
- Şekil 4.1: Deneklerin ağırlıklarının zamana göre ortalama değişimleri (*p<0.05)
- Şekil 4.2: Kemiklerin makroskopik görüntüsü; A: Grup I, B: Grup II, C: Grup III, D: Grup IV
- Şekil 4.3: Kemik dokunun üç nokta bükme testi sonuçlarının ortalaması
- Şekil 4.4: Modifiye Lane ve Sandru skorlama sisteminin gruplar arası ortalaması
- Şekil 4.5: Tüm grupların ortalama kallus kalınlıkları sonuçları (mm)
- Şekil 4.6: Kallus kalınlığı ölçülmesinde gruplardan örnekler
- Şekil 4.7: Modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemi ile kallus kalınlığı arasındaki korelasyon
- Şekil 4.8: Grup II'deki sıçanların ortalama BUN, Kreatinin ve Hgb değişimi (p<0.05)
- Şekil 4.9: Grup III'deki sıçanların ortalama BUN, Kreatinin ve Hgb değişimi (p<0.05)
- Şekil 4.10: Grup IV'deki sıçanların ortalama BUN, Kreatinin ve Hgb değişimi (p<0.05)
- Şekil 4.11: Grup I'deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi
- Şekil 4.12: Grup II'deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi
- Şekil 4.13: Grup III'deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi

Şekil 4.14: Grup IV'deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi

Şekil 4.15: Ca, PTH, D vitamini değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

Şekil 4.16: KBH'lı böbreklerin H&E boyasında x200 büyütmede mikroskopik görünümü

Şekil 4.17: Allen skorlama sistemine göre grupların histolojik örnekleri H&E x20 büyütmede; A: Grup I, ince kallus dokusu. B: Grup II, az gelişen kemik doku. C: Grup III, kallus dokusunda belirgin artış. D: Grup IV, yüklü kallus dokusu

Şekil 4.18: Preparatların osteokalsin ile immunohistokimyasal boyaması (x200 ışık mikroskopi) ve DiI boyalı hücrelerin gösterilmesi (x200 immunfloresan mikroskopi)

Şekil 4.19: Havers kanalları etrafında bulunan DiI boyalı hücreler ve DiI ile boyanmış (Kök hücreden dönüşüme uğramış) osteoblast hücrelerinin görüntüsü.

TABLolar

- Tablo 2.1: Kemiğin yeniden yapılandırılmasında rol oynayan faktörler
- Tablo 2.2: Kemiğin uyarıcı faktörler ve kemik iyileşmesindeki rolleri
- Tablo 2.3: Kronik böbrek hastalığı tanı kriterleri
- Tablo 2.4: Kronik böbrek hastalığı nedenleri
- Tablo 2.5: GFH kategorileri; Yeşil: Düşük risk Sarı: Orta risk Turuncu: Yüksek risk, Kırmızı: Çok yüksek risk belirtmektedir.
- Tablo 2.6: Üremik sendromun multisistemik etkileri.
- Tablo 2.7: KBH evrelerine göre serum Ca, P, ALP ve PTH kontrol sıklığı ve hedef PTH değerleri
- Tablo 2.8: Kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerine göre sınıflandırılması
- Tablo 2.9: Kök hücre kaynakları ve oluşturdukları hücreler
- Tablo 2.10: Yetişkinde mezenkimal kök hücre kaynaklarına örnekler
- Tablo 2.11: AKKH'lerin yüzey belirteçleri ve görevleri
- Tablo 2.12: Kök hücre kaynakları ve CD markerları
- Tablo 2.13: MKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri
- Tablo 2.14: Trombosit yapısındaki granüllerin içerikleri
- Tablo 3.1: Deneysel çalışmanın zaman/yöntem özeti
- Tablo 3.2: Anestezi ve cerrahide kullanılan farmakolojik maddeler.
- Tablo 3.3: SVF eldesi sırasında kullanılan kimyasal maddeler
- Tablo 3.4: Deneysel çalışma sırasında kullanılan malzemeler
- Tablo 3.5: Modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemi
- Tablo 4.1: Çalışmadaki sıçanların deney sırasındaki ağırlık değişiklikler
- Tablo 4.2: Her gruptan rastgele seçilen 6 sıçanın mekanik dayanıklılığı
- Tablo 4.3: Grup I sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları
- Tablo 4.4: Grup II sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları
- Tablo 4.5: Grup III sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları

Tablo 4.6: Grup IV sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları

Tablo 4.7: Grup I sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası alınan böbrek fonksiyon testleri

Tablo 4.8: Grup II sıçanların deney başlangıç, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan BUN, kreatinin ve Hgb değerleri

Tablo 4.9: Grup III sıçanların deney başlangıç, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan BUN, kreatinin ve Hgb değerleri

Tablo 4.10: Grup IV sıçanların deney başlangıç, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan BUN, kreatinin ve Hgb değerleri

Tablo 4.11: Grup I sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

Tablo 4.12: Grup II sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

Tablo 4.13: Grup III sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

Tablo 4.14: Grup IV sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

Tablo 4.15: Kemik iyileşmesinin patolojik skorlaması olan Allen skorlaması sonuçları

Tablo 4.16: Kemik iyileşme bölgesinde mineralizasyon şiddeti sonuçları

Tablo 4.17: Kallus dokusunda osteokalsin ile boyanma yoğunluğu sonuçları

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Günümüzde her on kişiden birinde herhangi bir seviyede böbrek hastalığı ve buna bağlı problemler gözlenmektedir [1]. Kronik böbrek hastalığı (KBH) tablosunda böbrek fonksiyonları bozulmasına bağlı olarak kalsiyum, parathormon ve D vitamini gibi kemik yapısının sağlamlığını sağlayan vitamin ve minerallerin dengesi bozulmaktadır. Plastik cerrahi pratiğinde KBH'ye ek olarak kemik ile ilgili deformiteleri olan hastalara rekonstruksiyon uygulanmaktadır. Bu ve benzeri hastalara basit kemik cerrahisi yapılabildiği gibi kemik içeren serbest doku nakli gibi tekniği ve uygulaması güç ameliyatlarda da yapılmaktadır. Yapılan uygulamalarda kemiğin kaynamaması, yanlış kaynaması veya kaybedilmesi görülebilmektedir. Bu hasta gruplarında cerrahi başarı oranını arttıracak büyüme faktör uygulamaları, ilaç tedavileri, genetik tedaviler ve hücresel düzeyde birçok çalışma yapılmaktadır. Kök hücre ve benzer prensipte olan stromal vasküler fraksiyon (SVF) çalışmaları bu konuda en çok ilgi çeken konulardan birisidir.

Doğum ve doğum öncesi dönemde canlının vücudunda bulunan ve her tür dokuya dönüşebilme yeteneğine sahip olan farklılaşmamış hücrelere kök hücre adı verilir. Kök hücreler genler ve dış uyaranlardan aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliği vardır. Kök hücreler mezenkimal ve embriyonel olarak 2 temel gruba ayrılırlar. Embriyonel dönemin bitmesini takiben mezenkimal kök hücre (MKH) erişkin form kök hücre formunda tüm dokularında latent evrede beklerler. Genler ve dış uyaranlardan aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler [2,3].

MKH'ler tüm dokularda bulunmasına rağmen en fazla kemik iliği ve adipöz dokularda bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda kemik iliği ve adipöz kökenli kök hücrelerin farklılaşma kapasiteleri arasında fark olmadığı gösterilmiştir [4,5]. Adipöz kökenli kök hücreler alınma ve işleme kolaylığı nedeni ile günümüzde kök hücre tedavilerinde kullanımı daha ön plana çıkmaktadır [6]. Yüksek sayıda kök hücrenin bulunduğu ve büyüme faktörleri ile makrofaj, trombosit vb. hücrelerin yoğun olduğu doku kokteyline stromal vasküler fraksiyon adı verilir. Kök hücre tedavisiyle benzer özellik taşıyan SVF, doku yenilenmesi ve hasar onarımında önemli bir yöntem olarak kullanılmaktadır [7,8].

Trombositten zengin plazma plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi pratiğinin her basamağında hücre yenilenmesinin attırılmasında ve hızlandırılmasında kullanılmaktadır. Trombositlerin içerdiği büyüme faktörlerinin doku rejenerasyonuna katkısı nedeni ile alopesi tedavisinden eklem kapsülü yenilenmesine kadar geniş uygulama alanı bulmaktadır. Ayrıca visköz olması ve otojen yapısı nedeniyle yabancı cisim reaksiyonu yaratmadan in-vivo çalışmalarda iyi bir taşıyıcı olarak kullanılmaktadır [9]. Hücre yenilenme kapasitesi ve kök hücre içeren SVF ye taşıyıcı olarak ideal bir yöntem olarak uygulanılmaktadır.

Literatürde kök hücrenin kemik iyileşmesinde olumlu etkileri olduğu yönünde bildiriler bulunmaktadır [10]. Kronik böbrek hastalığının da osteoblast/ osteoklast dengesini, mineralizasyon azalması vb. mekanizmalar ile kemik yapısını bozduğu bilinmektedir [11]. Ancak ciddi bir hasta grubunu oluşturan kronik böbrek hastalıklı hastalarda oluşabilecek kemikte iyileşme problemlerine karşı kök hücrelerin ve TZP'nin etkileri hakkında deneysel çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada; kronik böbrek yetmezliği olan sıçanlarda yağ hücresi kökenli kök hücreden zengin stromal vasküler fraksiyonun ve trombositten zengin plazmanın kemikte yara iyileşmesi üzerine etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 KEMİK DOKUSU

2.1.1 Kemik dokunun görevleri

Kemik: %70'i inorganik, %22'si organik matriks ve %8'i su moleküllerden oluşan vücudun en sert dokularından birisidir. Yapısında hidroksiapatit kristalleri ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), osteositler, osteoklastlar, osteoblastlar, hematopoetik hücreler, kollajen lifler, kan damarları ve sinirler bulunan kemik doku, insan vücudunun lokomotor sistemin en önemli destek dokusudur [12]. Kemik doku yapısal olarak hücrelerden, liflerden ve temel maddeden oluşan bağ dokularına benzemektedir ancak kemik dokunun dış matriksi kalsifiye olmuştur [13]. Kemik, kendini yenileme ve onarma yeteneğine sahip bir dokudur.

Kemik dokusunun organizmada çeşitli fonksiyonları vardır:

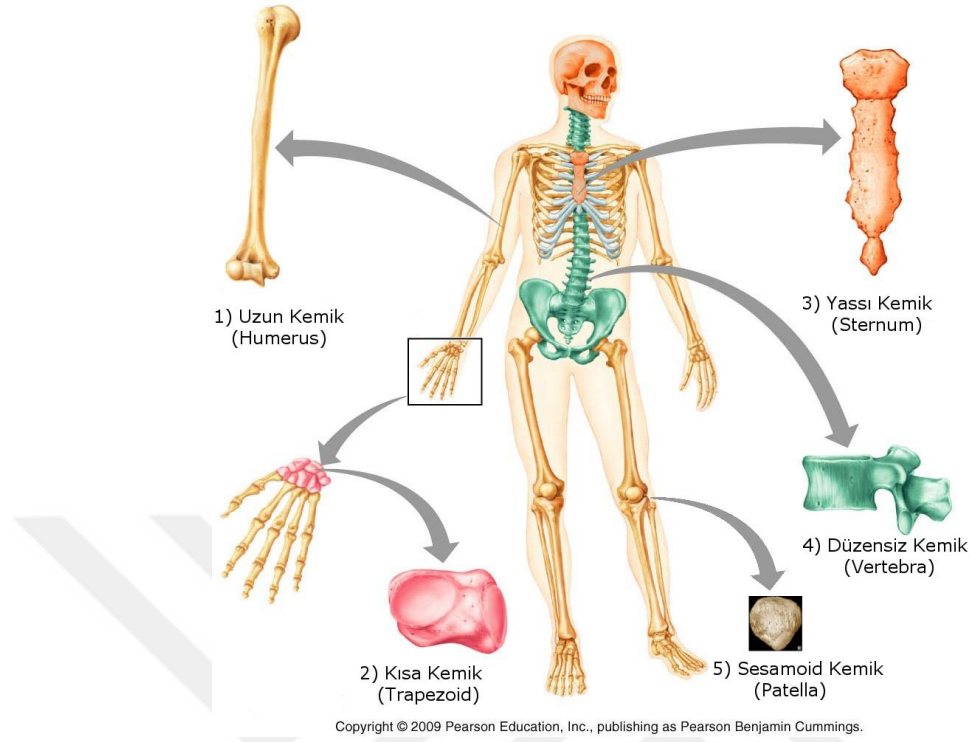
- 1) Organizmaya mekanik destek ve dayanıklılık sağlar.
- 2) Yumuşak dokulara destek ve motor hareket kazandırır.
- 3) Beyin ve spinal kord gibi önemli yapıları korur.
- 4) Kalsiyum-fostat dengesinde ve depolanmasında rol oynar.
- 5) Hematopoez için uygun ortam sağlar.

2.1.2 Kemiklerin sınıflandırması

İnsan iskeleti aksial ve appendiküler iskelet olmak üzere iki kısımda incelenebilir. Yaşa göre değişiklik gösterebilmekle birlikte toplam insan vücudunda toplam 206 adet kemik bulunmaktadır [14].

Bu kemikler şekillerine göre sınıflandırılabilir (Şekil 2.1).

- 1) Uzun kemikler (ossa longa)
- 2) Kısa kemikler (ossa brevia)
- 3) Yassı kemikler (ossa plana)
- 4) Düzensiz kemikler (ossa appendiculare)
- 5) Sesamoid kemikler (ossa sesamoidea)



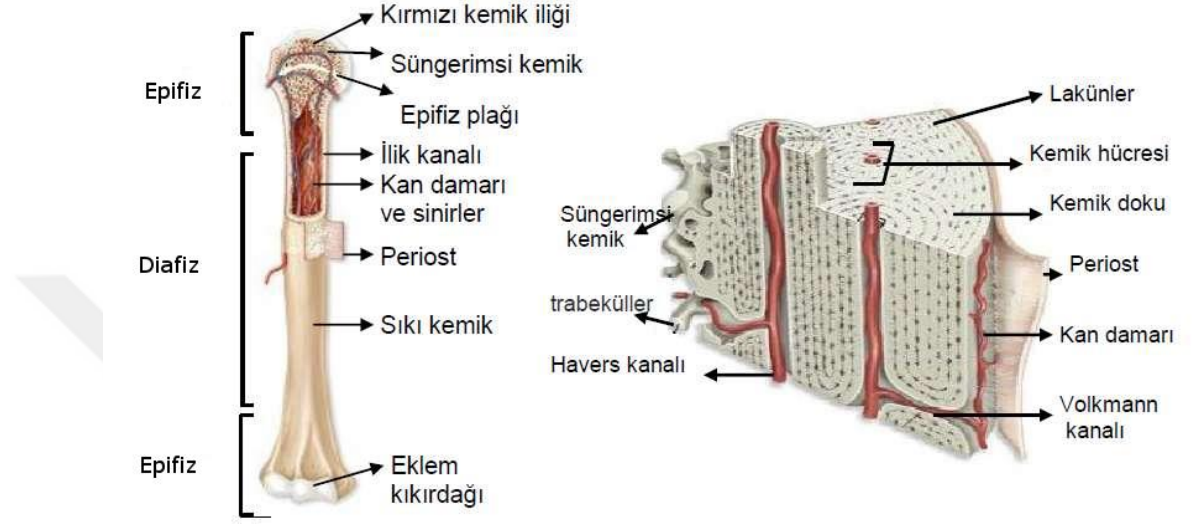
Şekil 2.1: Kemiklerin şekillerine göre sınıflandırılması

Uzun kemikler (ossa longa)

Uzunlukları genişliklerine göre fazla olan kemiklerdir. Ekstremitelerde bulunurlar. Ulna, femur, tibia, metatarsal ve metacarpal kemikler bu gruba dahildir. İnce uzun bir gövde ve çoğunlukla eklem yüzü bulunan iki uçtan oluşmuştur. Gövde kısmına diafiz, uç kısmına epifiz denir. Gelişmekte olan bir kemiğin epifizleri tamamen kıkırdak yapıdadır. Discus epifizialis adı verilen bir yapı ile kemiğin diafiz kısmı epifizinden ayrılmaktadır. Diafizin epifiz diski ile komşu olan kısmı diğer kısımlardan daha geniştir. Bu geniş kenar gelişme çizgisi ve yeni oluşan kemiği içermektedir ve bu alan metafiz olarak isimlendirilmektedir.

Uzun bir kemiğin diafizi, cavitas medullaris olarak adlandırılan kompakt bir tüpten oluşmaktadır. Bu boşluğu kemik iliği doldurur. Kemiğin spongioz kısmı epifiz ve metafizlerin aralarında düzensiz anastomoz yapan kemik çubukları ve trabekulalardan oluşmaktadır. Yüzeyleri ise ince bir tabaka kompakt kemik ile kaplıdır. Kemiklerin eklem yüzeyleri sürtünmeyi engellemek maksadı ile hiyalin kıkırdak ile kaplanmıştır. Kemiğin yüzeyini periost denilen dışı fibröz içi hücreli bağ dokusu zarı örter. Periost

kemiğin beslenmesi ve korunmasını sağlarlar. Kemiğin uç kısımları ve eklem yüzlerinde periost bulunmaz. Kemik kırılması durumunda osteojenik tabaka yeniden kemik yapımına yardımcı olur. Ayrıca periost kas ve tendonların kemiğe tutunmasını sağlar. Tendonun kollajen lifleri periost içine yelpaze şeklinde dağılmıştır.



Şekil 2.2: Uzun kemiklerin yapısı

Kısa kemikler (ossa brevia)

Kısa kemikler; kalınlık, uzunluk ve genişlikleri birbirine yakın kemiklerdir. El ve ayak falanks kemikleri bu gruba dahildir. Esas olarak spongioz kemik ve bunu çevreleyen ince bir kompakt kemik dokusundan ibarettir. Kemik iliği içerirler. Eklem yüzleri dışında periost ile kaplıdır.

Yassı kemikler (ossa plana)

Genellikle ince ve kıvrık bir tabaka şeklindedirler. Kostalar, sternum, skapula ve kranial kemikler bu gruba dahildir. Dış ve iç olmak üzere iki kompakt tabaka arasındaki spongioz kemikten oluşmaktadır. Kemik iliği içerirler. Kranial kemiklerdeki spongioz tabakaya dipole denir. Diploe içinde birçok vasküler yapı bulunmaktadır. Bazı yassı kemikler (lakrimal kemik) yalnız bir kompakt kemik yaprağından meydana gelir. Eklem yüzleri kıkırdak veya fibröz doku ile kaplıdır.

Düzensiz kemikler (ossa appendiculare)

Sınıflandırmaların hiçbirine uymayan kendine has şekli olan kemiklerdir. Bazı kranial kemikler, vertebralar ve os koksa bu gruba dahildir. Çoğunlukla kompakt tabaka ile çevrilmiş spongiöz kemik yapıdadırlar. Düzensiz kemikler grubuna içi hava dolu olan pnömatik kemiklerde dahildir. Temporal, frontal, maxilla buna örnektir.

Sesamoid kemikler (ossa sesamoidea)

El ve ayaklarda tendon veya eklem kapsülü içinde bulunan kısa kemiklere sesamoid kemikler denir. Patella sesamoid kemiklerin en büyüğüdür. Tendon çekme açısını değiştirerek ve çevre dokulara destek vererek etki gösterirler.

2.1.3 Kemik dokunun yapısal özellikleri

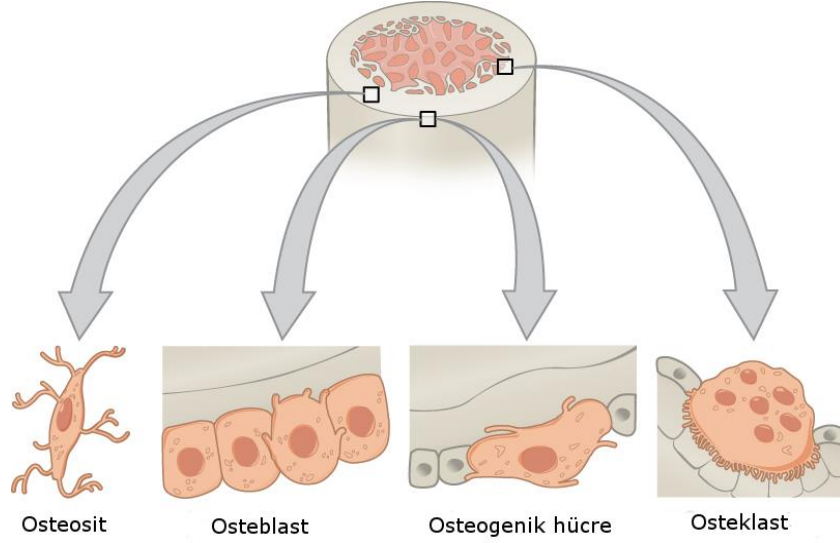
İskelet yapısında %80 oranında kortikal (kompakt), %20 oranında trabeküler (spongiöz) kemik bulunur. Kortikal kemik uzun kemiklerin diafizinde ve yassı kemiklerin yüzeyinde bulunur. Dışta periostal tabaka, içte trabeküler kemiğe ve kemik iliğine komşu endosteal yüzeyden oluşur. Gözenekli yapıdaki trabeküler kemik ise başlıca vertebra ve uzun kemiklerin uç kısımlarında bulunur. Kemik iliği ve içinde birbiriyle bağlantılı trabeküler lamellerden oluşur [15] (Şekil 2.2).

Kemik trabekülleri, kompresif ve torsiyonel güçlere karşı direnci arttıracak şekilde dizilmiş olup dıştaki kortikal tabakaya dayanıklılık sağlar. Kortikal kemik esas olarak mekanik ve koruyucu fonksiyon üstlenir. Trabeküler kemik ise metabolik fonksiyondan sorumludur. Kemik döngüsü yüzeye bağımlı olduğundan erişkinde trabeküler kemikte remodeling kortikal kemiğe oranla 5-10 kat fazla olmaktadır [16].

2.1.4 Kemik Hücreleri

Kemik dokuda 4 tip hücre bulunmaktadır:

- 1) Osteojenik (Osteoprogenitör) hücreler
- 2) Osteoblastlar
- 3) Osteositler
- 4) Osteoklastlar



Şekil 2.3: Kemik doku hücreleri

2.1.4.1 Osteojenik (Osteoprogenitör) hücreler

Osteojenik hücreler kemik dokusuna dönüşme yolunda şartlanmış mezenkim kaynaklı hücreleridir. Şekil olarak fibroblastlara benzer ve mitoz bölünme ile çoğalırlar. Çoğalan hücrelerin bir kısmı osteoblastlara dönüşürler. Sekonder (ikincil) kemiğin periosteum ve endosteum adı verilen zarlarında ve ayrıca havers ve volkman kanallındaki damarlar çevresinde dinlenme halinde osteoprogenitör hücreler bulunur.

Kemik yapımı (ostogenezis) ve kemik kırıkları tamiri sırasında osteoprogenitör hücreler hızla bölünüp osteoblastlara dönüşmektedir. Bu hücreler pluripotent özelliklerinden ötürü ihtiyaç halinde fibroblast, adiposit, kondrosit ve kas hücrelerine de dönüşebilir [17].

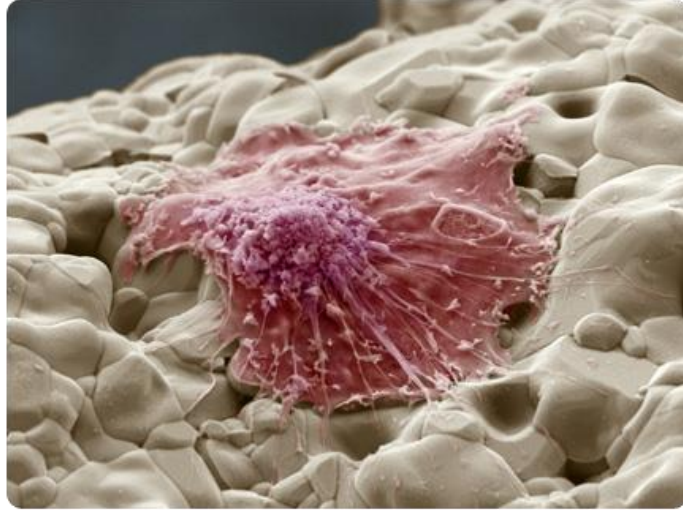
2.1.4.2 Osteoblastlar

Osteoblastlar total kemik hücrelerinin %4-6'lık kısmını içeren, kemik oluşumunda görevli olan küboid yapıda hücrelerdir [18]. Osteoblastlar MKH den köken almaktadır. Bu dönüşüm için osteoprogenitör hücrelerden spesifik gen ekspresyonu ile birlikte BMP ve Wnt yolaklarına ihtiyaç duyarlar [19]. Osteoblast diferansiyasyonu için Runx2, Dlx5 ve osterix ekspresyonu şarttır [20]. Ayrıca Runx2 geni, osteoblast dönüşüm aşamasındaki ColIA1, ALP, BSP, BGLAP ve OCN gibi genlerin upregülasyonunda görevlidir [21].

Osteoblast diferansiyasyonu sırasında Runx2 ve ColIA1 salgılayan osteoblast öncülleri miktarı yeterli sayıya ulaşınca proliferatif faz başlar [18]. Bu fazda yüksek bulunan ALP aktivitesi ile preosteoblastların sayısının arttığını göstermektedir. Preosteoblastların olgun osteoblastlara dönüşümü osteokalsin ekspresyonu ve kemik matriks proteinlerinden olan osteokalsin, BSP I/II ve tip 1 kollajen miktarındaki artış ile görülmektedir. Ayrıca preosteoblastların osteoblastlara dönüşümü morfolojik olarak hücre boyutunun artması ve küboidal hücrelere dönüşüm ile karakterizedir [22]. Osteoblast diferansiyasyonundaki diğer önemli faktörler FGF, mikroRNAlar ve connexin43 tür [23].

Osteoblastlar tarafından yapılan kemik matriksi sentezi iki basamakta incelenebilir. Birinci aşamada osteoblastlar tarafından organik matriks oluşturulur. Başta tip 1 kollajen olmak üzere kollajenler sentezlenir. Ayrıca osteokalsin, osteonektin, BSP II ve osteopontin gibi kollajen olmayan proteinler ve proteoglikanlar sentezlenir. İkinci aşama mineralizasyon aşamasıdır. Bu aşama veziküler ve fibriler olmak üzere iki fazda gerçekleşmektedir [24]. Veziküler fazda osteoblast etkisiyle kemik matriksinden 30 ile 200 nm boyutunda proteoglikan ve diğer organik bileşenlere bağlı matriks vezikülleri oluşur. Vezikül içine salınan ALP enzimleri sayesinde fosfat ve kalsiyum iyonları açığa çıkarak hidroksiapatit kristalleri oluştururlar. Fibriler fazda matriks vezikülleri içinde bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarının süpersatüre olmasına bağlı olarak veziküller patlar ve çevre dokuya hidroksiapatit kristalleri saçılır [25]. Bu yapılar işlenerek kemik doku oluşumu düzenlenir.

Osteoblastlar olgunlaştıktan sonra apoptozise uğrayabilirler veya kemik matriksi oluşumuna yönelik sitoplazmik değişiklikler sonrası osteosit hücrelerine dönüşmektedir. Olgun osteoblastların bir kısmı ise remodelinge uğramayan inaktif kemik astar hücrelerine dönüşerek kemik matriksi ile osteoklastlar arasında anatomik bir yapı oluştururlar [26].



Şekil 2.4: Osteoblast hücresinin elektron mikroskopi görüntüsü [27]

2.1.4.3 Osteositler

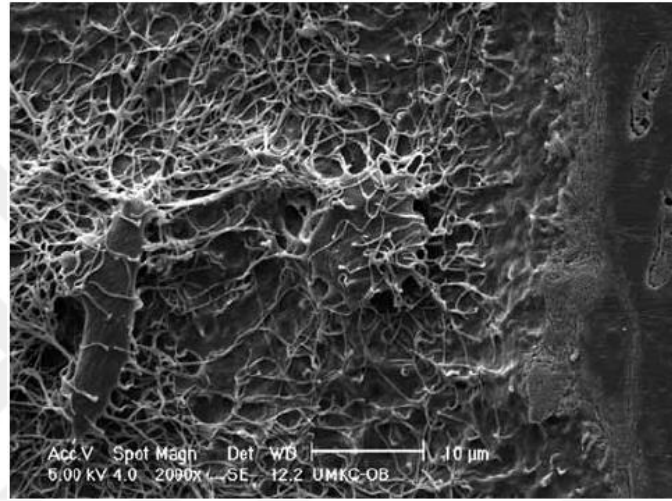
Osteositler tüm kemik hücresinin %90-95'lik kısmını oluşturmaktadır. Osteositler yaşam döngüsünde 25 yıla kadar yaşayabilmektedir [28]. Morfolojik olarak dendritik yapıda olan osteositler mineralize kemik matriksi ile çevrili lakünalar içerisinde bulunurlar.

Osteositler MKH soyundan osteoblast farklılaşması ile oluşmaktadır. Bu dönüşüm sırası ile osteoid-osteosit, preosteosit, genç osteosit ve olgun osteosit olarak gerçekleşmektedir [28]. Kemik oluşumu döngüsünde kemik matriksi ile temas halindeki osteositler çeşitli morfolojik ve ultrastrüktürel değişikliklere uğrarlar bu nedenle endoplazmik retikulum ve golgi aparatı gibi organellerinde azalma gözlenir. Sonuç olarak protein sentezi ve salgılaması yeteneklerinde azalma görülür [29].

Osteoblast/osteosit dönüşümü sırasında E11/gp38 proteininin yüksek miktarda eksprese olduğu tespit edilmiştir [30]. E11/gp38 proteini GTPase aktivitesi ile hücre motilitesinde etkili olan sitoskelet komponentleri ve moleküllerini regüle ederek aktin sitoskelet dinamiklerini etkilediği düşünülmektedir [31].

Mineralize kemik matriksi içinde matür osteositin hapis olması sonrası osteoblast markerlarında olan osteokalsin, BSPII, tip 1 kollajen ve ALP down-regülasyonu görülür. Bunu takiben osteosit markerlarında DMP1 ve sklerostin ekspresyonunda artış gözlenir [32].

Osteosit hücrelerinin gövde kısmı kemik dokunun lakuna kısmında bulunur. Hücrenin sitoplazmik uzantıları ile lakünokanalikuler sistem adı verilen tüneller ile birbirine bağlanırlar [33]. Osteositlerin sitoplazmik uzantılarının komşu osteosit ile sıkı bağlantılar bulunmaktadır (Şekil 2.5). Ayrıca osteoblast ve kemik yüzeyindeki diğer hücreler ile hücreler arası materyeller, prostoglandinler gibi sinyal molekülleri ve nitrit oksit gibi maddelerin taşınmasında görevlidirler [35]. Lakünokanalikuler sistemin vasküler yapılara yakın olması nedeni ile oksijen ve besin maddeleri osteositlere direkt olarak ulaşabilmektedir [36].

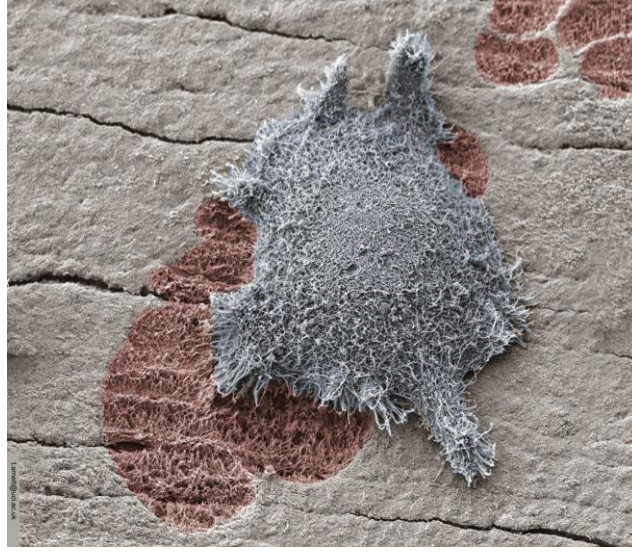


Şekil 2.5: Osteosit hücreler arası sıkı bağlantıların elektron mikroskopu görüntüsü [34]

Osteositler aralarında bulunan sıkı ağ sayesinde mekanosensör olarak kemiğe yapılan baskı ve yükün miktarını tespit edebilmektedir. Böylece osteositler mekanik stres sonrası kemiğe adaptasyon yeteneği sağlamakta katkıda bulunurlar [37]. Kemik remodelinginde osteoblast ve osteoklast aktivitelerini düzenleyerek kemotaktik ajanlarla kemik rezorpsiyonunu düzenlerler [38].

2.1.4.4 Osteoklastlar

Osteoklastlar kemik yıkımından sorumlu, büyük, hareketli ve çok çekirdekli hücrelerdir (Şekil 2.6). Osteoklastlar, hematopoetik kök hücre (HKH) kaynaklı mononükleer hücrelerin farklılaşması ile oluşan ve bu serinin en son basamağı olan çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoprogenitör mezenkimal hücreler ve osteoblastlardan salgılanan M-CSF ve osteoblast, osteosit ve stromal hücrelerden salınan RANK ligandları ile osteoklast dönüşümü gerçekleşir [40].



Şekil 2.6: Osteoklast hücrenin elektron mikroskopu görüntüsü [39]

Kemik remodelingi sırasında osteoklastların polarize olması sonrasında 4 tip osteoklast membran alanı ortaya çıkar. Bunlar mühürleme alanı (sealing zone), kemik matriksi ile ilişkili dalgalı sınırlar (ruffled border), bazolateral ve fonksiyonel salgı alanlarıdır [41]. Kemik rezorpsiyonu sırasındaki osteoklast polarizasyonu hücrenin aktin iskeletini tekrar organize ederek podozom oluşumunu sağlar. Bu podozomlar sayesinde osteoklast kemik yüzeyine tutunur [42]. Ultrastrüktürel olarak dalgalı sınırlar mikrovilluslerden oluşan membran alanıdır ve çevre dokular arasında mühürleme alanı adı verilen izole bir alan meydana getirirler. Mühürleme alanı aktin halka çevresine dizilmiş talin, vinculin, paxillin, tensin ve aktin ile ilişkili α -actinin, fimbrin, gelsolin ve dynamin proteinlerinden oluşur [43].

Osteoklast aktivitesinde önemli olan diğer alan olan dalgalı sınır bölgesinde lizozomal ve endozomal komponentlerin yoğun trafiği olmaktadır. H^+ -ATPase sayesinde lakuna içerisi ortamı asitleştirilerek hidroksiapatit kristallerinin çözülmesi sağlanır [44]. Çözünme sonrası alandaki protonlar ve TRAP, cathepsin K ve MMP-9 gibi enzimler howship lakunasına taşınarak fonksiyonel salgı alanında kemik yıkımını gerçekleştirirler [45].

2.1.5 Ekstraselüler kemik matriksi

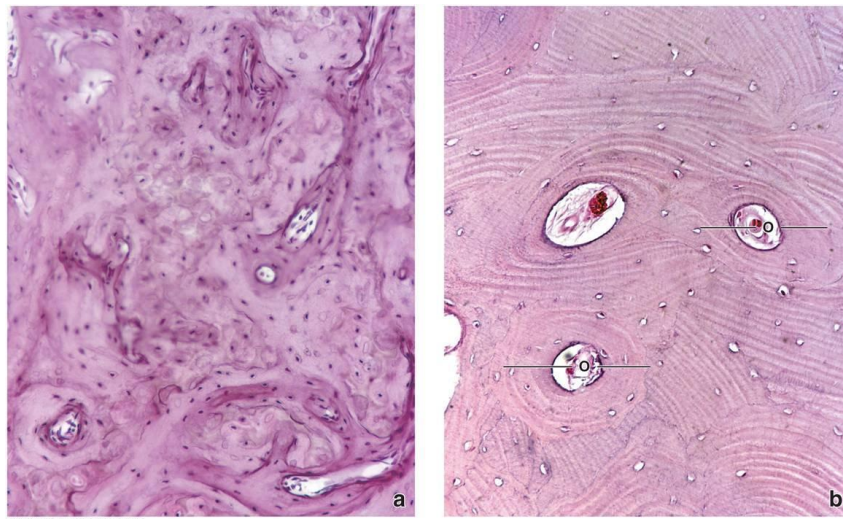
Kemik doku yapısal olarak inorganik tuzlar ve organik matriksten oluşmaktadır. Organik matriksin %90'lık kısmı tip 1 kollajenden, geri kalan kısmı osteokalsin, osteonektin, osteopontin, fibronektin, kemik sialoprotein II, BMP ve büyüme faktörleri gibi kollajen olmayan proteinlerden meydana gelir [46]. Ayrıca kemik yapısında decorin, biglycan, lumican, osteoaderin ve seric proteinler gibi lösinden zengin proteoglikanlar bulunmaktadır [47].

Kemik dokunun inorganik kısmının büyük bölümü kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşmaktadır ancak yapısal olarak bikarbonat, sodyum, potasyum, sitrat, karbonat, florit, çinko, baryum ve stronsiyumda bulunmaktadır [48]. Kalsiyum ve fosfat iyonlarının birleşmesi ile kemiğe dayanıklılık ve esneklik kazandıran hidroksiapatit kristalleri ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) ortaya çıkar [49]. Kemik matriksi kompleks yapıdadır. Organize bir çerçeve şeklinde mekanik destek ve kemik hemostazında kritik rol oynar. Kemik kütlelerinde azalma olması durumunda kemik kırıkları ortaya çıkmaktadır.

2.1.6 Kemik tipleri

Kemik dokunun mikroskobik yapısına göre 2 farklı tipi olduğu gösterilmiştir. (Şekil 2.7)

- 1- Primer, olgunlaşmamış veya süngerimsi, kemik
- 2- Sekonder, olgun veya lamellar, kemik



Şekil 2.7: (a)Süngerimsi ve (b) lameller kemiğin mikroskobik görüntüsü [50]

Primer kemik dokusu

Süngerimsi kemik dokusu osteoblastlardan hızlı salınan osteoid ile oluşmaktadır. Embriyonal gelişim süresindeki kemikler ve yeni oluşmuş kırıklarda ortaya rastgele ve değişik yönlere dağılmış ince kollajen lifler şeklinde çıkarlar. Bu yapılar kemiğin olgunlaşması ile tekrar konfigüre olarak yerini sekonder kemik dokusuna bırakır [51].

Sekonder kemik dokusu

Sekonder kemik dokusu 3-7 nm kalınlığındaki kollajen liflerin birbirine paralel veya vasküler bir kanal çevresinde dairesel olarak dizilmesi sonucu lameller şeklinde düzenlemiştir [52]. Nörovasküler yapıları ve bağ dokusunu içeren bir kanalın etrafını saran dairesel lamellerin meydana getirdiği yapıya havers sistemi (osteon) denir. (Şekil 2.2) Havers sisteminin ana fonksiyonu besin maddelerini sert kemik dokusuna taşımaktır. Bu taşıma sistemi kemik diafizi boyunca 4-20 dairesel lamel şeklinde uzanır Havers kanalları arasında yatay ya da oblik planda seyreden kanallara volkman kanalları sayesinde kemik iliği boşlukları, periosteum arasında bağlantı sağlanır [53].

Kompakt kemik sisteminde 4 tip lamellar organizasyon mevcuttur:

- 1- Dış dairesel lamella: Lamella periostun hemen altında bulunur ve diyafiz bölgesinin en dış kısmını oluşturur.
- 2- İç dairesel lamella: Kemik iliği boşluğunu çevreler.
- 3- Osteon lamelleri: Osteonik kanallar etrafında bulunmaktadır.
- 4- İnterstisyel lamella: Üçgen veya düzensiz gruplar halinde birbirine paralel bulunan havers sisteminin yıkıntılarıdır.

2.1.7 Kemik gelişimi

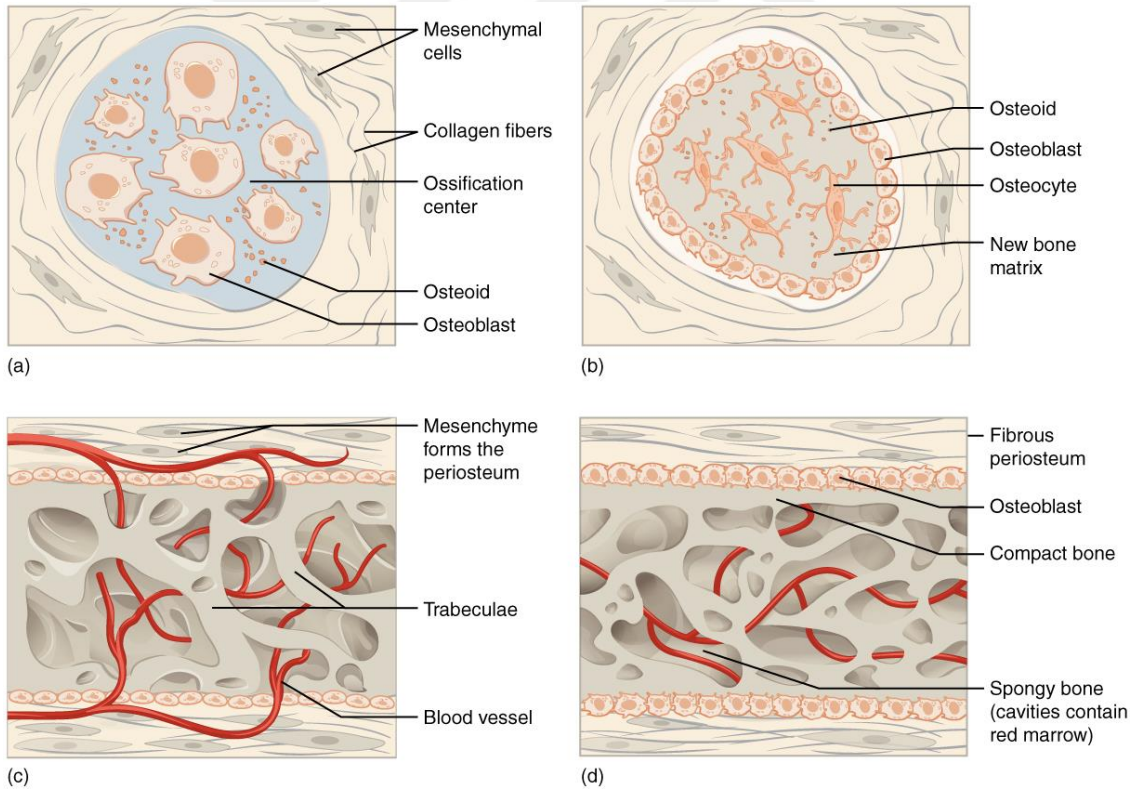
Kemik doku gelişimi 2 farklı yoldan olmaktadır.

- 1- İntramembranöz kemikleşme
- 2- Endokondral kemikleşme

2.1.7.1 İntramembranöz kemikleşme

Mezenkimal doku yoğunlaşması ile oluşan kemikleşme şeklidir. Frontal, parietal, maksilla ve mandibula gibi yassı kemiklerde gelişime örnek gösterilebilir. Mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşerek yoğunlaşması ile primer kemikleşme merkezi oluşur [54]. Osteoblastlar kemik matrisi oluşturduktan sonra kalsifikasyon başlar. Etrafı çevrilen osteoblastlar osteosit hücrelerine dönüşürler.

Spikül adı verilen kemik adacıkları etrafına kollajen fiberler toplanarak primer kemik dokusunu oluştururlar. Kemik spikülleri arasında invaze olan vasküler yapılar ve bölgeye göç eden mezenkimal hücreler ile kemik iliği oluşur. Bağ dokusunun intramembranöz kemik doku dış kısmında kalan bölümü periosteum ve endosteumu oluşur. Trabeküler kemik üzerinde kompakt kemik oluşarak artan vaskülerite ile kemik iliği gelişimine katkıda bulunur (Şekil 2.7).



Şekil 2.8: (a) Mezenkimal hücrelerin kümelenerek kemikleşme merkezini oluşturması (b) Osteoid salgısı sonrası osteoblastların hapis olarak osteosite dönüşümü (c) Trabeküler matris ve periost oluşumu (d) Trabeküler kemik üzerinde kompakt kemiğin oluşumu ve zengin damar ağı [55]

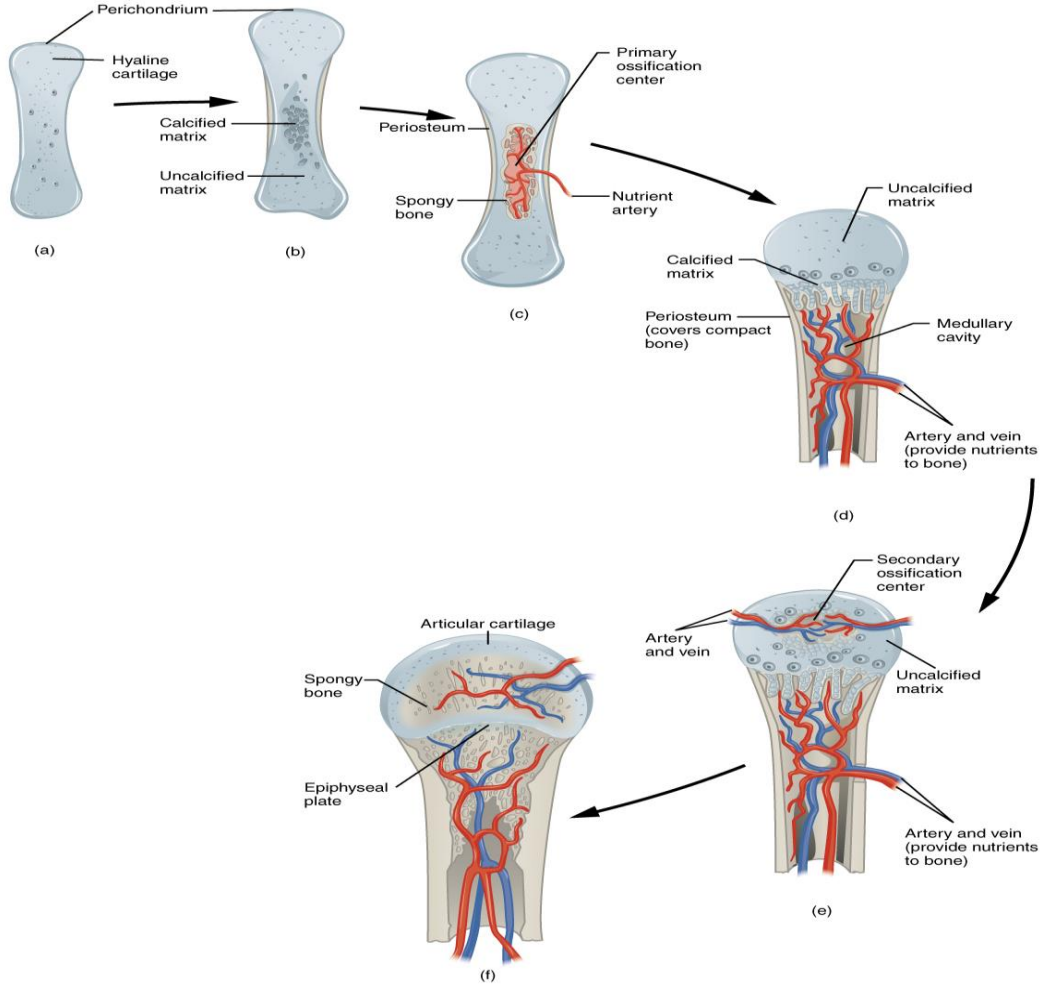
2.1.7.2 Endokondral kemikleşme

Endokondral kemikleşme hiyalin kıkırdaktan oluşmuş bir modelinin kemikleşmesi ile gerçekleşir. Uzun ve kısa tipteki kemikler bu yol ile oluşurlar. Kemikleşme sırasında kondrositlerin hipertrofisi sonrası kıkırdak yıkımı olur ve osteojenik hücrelerin bölgeye göçü ile kalsifikasyon başlar [56].

Endokondral kemikleşme intramembranöz kemikleşmeye göre daha uzun sürmektedir. Kemikleşme sürecinde mezenkimal hücreler kondrositlere dönüşerek kemiğe dönüşecek olan kıkırdak iskeleti oluştururlar. Bu kıkırdak dokusunu çevreleyen bir perikondrium mevcuttur. Kıkırdak dokusu içindeki matriks miktarı arttıkça merkezdeki kondrositler büyümekte ve besin ihtiyaçları artmaktadır. Kıkırdak matriksi kalsifiye oldukça kondrositlere giden besin miktarı azalmakta ve hücre ölümü gözlenmektedir. Kıkırdak dokudaki yıkımı takiben bölgeye kan damarları beraberinde osteojenik hücreleri getirerek dokuya invaze olurlar [57].

Vasküleritenin artması ile osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar kalsifiye kıkırdak matriksi üzerinde kemik matriksi sentezlemeye başlarlar. Böylece primer kemik sentezi başlamış olur. Kemik matriksi geliştikçe kıkırdak artıkları osteoklastlar tarafından bölgeden uzaklaştırılırlar [58].

Primer kemikleşme alanında medulla oluşumu tamamlayan osteoklastlar kemiğin epifiz bölgesine doğru göç ederler ve sekonder kemikleşme merkezlerini oluştururlar. Sekonder kemikleşme merkezinin oluşturduğu kemik dokusu epifizleri işgal ettiği zaman kıkırdak doku kemik epifiz uç kısmında hapis olarak kalıcı olan eklem kıkırdaklarını oluştururlar [59].



Şekil 2.9: Endokondral kemikleşme 5 aşamada gerçekleşir. (a) Mezenkimal hücrelerin kondrositlere dönüşümü (b) Kemik oluşturacak olan kıkırdak modelin oluşumu (c) Kapiller oluşumu ve perikondriumun periosta dönüşümü (d) Kıkırdak ve kondrositlerin kemik uçlarına ilerleyişi (e) Sekonder kemikleşme merkezleri oluşumu (f) Kıkırdak dokunun epifiz (büyüme) plağında ve eklem yüzlerinde kalması [55]

2.1.8 Kemik kırığı ve sınıflandırılması

2.1.8.1 Kemik kırığı tanımı

Organizmayı etkileyen iç ve dış kuvvetlerin etkisinde kemik dokunun anatomik bütünlüğünün ve devamlılığının bozulmasına ‘‘Kırık’’ denir. Kemikteki kırılma bu etkenlerin derecesine ve kemiğin bu şoku absorbe edebilme yeteneğine göre ufak bir çatlaktan (fissür), bir veya birçok kemiğin kırılmasına ve hatta komşu eklemlerde çıkık oluşturabilmesine (kırıklı-çıkık) kadar geniş bir yelpazede görülebilir [60]. Kırığı oluşturan kuvvetin şiddetine göre hasar sadece kemiğin bütünlüğünün bozulması ile

kalmaz çevresindeki deri, kaslar, tendonlar, bağ dokular, damar ve sinirler başta olmak üzere yumuşak dokuları da etkileyebilir.

Kırığı oluşturan etkenler yaşlara ve kırığın bölgesine göre farklılık göstermektedir. Doğum travmaları, düşme, kavga, trafik kazaları, spor yaralanması çocukluk döneminde sık görülmektedir. Orta yaşta iş kazalar ve trafik kazaları, ileri yaşta kanser ve yaşlılığa bağlı düşmeler ile karşılaşmaktadır. Yeni doğan döneminde doğum travmasına bağlı olarak en çok klavikula, humerus ve femur cismi kırığı sık görülür. Çocuklarda humerus suprakondiler kırıklar, dirsek, ön kol ve femur cismi kırılır. Genç ve orta yaşta tibia, femur ve radius cismi en çok hasarlanan bölgedir. İleri yaş bireylerde femur boynu, trokanterik bölge, humerus proksimali ve radius distali en çok kırılan alanlardır [61].

2.1.8.2 Kemik kırığı sınıflandırılması

Kemik kırıkları 7 farklı kategori olarak sınıflandırılabilir;

1-Kırığı oluşturan kuvvetlere göre:

- Direkt mekanizma ile gerçekleşen kırıklar
- İndirekt mekanizma ile gerçekleşen kırıklar
- Direkt ve indirekt mekanizma kombinasyonu ile gerçekleşen kırıklar

2- Kemik dokunun yapısal özelliğine göre:

- Normal kemikte (travmatik) kırık
- Hastalıklı kemikte (patolojik) kırık
- Stres (yorgunluk) kırığı

3- Kırık hattının dış ortamla olan ilişkisine göre:

- Açık kırık
- Kapalı kırık

4- Kemikteki kırık sayısına göre:

- Tek kırık hattı
- Çoklu kırık hattı

5- Kırığın derecesine ve kırık hattına göre:

- a) Ayrılmış (deplase) kırık
 - Transvers kırık
 - Oblik kırık

- Spiral kırık
 - Kopma kırığı
 - Parçalı kırık
- b) Ayrılmamış (non-deplase) kırık
- Çatlak (fissür, linear kırık)
 - Yeşil ağaç (green stick) kırığı
 - Torus (buckle) kırığı
 - Çökme kırığı
 - Kompresyon (sıkışma) kırıkları
 - Dişlenmiş (impakte) kırıklar
 - Epifizin ayrılmamış kırıkları

6- Kırığın kemikteki anatomik yerine göre:

- Proksimal bölge kırıkları (Proksimal epifizer ve metafizer bölge; trokanterik bölge, femur boynu, tibia kondili vb.)
- Cisim (şaft) kırıkları (Diafiz bölgesi; 1/3 üst, 1/3 orta, 1/3 alt bölge olarak isimlendirilir)
- Distal bölge kırıkları (Distal epifizer ve metafizer bölge; suprakondiler, malleolar, pilon, colles, vb.)
- Epifiz bölgesi kırıkları (Çocuklarda fizisler kapanmadan önceki dönemde fizis hattını etkileyen epifiz ve metafiz kırıkları)
- Kırıklı- çıkıklar (kırıklar birlikte kırığın olduğu kemiğin katıldığı eklemden de çıkık varlığı)

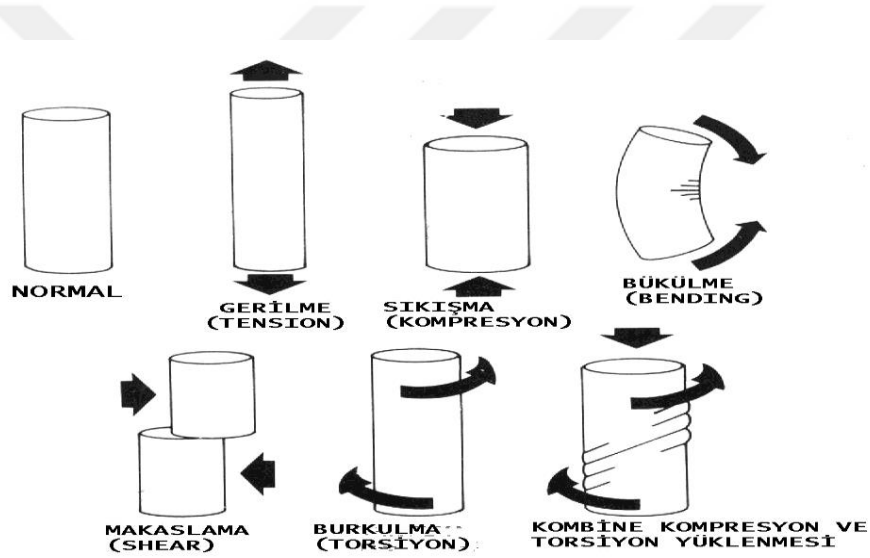
7- Kırılan kemiğin histolojik yapısına göre:

- Kortikal bölge kırıkları
- Spongioz bölge kırıkları
- Kortikal ve spongioz bölgeyi birlikte içeren kırıklar

2.1.8.3 Kemik kırığı nedenleri ve oluşum mekanizması

Sağlıklı bireylerde travmatik yolla oluşan kırıkların başlıca sebepleri arasında araç içi veya araç dışı trafik kazaları, çarpma, düşme, ev içi kazalar, iş kazaları, spor yaralanmaları, deprem ve maden kazıları sırasında göçük altında kalma gibi doğal felaketler, kişinin üzerine bir cismin düşmesi, kesici delici alet yaralanması, ateşli silah

yaralanması, darp ve doğum sırasındaki travmalara bağlı kırıklar gözlenmektedir [62]. Patolojik kırıklarda; kemik kırığı çoğu zaman basit travma etkisi ile veya travma olmaksızın kendiliğinden oluşur. Patolojik kırık nedenleri arasında primer veya sekonder neoplaziler, osteoporoz, osteomalazi veya enfeksiyon gibi nedenler bulunmaktadır. Stres kırıkları ise zorlamalar sonrası oluşan yorgunluk sonucunda belirgin bir travma olmaksızın kemikte tam kırık ya da çatlak oluşması şeklinde gerçekleşir. Normal anatomi ve fizyolojiye sahip olan bir kemikte dıştan etki eden kuvvetler ve vücut ağırlığının taşınması adaptasyon sürecinde dengelenebilmektedir. Ancak akut dönemde ligamentlerin çekmesi, organizmanın kendi içinden etki eden kuvvetlerin şiddeti, hızı, doğrultusu ve etkilenme süresine göre kırıklar meydana gelir [63].



Şekil 2.10: Kırık oluşturan kuvvetler ve yönleri [64]

2.1.8.4 Kemik kırığı belirti ve bulguları

Kırıkları doğru tespit edebilmek için düzgün ve sistematik anamnez değerlendirmede önemli yer tutmaktadır. Kişinin bilinci açık ise kendisinden, bilinci yerinde değil ise yakınları ya da görgü şahitlerinden detaylı bilgi alınmalıdır. Hasta ek patolojileri de göz önünde bulundurularak sistemik ve lokal fizik muayene uygulanmalıdır. Kırıklara kas, tendon, damar ve sinir yaralanmaları eşlik edebileceği unutulmamalıdır. Radyolojik tetkikler de değerlendirmede önemli yer tutmaktadır. Yaralanmalardaki klinik bulgular travmaya ait bulgular ve kırığa özgü bulgular olarak 2 sınıfta incelenebilir.

1-Travmaya ait bulgular

- a) Ağrı ve duyarlılık: Ağrı duyusu her çeşit travmalarda olabilmektedir ancak kırıklarda daha şiddetli görülmektedir. Ağrı spontan, direkt ve indirekt olmak üzere 3 farklı şekilde görülmektedir. Spontan ağrı (hastanın travma bölgesinde var olduğunu ifade ettiği ağrı), direkt ağrı (travma bölgesine baskı uygulandığında artan ya da açığa çıkan ağrı), indirekt ağrı (uzaktan zorlama uygulandığında travma alanında ortaya çıkan ağrı) aynı bölgede görülmesi kırık lehine bir bulgudur.
- b) Hematom: Kırığa neden olan darbenin damarları yaralaması, kırık kemik uçlarının diğer damarları yaralaması ve kırık hattından kaynaklanan kanama sonucu görülür. Hematom hızla büyüyorsa büyük damar yaralanması intimali atlanmamalıdır.
- c) Ekimoz: Doku arasına ve cilt altında yayılan kanın cilde verdiği morluk görüntüsüdür. Erken dönemde travma bölgesinde görülmesi kırık habercisi olabilmektedir. Ekimozun rengi zaman geçtikçe yeşilden sarıya dönerek yaklaşık 3 haftada geçer. Ekimoz yerçekimi kuvveti etkisi ile yer değiştirmektedir. Ekimozun rengi ve alanı kırığın bölgesi hakkında fikir verebilmektedir.
- d) Fonksiyon kısıtlılığı: Hareket sistemi elemanları yaralandığı zaman ağrı oluşması nedeni ile eklemin hareketlerinde sınırlanma gerçekleşir. Mekanik olarak kaldıraç kolu görevi gören kemiklerde oluşan hasardan dolayı hareket bozulur.

2-Kırığa özgü bulgular

- a) Hastanın postürü: Hastanın duruşu bazı kırıklar için tipiktir. Örneğin alt ekstremitelerde bir tarafta addüksiyon, dış rotasyon ve kısalık görülüyorsa, kollum femoris kırığı veya trokanterik bölge kırıkları düşünülmelidir.

- b) Krepitasyon: Kırık uçlarının birbirine sürtünmesi sonucu palpasyon ile hissedilen bir bulgudur. Kırık bölgesinden çıtırtı sesi alınır.
- c) Deformite: Kırık uçlarının yer değiştirmesi ile olur. Kırık uçlarının birbirinden ayrılmasına deplasman, kemik uçları birbirinin üzerine binmişse overriding, fragmanlar birbirinden uzaklaşmışsa distraksiyon, kırık uçlarının kendi eksenini etrafında dđnmesine rotasyon, öne, arkaya veya yan düzeyde açılmasına angulasyon denir.
- d) Anormal hareket: Bir kemikte anatomi ve fizyolojiye aykırı gözlenen harekettir. Kırık olduğunu gösteren önemli bir bulgudur.
- e) Palpasyon belirtileri ve kısalık: Kemikler cilde yakın kısımlarda palpe edilirler. Kemik kırık uçları arasında bozulan kemik devamlılığı hissedilebilir. Kemikte ölçümler yapılarak karşı taraf kemiği ile karşılaştırma yapılabilir.

2.1.8.5 Kemik kırığı radyolojik incelemesi

Kemik kırıklarının tanısında konvansiyonel radyolojinin değeri fazladır. Kırığın derecesi, sayısı, kırık uçlarının durumu, kırığın yeri, yabancı cisim varlığı, eklem çıkığı, kırık tedavisi sırasında uygulanan redüksiyonu ve stabilizasyonun başarısı, kaynama kontrolü gibi konularda iyi bir radyolojik inceleme şarttır [65]. Kırık olduğu düşünölen kemiğin proksimal ve distal parçaları aynı film kasedi üzerinde görölmelidir. Çocuklarda karşılaştırma amacı ile radyolojik incelemeler bilateral yapılmalıdır. Kırık olduğu düşünölen her kemiğin standart olarak en az 2 yönlü (ön-arka ve yan) gerekirse oblik ve özel pozisyonda çekilmiş direkt grafilere istenmelidir.

Çekilecek olan radyogramları isterken anatomik pozisyon ve lokalizasyon belirtilmelidir. Değerlendirme sırasında radyogramların doğru pozisyonda ve lokalizasyonda çekildiği, kalitesi ve dozunun doğruluğu kontrol edilmelidir. Gereğinde tekrarı istenmelidir. Filmde kırık hemen görölse de normal görönen diğer kemikler de dikkatle taranmalı, eşlik eden bir hastalığın varlığı da kontrol edilmelidir ve sonrasında

kırık bölge ayrıntılı olarak incelenmelidir. Grafide göze çarpan kırık yoksa fizik muayenede direkt ve indirekt ağrı bölgesi kapsamlı olarak incelenmelidir.

Eklem içi kırıklarda, pelvis kırıklarında, vertebra kırıklarında ve şüpheli durumlarda BT daha ayrıntılı ve kesin inceleme olanağı sağlamaktadır. Yaralanmada yumuşak doku değerlendirilmesi için MR çekilmesi eklem içi kırıklar ve patolojilerde, nörolojik defisit bulunan vertebra kırıklarında, patolojik kırıklarda ve şüpheli durumlarda yararlı bilgiler sağlamaktadır [66].

2.1.9 Kırık iyileşmesi

2.1.9.1 Kırık iyileşmesinin evreleri

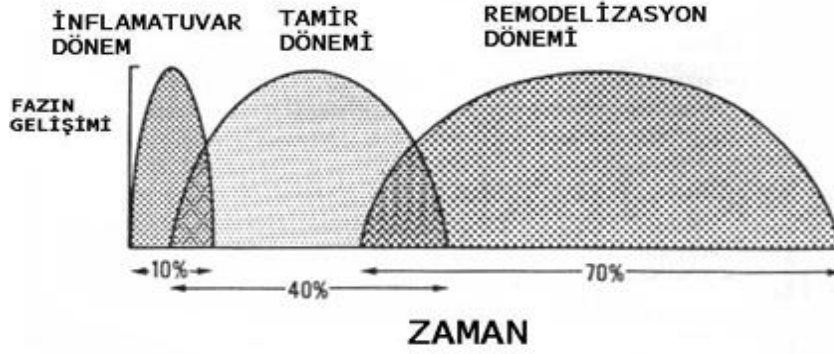
Kemik dokuda ortaya çıkan hasar tamir mekanizmaları bozulan kemik bütünlüğünün tekrar kazanılması yönünde olmaktadır. Kemik kırıklarında skar (nedbe) dokusu oluşmamakta, oluşan hasar kırık olduğu andan itibaren başlayarak düzenli kemik dokusu oluşana kadar devam etmektedir. Kemik iyileşmesi biyolojik olarak primer ve sekonder iyileşme olarak 2 grupta incelenebilir:

1-Primer veya direkt kemik iyileşmesi (internal remodelizasyon)

Genellikle ayrılmamış kemik parçalarının rijit osteosentez uygulanması sonrası dış kallus oluşmadan iç kallus dokusunun birbirine temas eden kısımları arasında olan iyileşme olarak tariflenebilir. Radyolojik incelemede kallus görüntüsü gözlenmez. Kırıkta model kemikleşmesi gözlenmez bu nedenle intramembranöz kemikleşmeye benzetilebilir [67].

2-Sekonder ya da indirekt kemik iyileşmesi (kallus oluşumu)

Göreceli stabilite ile gerçekleşen kallus gelişimi ile karakterize iyileşme şeklidir. Radyolojik ve histolojik olarak inflamatuvar dönem, tamir dönemi ve remodelizasyon dönemi olarak üç dönemde incelenebilir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11: Kırık iyileşmesi dönemleri [68]

a) İnflamatuvar (yangı, hematom) dönem (1-4 gün)

Travmaya uğrayan herhangi bir dokuda ilk oluşan yanıt yangıdır. İyileşmenin ilk 4 günlük süresinde azalarak yerini tamire bırakır. Kemik travmaya uğrayıp kırıldığında kırık uçları arasında lenf sıvısı ve kan göllenerek kırık hematomunu oluşturur. Artan basınç etkisi ile periostu eleve eder. Kanama regülasyonu için bölgeye trombositler göç eder ve trombotik faktörler salgırlar. Hematomun basıncı kırık uçlarını bir arada tutmaya yardımcı olarak kemik iyileşmesi için uygun ortamı sağlar [69]. Kırık hematomunun dışarı boşalması kırık iyileşmesinde gecikmelere yol açabilmektedir. Kırık hematomu onarım hücrelerinin aktivitelerini kolaylaştıracak fibrinden yapılmış iskelet rolü görmektedir [70].

İnflamasyon bölgesinde bulunan trombositler ve diğer hücreler tarafınca büyüme faktörleri, EGF, FGF, PDGF, TGF- β ve IL-1, IL-6 salınarak kırık iyileşmesinde önemli olan hücre göçü, periosteal hücre çoğalmasını sağlar ve kemik matriksi sentezi uyarılır [71]. Kırık oluşumunu takiben vazokonstrüksiyon gerçekleşir. Bunu takiben mast hücrelerinden histamin salınmasına sekonder arteriol ve venüllerde vazodilatasyon gözlenir. Bu nedenle plazma eksüdasyonu oluşur ve kırık bölgesinde ödem oluşur.

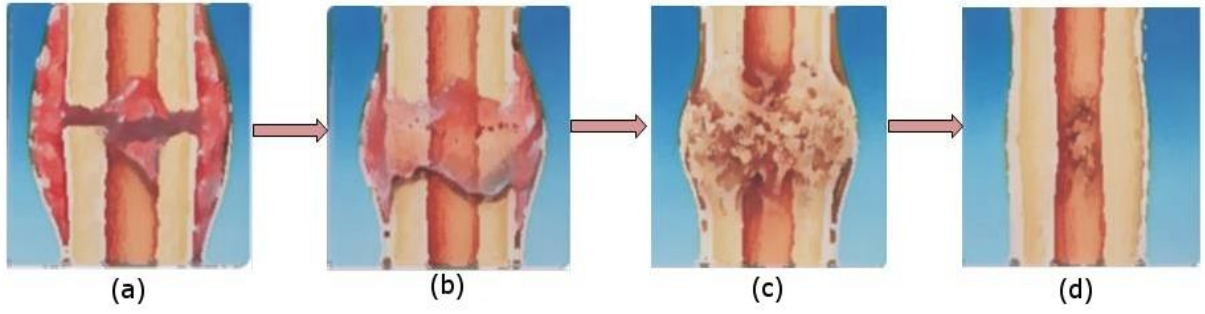
Kırık bölgesinde anastomozdan sorumlu olan havers sistemi bozulmakta ve dolaşım bozulmasına sekonder osteositlerde lizis gerçekleşir. Böylece kırık uçları arasında 1-5 mmlik bölgede nekroz gelişir. Yumuşak doku hasarı ve trombositlerin degranüle olması ile birlikte ölü dokulardan açığa çıkan sitokinler vazodilatasyon, hiperemi, makrofaj ve nötrofil kemotaksisi yaparak inflamatuvar cevabı tetiklerler [72].

b) Tamir dönemi (2-40 gün)

İnflamatuvar hücreler nekrotik dokuları rezorbe ederken fibroblastlar bölgeye gelerek onarım dönemini başlatırlar. İlk basamak hematoma organize olmasıdır. Onarım döneminde ilk 48 saat içerisinde periosteumun kambium tabakasında, endosteum ve kırığa yakın bölgelerdeki havers kanallarında bulunan osteoprogenitor hücrelerde hücre proliferasyonu başlatılır. Proliferasyon sonucu kırık uçlarındaki boşluklar hücrelerle dolarlar. Lokal aracılı mekanizmalar ile öncü hücreler, yeni damar, fibroblast, hücreler arası madde, destek hücreleri oluşturmak üzere farklılaşmaya başlarlar. Kırık hattındaki hücresel aktivitenin başlaması kimyasal, elektriksel ve mekanik faktörler ile gerçekleşmektedir [73].

Onarım sırasında kırık bölgesindeki granülasyon dokusu ve periosteumunda osteojenik tabakası ve az oranda endosteumda bulunan mezenkimal kökenli pluripotent hücreler değişime uğrayarak kemik iyileşmesini hızlandırır. Fibroblastlar kollajen sentezlerken kondroblastlar kollajen ve GAG salgırlar [67]. Kemik içerisinde kollajen miktarı arttıkça kemiğin dayanıklılığı artmaktadır.

Kırık bölgesinde mezenkimal hücre nüfusu 32. saatte en üst düzeye çıkmaktadır [74]. Bölgede yeni damar oluşumu 2-3 günde mikroskopik olarak görülebilir hale gelmektedir. Dolaşımın iyi olduğu alanda osteojenik hücreler çoğalmakta ancak distal kısımlara girildikçe dolaşımın azaldığı bölgede mezenkimal hücreler kondroblast ve kondrositlere farklılaşarak kırık dokuyu oluştururlar. Fibroblastlar ve kondroblastlar tarafından salgılanan matriks granülasyon dokusuna dönüşür ve bu granülasyon dokusu (yumuşak kallus) endokondral kemikleşmeye uğrayarak süngerimsi kemiğe dönüşür. Kemik kallus gelişimi gerilimin en az olduğu kırık hattında periferden başlar ve merkeze doğru gelişimini sürdürür. 2-6 haftalık süreçte kırık uçları arasında ve çevresinde osteoid doku gelişir. 6-12 haftada kemikleşme gerçekleşir ve mekanik zorlamalara dayanıklı kemik meydana gelir. 12-26 haftada kallus dokusu olgunlaşır ve 6-12 ayda kemik parçaları arasında kortikal kaynama tamamlanır [75].



Şekil 2.12: Kırık iyileşmesi tamir evreleri a)Hematom b)Yumuşak kallus c)Sert kallus d)Remodeling [76]

c) Remodeling dönemi (4-16 hafta)

İskelet sistemi ileri derecede özelleşmiş hücreler ve kompleks yapıda moleküller içeren dinamik bir organdır. Dış etmenler ve biyomekanik stres dışında periyodik olarak yeniden yapılmaktadır. Yeniden yapıma sürecinde birçok faktör mevcuttur (Tablo 2.1). Kemik remodeling safhası 1 yıla kadar uzayabilse de ortalama 6 ayda tamamlanmaktadır. Kemik yıkım süreci yaklaşık 1 ay, yapım süreci ise 5 ay civarındır [77].

Tablo 2.1: Kemik yeniden yapılandırılmasında rol oynayan faktörler [78]

HORMONLAR	
I. Polipeptid hormonlar	Paratiroid hormon Kalsitonin İnsülin Büyüme hormonu
II. Steroid hormonlar	1,25-dihidroksivitaminD ₃ Glukokortikoid Seks steroidleri
III. Tiroid hormonlar	
LOKAL FAKTÖRLER	
I. Kemik hücre kaynaklı	İnsülin benzeri büyüme faktörü β_2 -mikroglobulin TGF- β
II. Kartilaj kaynaklı	İnsülin benzeri büyüme faktörü Fibroblast büyüme faktörü
III. Kan hücre kaynaklı	İnterlökin-1 TNF- α
IV. Diğer	RANKL Osteoprotegerin Prostaglandin Nitrik oksit Makrofaj koloni uyarıcı faktör Mekanik yüklenme

Kemik dokunun remodelingi 5 temel fazda incelenebilir:

- 1- Aktivasyon: Preosteoklastların uyarılmasını takiben sitokin ve büyüme faktörleri etkisinde olgun osteoklastlara dönüşmesi.
- 2- Rezorpsiyon: Osteoklastların eski kemik dokusunun mineral matriksini sindirmesi
- 3- Geridönüş: Rezorpsiyonun sonlanması
- 4- Formasyon: Osteoblastların yeni kemik matriks salgılaması
- 5- İstirahat: Osteoblastların yeni kemik üzerinde dinlenen BLCye dönüşmesi.

Erişkinde herhangi bir zamanda trabeküler kemiğin %80'i, kortikal kemiklerin %95'i istirahat halinde bulunmaktadır. Kemik doku remodeling döngüsü, istirahat halinde bulunan ve BLC ile kaplı kemik yüzeyinde sitokin ve büyüme faktörleri kontrolünde aktivasyon süreci ile başlar [79]. Aktivasyon başlangıcında RANKL ve M-CSF'i de kapsayan osteoklastojenik faktörler etkisi ile HKH'ler ince mineralize olmamış osteoid dokunun üzerine gelerek olgun osteoklastlara dönüşürler [80]. Olgun osteoklastlar IGFs, TGF- β , BMPs, FGF ve PDGF vb. faktörler etkisinde kemik dokuya yapışarak rezorpsiyon sürecini başlatırlar [81]. Kemik yapışma yüzeyinde bulunan osteopontin, kemik sialoproteini ve osteonektin sayesinde osteoklastların yapışması sağlanır ve 2-4 hafta sürecek yıkım süreci gerçekleşir. Yıkım süreci sırasında yeni kemik oluşumunun engellenmesi için osteoklastlar tarafında semaforinler ailesinden semaforin4D salgılanır. Osteoklastlar ile osteoblastlar arasındaki iletişim yolu olan semaforin4D osteoblast üzerindeki PlexinB-1 reseptörüne tutunarak osteoblast farklılaşmasını engeller. Böylelikle kemik yıkımı yeni kemik yapımı olmadan devam edebilmektedir [82].

Rezorpsiyon fazı tamamlanması sonrasında 1-2 hafta sürecek olan geri dönüş fazı başlar. Olgun osteoklastların membranında bulunan EphrinB2/ephrinB4 bağlayıcı bölgelere ephrin2 ve ephrin4 bağlanarak osteoklastogenezisi inhibe ederler. Ayrıca aynı moleküller osteoblastların farklılaşmasını tetiklemektedir [83]. Bu aşamada osteoblastlar için reseptör görevi gören osteopontin birikir. Osteopontin daha sonra kalsiyum hidroksiapatit kristalleri ile mineralize olur. Osteoblastların yeni kemik matriksi salgılamasıyla kemik döngünü tamamlanır ve kemik doku istirahat dönemine girer.

2.1.9.2 Kırık iyileşmesinin düzenlenmesi

Kemik iyileşmesinin düzgün sürdürülebilmesi için yerel ve sistemik mekanizmaların devreye girmesi gerekmektedir. Kemik dengesi prostoglandinler ve kemik uyarıcı faktörleri gibi kenetleyici “coupling” faktörler sayesinde düzenlenmektedir.

- 1- Prostoglandinler: Hücre membranında bulunun araşidonik asitten meydana gelen yağ asitleridir. Hücre duvarının ve kollajen yapının zarar görmesi durumunda sentezlenir. İnflamatuar hücrelerde kemotaksise neden olurlar. Güçlü vazodilatatör etkili ve hücre proliferasyonunu tetikleyici niteliktedirler. Lenfositlerde antikor yapımını düzenlerler ve hücre membranında Ca^{+2} transportunu kolaylaştırırlar. Osteogenesis, kondrogenezis ve kondroliziste etkilidirler [71].
- 2- Kemik uyarıcı faktörler: Farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin mitozunu destekler ve osteogenezise yardımcı olurlar (Tablo 2.2).

Tablo 2.2: Kemik uyarıcı faktörler ve kemik iyileşmesindeki rolleri [84].

Kemik Uyarıcı Faktör	Kırık iyileşmesindeki rolü
TGF- β :	Enflamasyon ve doku onarımından sorumludur. En önemli kaynağı kemik dışı matriks ve trombositlerdir. Hücrenin integrin reseptörlerini uyararak hücre dışı matriks bileşenlerinden kollajen, fibronektin ve proteoglikan oluşumunu artırır. Granülasyon dokusu oluşumunu artırır.
BMP:	Yaralanan kemik dokudan salgılanır. Mitojen ve dönüştürücüdür. Mezenkimal hücrelerin kırıkta ve kemik hücrelerine dönüşümünü sağlar.
FGF:	Kırıkta ve fibroblast için mitojendir. Kırıkta oluşumu aşamasında kallusu genişletir.
PDGF:	Fibroblast ve kemik hücreleri için mitojendir. Bağ dokusunda kollajen sentezini artırır. Fibroblast proliferasyonu, mezenkimal hücre mitozu monosit ve makrofajların kırık bölgesine göçünü artırır.
IL:	Makrofaj ve monosit kökenlidir. IL-1 fibroblast çoğalması, kollajenaz ve PGE-2 üretimi ile ilgilidir. Osteoklastları uyararak kemik rezorpsiyonuna neden olur.
Plazma fibronektini:	Anjiogeneziste mitojenik etkilidir.
Somatomedin C:	İskelet sistemi üzerinde büyüme hormonu benzeri etkilidir. Kondroblastların bölünme, dönüşümünü ve kemik matriksi oluşumunu hızlandırır.
EGF	Kemik geri emilimini hızlandırır.

CDGF	İki tipi bulunmaktadır. Tip II kollajen ve hiyalüronik asit için düzenleyicidir.
MDGF	Sıçanlarda osteoblast benzeri hücreler ve kondrositler için mitojendir.
ECGF	Kıkırdak ve kemik için mitojendir.
ECDGF	Yeni damar oluşumu için mitojendir.

2.1.9.3 Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler

Kemikte yara iyileşmesini olumlu ya da olumsuz olarak etkileyen birçok yerel ve sistemik faktör bulunmaktadır [85].

1- Kırık iyileşmesini olumlu etkileyen faktörler

- BMPLer
- Prostaglandinler
- Parathormon
- Kalsitonin
- D vitamini
- Büyüme hormonları ve büyüme faktörleri
- TZP uygulanması
- Gen tedavisi
- Ameliyat sırasında uygulanan kemik grefti ve demineralize kemik matriksi
- Kafa travması varlığı
- Anabolik steroidler
- Düşük kuvvette lazer uygulaması
- Hiperbarik oksijen tedavisi
- Ultrason
- Manyetik alan
- Elektrik akımları
- Kırık hematomunun varlığı

2- Kırık iyileşmesini olumsuz etkileyen faktörler

- Yüksek enerjili travmalar ve geniş yumuşak doku hasarı
- Kırık uçlarının birbirinden ayrılması veya aralarına yumuşak doku girmesi

- Besleyici damarların hasar görmesi
- Yapılan cerrahi redüksiyon sırasında aşırı diseksiyon yapılması sonucu yumuşak doku hasarı
- Kırığın transvers, parçalı veya segmenter olması (spiral ve oblik kırıklar daha hızlı iyileşir)
- Açık kırık (hematomun boşalması, kontaminasyonu ve enfeksiyon olasılığı)
- Redüksiyonun başarısızlığı veya yetersiz stabilizasyon
- Enfeksiyon
- İleri yaş
- Eklem içi kırıklar (sinovyal sıvının kırık iyileşmesini bozucu etkisi)
- Kırık öncesi patolojik durum varlığı
- Spongioz kemik içermeyen veya kortikal kemik içeriği yüksek kırıklar
- Beslenme ve sağlıklı metabolizmayı etkileyen her türlü sistemik hastalık (diyabet, KBH, maligniteleri sistemik enfeksiyonlar, anemiler vb.)
- Kemoterapi
- Radyoterapi
- Sigara kullanımı (nikotin)
- Kortikosteroidler

2.1.10 Kırık tedavileri

2.1.10.1 Hayati tehlikesi olan kırık hastasına yaklaşım

Trafik kazası, darp, yüksekte düşme vb. travmalar sonrası tüm vücutta kırıklar görülebilmektedir. Travma hastası hızlı bir şekilde değerlendirilerek ilk yardım ABCD kurallarına uygun olarak müdahale edilir. A (airway, hava yolu); hava yolu kontrol edilerek açıklığı engelleyebilecek olan takma diş, yabancı cisimler kontrol edilir. Kontrol sırasında dil posteriora düşmüş ise çene yukarıya ve baş hafifçe arkaya itilerek hava yolu açılır. Lüzum halinde endotrakeal tüp takılmalıdır [86]. B (breathing, solunum); solunum kontrol edilerek yetersiz olması halinde oksijen tedavisi uygulanır. Solunum yetersizliğinde hızlı şekilde entübasyon planlanmalıdır. C (Circulation, dolaşım) Kardiyovasküler sistem kontrolü periferik nabız kontrolü ile birlikte yapılmalıdır. Kardiyak arrets olması durumunda vakit kaybetmeden güncel prensiplere

uygun olarak kalp masajına başlanmalıdır [87]. D (disability, sakatlık durumu) sistemik nörolojik muayene yapılarak pupil refleksi, ağrılı uyarana cevap ve motor aktivite gibi parametrelere bakılır. Muhtemel sıvı açığı damar yolu uygulanması sonrası düzeltilmeye çalışılır.

Hasta ile ilk karşılaşmada servikal vertebra travması şüphesinde boyun iki yanına ince yastık veya kum torbaları konulur. İmkanlar dahilinde servikal boyunluk var ise dikkatlice takılır (Şekil 2.13). Hasta sert bir zemine yatırılır. Torakolomber travma varlığında lomber lordoz ince yastıklar ile desteklenir ve gövdenin dönmesi engellenir. Kurtarma sırasında kırık stabilizasyonu sağlanmaz ise hareket ile ek hasar riski mevcuttur.



Şekil 2.13: Travmalı hastanın taşınması [88]

Üst ekstremitelerde kırık ve çıkıklarında üçgen bandaj, omuz askısı gibi geçici tespit materyelleri kullanılabilir. Alt ekstremitelerde kırık düşünüldüğü durumlarda ekstremitelerde geçici atellerle tespit edilmelidir. Tespit için uygun malzeme olmaması durumunda kırık ekstremitelerde sağlam tarafa sargı ile tespit edilebilir.

2.1.10.2 Kırık tedavi yöntemleri

Kırık tedavisinde ilk olarak konservatif tedavi yöntemleri tercih edilmektedir. Konservatif tedavi yöntemleri; sirküler alçı, atel, sargı ve bandaj uygulamalarını içermektedir. Kaymamış (non-deplase) kırıklar doğrudan sirküler alçılama yöntemi ile

tedavi edilebilirler. Kaymış (deplase) kırıklar ise redüksiyon manevraları ile normal anatomik pozisyonuna getirilerek atel veya sirküler alçı ile tespit edilirler. Kapalı redüksiyonun başarısızlığı durumunda veya cerrahinin kesin endikasyonu olan bir kırıkta yine geçici tespit sağlamak için alçı veya atel yöntemleri kullanılmaktadır.

1- Alçı, atel, sargı ve bandaj uygulamaları

Günümüzde sık kullanılan kireç alçı ilk defa 1852 yılında Antonius Mathijssen tarafından kullanılmıştır [89]. Kimyasal olarak anhidroz kalsiyum sülfat (CaSO_4) $2\text{H}_2\text{O}$ yapısında olan alçı tozunun gözenekli sargı bezine emdirilmesi ile elde edilir ve kuru olarak 7.5-10-15 cm boyutlarında rulolar halinde bulunur. Alçı su ile temas ettiğinde yapısındaki kalsiyum hidrate olur ve dışarı ısı yayarak sertleşir. Kurudukça sertleşen alçı ekstremitenin çevresini tamamen katediyorsa sirküler alçı adı verilir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Sirküler alçı görünümü [90]

Ekstremitenin çevresini tam olarak sarmayan ve genellikle aksiyel olarak yarısını saracak şekilde alçı plakalara oluklu alçı ya da alçı atel denir. Ateller genellikle üste ekstremitede için 8-12 kat, alt ekstremitede için 15-20 kat açılmış alçı katı kullanılarak yapılmaktadır. Ekstremitenin taşıyacağı yük miktarına göre alçı katman seviyeleri ayarlanmaktadır. Alçılama sırasında dikkat edilmesi gereken hususlar şunlardır;

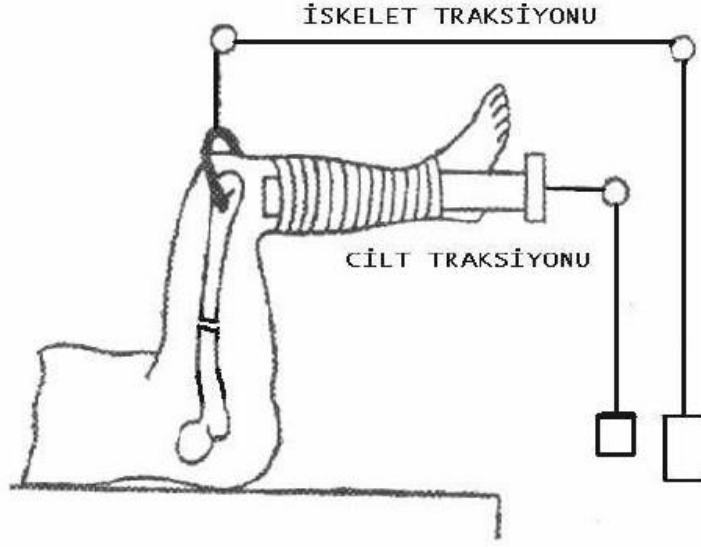
- Sirküler alçı dolaşıma müsaade edecek kadar sıkılmalıdır.
- Alçı sarılırken ekstremitenin etrafında kendi ağırlığıyla döndürülmelidir.

- Her zaman distalden proksimale doğru sarılmalıdır.
- Eklem yerlerini 8 figürü şeklinde geçmelidir.
- Alçı sarılırken bir önce sarılan karın $\frac{1}{2}$ si ile $\frac{2}{3}$ ünü örtecek şekilde sarılmalıdır.
- Yeterli sağlamlık için en az 8 kat sarılmalıdır.
- Proksimale ulaşınca tekrar distale doğru sarılıp sonra proksimale dönülmelidir.
- Bir alçı rulosu sarılıp diğeri sarılmaya başlanmadan önce ekstremitenin kıvrımlarına oturtulması gerekmektedir.

Alçılama işlemi için sentetik alçılarda kullanılabilir ancak daha çok tecrübe ister ve kalsiyum sülfat alçı gib rahat şekillendirme sağlanamayabilir. Sentetik alçıların en önemli avantajı sudan etkilenmemesidir. Elastik bandaj genellikle yumuşak doku lezyonlarında kısmi bir tespit sağlama ve ödemi azaltmak amacı ile uygulanmaktadır. Ayrıca pediatrik grup hastalarda klavikula kırıklarında elastik bandajla figür 8 bandajı yapılabilir. Ekstermiteye elastik bandaj sarılırken alçılama gibi distalden başlanarak orta sertlikte sarılır [85].

2- Traksiyon uygulaması

Traksiyon uygulanması kırıkların açık redüksiyonu, geçici tespit ya da kademeli redüksiyon sağlamak amacı ile kullanılabilir. Bazı durumlarda basit traksiyon ile kırık kapalı redüksiyonu sağlanabilmektedir. Kırığı immobilize edilip ağrıyı ve yumuşak doku hasarını azaltmak amacı ile uygulanabilmektedir. Bu amaçla kullanılan yöntem indirekt traksiyon (cilt traksiyon) denilmektedir. Örneğin cilt traksiyonu tibia her iki yanına cilt aparatları yapıştırılarak üzerine elastik bandaj uygulanarak sağlamlaştırılır ve traksiyon kilidinin ucuna yaklaşık 3 kg kadar ağırlık asılarak sallandırılır. Kırıkların kademeli olarak redüksiyonunu sağlayan uygulamalara direkt traksiyon (iskelet traksiyonu) denilir. İskelet traksiyonu sıklıkla kırıktan uzak bölgeden geçirilen steinman çivisinin cilt dışında kalan uçlarına üzengi geçirilerek ucuna ip ve makara sistemi bağlanmasıyla sağlanır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: Cilt ve iskelet traksiyonu [85]

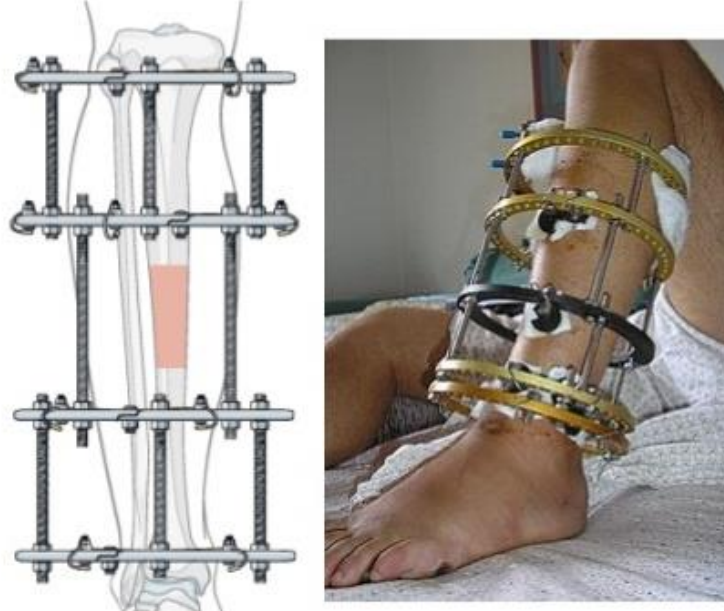
3- Eksternal fiksasyon

Kırık hatlarının distal ve proksimal bölgelerinden kemiğe uçları cilt dışında kalacak şekilde uygulanan çivi, vida veya tel konulması sonrasında bunların cilt dışında kalan uçlarının eksternal metal veya karbon fiber cihazlarla tespit edilmesine eksternal fiksasyon denir. Eksternal fiksasyonu sağlayan cihazlara da eksternal fiksator adı verilmektedir.

İlk olarak 1843 yılında Malgaigne tarafından temel prensipleri tariflenen eksternal fiksatorler 1900'li yıllarda Parkhill tarafında diafiz kırıklarının monolateral freymlenme tedavisinde kullanılmıştır. 1950'li yıllarda Garvill İlizarov tarafından sirküler fiksatorler ve transfiks teller tarif edilmiştir [91]. Günümüzde ilizarov eksternal fiksatorleri kırık fiksasyonu tedavisinde kullanılmaktadır (Şekil 2.16).

Eksternal fiksatorlerin en önemli avantajı kırık hatlarının açılmadan yapılabilmesi böylece kırık iyileşmesinde önemli olan kırık hematomunun kırık hattında kalması sağlanmaktadır. Eksternal fiksasyon işlemi ameliyathane koşullarında genel ya da rejyonel anestezi altında yapılır. Eksternal fiksatorlerle

kırıklara 3 boyutlu müdahale edilebilmekte ve gereği halinde distraksiyon veya kompresyon uygulanabilmektedir. Günümüzde ilizarov sirküler eksternal fiksatörler, AO tübüler eksternal fiksatörler ve dinamik aksiyal fiksatörler kullanılmaktadır [93].



Şekil 2.16: İliizarov sirküler eksternal fiksatörü [92]

4- İnternal fiksasyon

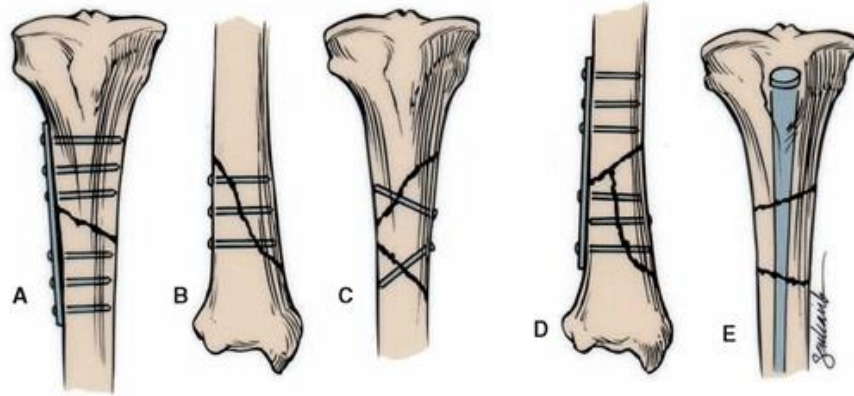
Kırık bölgesinde açık redüksiyon sonrası kırık parçalarını tespit etmek amacıyla kemik doku içerisine madeni tespit cihazları (implant) konulması işleminin bütününe osteosentez adı verilir. Osteosentez için genellikle plak, vida ve kirşner telleri kullanılmaktadır. İnternal fiksasyon yapılması için kırık hatlarının açılması şart değildir (Şekil 2.17). İntramedüller çiviler veya TEN ile sadece çivinin gireceği yer açılarak internal fiksasyon sağlanabilir [94].

İnternal fiksasyon için kullanılan implantların;

- Yeterli dayanıklılığa sahip olmaları
- Biyolojik olarak uyumlu olmaları ve toksik olmamaları
- Yıpranma ve aşınmaya karşı dayanıklı olmaları
- Vücut içinde reaksiyon yaratmamaları veya vücut tarafınca reaksiyona maruz kalmamalıdır.

Günümüzde paslanmaz çelik, titanyum alaşımları ve kobalt-krom madenlerinden yapılan internal implantlar kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılan implantlar:

- Kirşner telleri, serklaj telleri, kilitli kirşner telleri
- Knowles çivileri, Steinman çivileri, Küntscher intramedüller çivisi, Rush çivisi, Smith Petersen çivisi, Kilitli intramedüller çiviler, Staple çivileri, Ender intramedüller çivileri
- Schanz vidaları, kortikal vida, spongioz vida, malleol vidası, kanüle vidalar, interferans vidaları
- Vertebral anterior ve posterior enstrumantasyonları
- Parsiyel veya total endoprotezler
- Düz plaklar, rekonstrüksiyon plakları, kompresyon plakları sınırlı temaslı kompresyon plakları, semitübüler plaklar, 1/3 tübüler plaklar, dinamik kalça plağı, dinamik kondil plağı, harris müller plağı, L plak, Jewett plağı, T, plak ve anatomik plaklar kullanılmaktadır [85].



Şekil 2.17: İnternal fiksasyon: Plak, vida ve medüller çivi örnekleri [95]

Açık redüksiyon ve internal fiksasyon yöntemleri kapalı redüksiyon yöntemlerinin başarısız olduğunda kırıklarda kesin olarak uygulanmalıdır. Bazı kırıklarda da mutlak olarak açık cerrahi gerektirmektedir. Bu kırıklar;

- Kopma kırıkları (olekranon, patella, fibula başı vb.)
- Eklem içi kırıklar

- İnterpozisyon kırıkları
- Kırıklı çıkıklar
- Bazı epifiz kırıkları (Salter-Harris tip III-IV kırıklar)
- Replantasyon yapılırken
- İnstabil vertebra kırıkları
- Psödoartrozlar
- Büyük damar yaralanması eşlik eden kırıklardır.

Açık redüksiyon ve internal fiksasyon multiple kırıklar, patolojik kırıklar, kaynama gecikmesi, redüksiyon vetespiti kapalı yöntemlerle güvenli olmayan (tibia, humerus vb.) kırıklarda relatif endikasyondur.

2.2 KRONİK BÖBREK HASTALIĞI

2.2.1 Kronik böbrek hastalığı tanımı

Kronik böbrek hastalığı (KBH), böbrek yapısını veya fonksiyonlarını etkileyen pek çok hastalığı içeren genel bir terimdir. Böbreğin patolojik, laboratuvar veya görüntüleme yöntemleri ile gösterilmiş yapısal ya da fonksiyonel bozukluklarının 3 ay veya daha uzun süre var olması ya da böbrek hasarı olsun ya da olmasın, altta yatan hastalıktan bağımsız olarak glomerüler filtrasyon hızının üç ay veya daha uzun süre ile 60 ml/dk/1.73m^2 'nin altında kalması olarak tanımlanmaktadır (Tablo 2.3) [96].

Tablo 2.3: Kronik böbrek hastalığı tanı kriterleri [96]

Böbrek hasarı bulgusu	Böbrek nakli varlığı Albuminüri ($>30\text{mg/gün}$) Böbrek biyopsisinde böbrek hasarı Görüntülemelerde böbrek hasarı
Glomerüler filtrasyon hızı	GFH ($<60 \text{ ml/dk/1.73m}^2$)

Böbrekler vücutta hemostaz sağlanması, katabolik artıkların uzaklaştırılması ve elektrolit dengesinin sağlanmasından sorumludur. Ayrıca eritropoetin sentezi ile eritropoezde rol almaktadır. Endokrin olarak kemik kalsiyum-fosfor dengesini sağlamaktadır. Proteinlerin ve besin maddelerinin böbrek glomerullerinden re-absorbe ederek malnutrisyonu engellemektedir. Bu dengenin bozulduğu KBH'lı hastalarda böbreğin anatomik yapısı ve fonksiyonundaki geri dönüşsüz ve ilerleyici bozulma ile birlikte yüksek mortalite ve morbiditeye neden olan kronik böbrek yetmezliği gelişebilmektedir.

2.2.2 Kronik böbrek hastalığı epidemiyolojisi

KBH epidemiyolojisi ile ilgili veriler hastalığın özellikle erken evrede bulgu vermemesi neden ile sınırlıdır. ABD'de 20 yaş üstü nüfusun %16.8' sinin KBH olduğu bildirilmiştir [97]. Türkiye de on binin üzerinde erişkin hastayı kapsayan CREDIT (Chronic Renal Disease in Turkey) çalışmasında KBH prevalansı %15.7 olarak saptanmıştır [98]. 18 yaş altı nüfusta Avrupa da Evre III-V KBH insidansı milyonda 11-

12, Evre IV-V için milyonda 8 olarak bildirilir iken Latin Amerikada milyonda 2.8-15.8, Ortadoğu ve Güney doğu Asyada milyonda 38 olarak bildirilmiştir [99]. Türkiye de 19 yaş altı çocuklarda KBH insidansi milyonda 10.9 olarak bulunmuştur [100]. Tedavi edilmediği durumda mortalite ile seyreden KBH'a bağlı olarak 2013 verilerine göre dünyada yaklaşık 950.000 kişi hayatını kaybetmiştir [101].

2.2.3 Kronik böbrek hastalığı etiolojisi

KHB sıklığı ülkelere ve toplumların gelişmişlik düzeyine göre değişiklik göstermektedir. ABD'de son dönem böbrek yetmezliğinin %39'u diabetes mellitus, %26' sını hipertansiyon ve %11' i glomerulonefrite sekonder gelişmektedir [102]. Ülkemizde Türk Nefroloji Derneğinin verilerine göre en sık KBH nedeni kronik glomerulonefrit, diyabetis mellitus ve hipertansiyondur [103]. Ülkemizde son yirmi yılda KBH etiolojisinde diyabetik ve hipertansif nefropati oranında artma gözlenmektedir. Ömrün uzaması ve erken kardiyovasküler mortalitenin azalmasına bağlı olarak yaşlılarda KBH'ın en sık nedeni hipertansiyon olmuştur.

Tablo 2.4: Kronik böbrek hastalığı nedenleri [104]

Hastalık	Türkiye (%)	Avrupa (%)	ABD (%)
Glomerulonefrit	14,2	13	7,8
Diabetes Mellitus	22,8	21,2	44,7
Hipertansiyon	18,1	11,8	28
Polikistik Böbrek Hastalığı	4,9	5,7	2
Kronik İnterstitial Nefritler	4,5		
Ürolojik Hastalıklar (taş, obstruksiyon, VUR vb.)	6		2,7
Renal Amiloidoz (primer veya sekonder)	2,1		
Bilinen diğer nedenler	5,5		
Nedeni bilinmeyen	22	20,2	4

2.2.4 Kronik böbrek hastalığı ile GFH ilişkisi

KBH sınıflandırmasında pratikte en sık 2012 yılında Kidney Disease Global Improving Outcomes (KDIGO) grubunun yayınladığı kılavuz kullanılmaktadır [105]. Bu kılavuzda GFH'nın düşüşünün ve albüminüri artışının; hastalığın ciddiyeti ve diyaliz tedavisi ihtiyacı ile ilişkili olduğu yayınlanmıştır. Buna göre 3 aydan uzun süreli GFH'nın 30ml/dk altında seyretmesi yüksek KBH riski taşımaktadır.

GFH egzojen veya endojen filtrasyon belirteçleri ile hesaplanmaktadır. Egzojen hesaplama, verilen bir maddenin idrar ve kandaki klirensi hesaplanarak bulunur. Böbrek fonksiyonlarını en iyi gösteren belirteç inülin klirensinin hesaplanmasıdır. Endojen hesaplama yönteminde ise serum kreatinin, kan üre nitrojeni (BUN), sisplastin C, β_2 mikroglobulin kullanılmaktadır. Serum kreatinin, tubuler sekrete edilebilmesi ve kas kitlesi ile ilişkisi nedeni ile çok güvenilir bir parametre değildir. Serum kreatinin düzeyindeki her iki kat artış GFH'de %50 azalma olarak kabul edilmektedir [106].

Tablo 2.5: GFH kategorileri; Yeşil: Düşük risk Sarı: Orta risk Turuncu: Yüksek risk, Kırmızı: Çok yüksek risk belirtmektedir. [105]

				Persistan albuminüri seviyeleri		
				A1	A2	A3
				Normal veya hafif yükselme	Orta derece yükselme	Ciddi derece yükselme
				<30mg/g <3mg/mmol	30-300mg/g 3-30mg/mmol	>300mg/g >30mg/mmol
GFH kategorileri (ml/dk/1.73 m ²)	G1	Normal veya yüksek	≥ 90	Yeşil	Sarı	Turuncu
	G2	Hafifçe azalma	60-89	Yeşil	Sarı	Turuncu
	G3a	Hafif-orta azalma	45-59	Sarı	Turuncu	Kırmızı
	G3b	Orta-ciddi azalma	30-34	Turuncu	Kırmızı	Kırmızı
	G4	Ciddi azalma	15-29	Kırmızı	Kırmızı	Kırmızı
	G5	Böbrek yetmezliği	<15	Kırmızı	Kırmızı	Kırmızı

Hastaların klinik semptom ve bulguları, böbrek yetmezliğinin derecesi ve gelişme hızı ile yakından ilişkilidir. Canlılarda böbrek dokusunda azalma olduğu zaman geri kalan nefronlarda adaptasyon meydana gelir. Her evredeki adaptasyonun derecesi klinik ve biyokimyasal anormallikler ile seyretmektedir.

Böbrek fonksiyon kaybı minimal iken (<%60), fizyolojik adaptasyon tamdır. GFH'nın %50 altına inmesi ile renal hasara rol açan nedenler kompanse edilebilse de ilerleyici bir fonksiyon kaybı başlar. GFH'nın normal değerinin %20'sinin altına inmesi ile birlikte progresif anoreksi, bulanti, kusma, tuz retansiyonu, asidoz, uykusuzluk, anemi, kas yorgunluğu ve kan basıncında yükselme gözlenir [107]. GFH'nın 15 ml/dk altına inmesi ile son dönem böbrek yetmezliği söz konusudur. Hastalar diyaliz, renal transplantasyon gibi replasman tedavilerine ihtiyaç duyarlar. KBH'nın belirtileri, protein yıkım ürünlerinin kanda artması, sıvı-elektrolit ve asit-baz dengesi bozuklukları olarak ortaya çıkmaktadır. Bu bozukluklar tüm sistemleri etkilemektedir.

2.2.5 Kronik böbrek hastalığının sistemik etkileri

Hastaların klinik semptom ve bulguları böbrek yetmezliğinin derecesi ve gelişme hızı ile yakından ilişkilidir. KBH vücutta yaygın kronik enflamasyona neden olmaktadır. Gupta ve ark. yaptığı çalışmada pro-inflamatuar sitokinlerin ve akut faz proteinlerinin böbrek fonksiyonu bozuk olan hastalarda daha yüksek olduğunu göstermişlerdir [109]. Artmış inflammatuar sitokinler, anoreksiye ve albüminüriye ek olarak protein malnütrisyona katkıda bulunurlar. Yapılan hayvan deneylerinde IL-6, TNF- α verilmesi sonrası kas katabolizmasında artışı takiben kaşeksi olduğu gözlenmiştir [110]. KBH'nin sistemik etkileri klinik olarak farklı belirtiler vermektedir.

1. Sıvı ve elektrolit atım değişiklikleri:

Böbreklerin idrarı konsantre etme yeteneğinin bozulmasını takiben poliüri görülmektedir. KBH'da plazma Na⁺ miktarı böbrek yetmezliğinin son evresine kadar normal seviyede kalabilmektedir. Sağlam nefronlarla K⁺ atılımı hızlandığı için, terminal döneme kadar K⁺ normal düzeydedir. Terminal dönemde ise hipernatremi, hiperpotasemi ve hiperfosfatemi görülmektedir. Hipernatremi ve hipoalbuminemiye bağlı olarak ödem gelişebilmekte ve böylece oligüri ve anüri olabilmektedir [109]. Sıvı dengesi bozukluklarında poliüri, noktüri ve polidipsi görülebilmektedir.

2. Üremik toksinlerin birikmesi:

KBH'da GFH'nın 30 mL/dk'nın altına inmesi ile kanda çeşitli metabolitler, özellikle protein metabolizmasının son ürünleri birikmektedir. Böbrek fonksiyonları

azalması sonrası metabolik artıkların yarattığı toksisite üremik sendrom adı verilen multisistemik tutulum ve dejenerasyona neden olur (Tablo 2.6).

Tablo 2.6: Üremik Sendromun Multisistemik Etkileri. [111]

Sistemik	Gastrointestinal	Nörolojik	Hematolojik ve İmmunolojik	Kardiyovasküler
Halsizlik	İştahsızlık	Bilinç değişiklikleri	Anemi	Hipertansiyon
Hipotermi	Bulantı	Periferik nöropati	Trombosit bozuklukları	Sol ventrikül hipertrofisi
İnsulin rezistansı		Huzursuz bacak	Azalmış antikor yanıtı	Sol kalp yetmezliği
İnflamasyon		Koma		Periferik arter hastalığı
		Nöbet		Perikardit

3. Asit-Baz dengesinin bozulması:

Böbreklerin asit-baz dengesini sağlamakta önemli rolü bulunmaktadır. Böbrek fonksiyonlarının azalması ile metabolik asidoz gelişmektedir. Metabolik asidozda H⁺ iyon sekresyonu azaldığı için asit atılımı bozulur. Bikarbonat geri emilimi azalmıştır. GFH çok düşerse (10ml/dk'nın altına) asidoz ağırlaşarak kussmaul tip solunum ortaya çıkarabilmektedir [112].

4. Kardiyovasküler belirtiler:

Renin sekresyonunun artışı ve volüm yükü nedeni ile hipertansiyon gelişebilmektedir. En önemli faktör böbrekten Na⁺ atılamamasına bağlı olarak vücutta sıvı basıncının artmasıdır. KBH bulunan hastalarda hipertansiyona bağlı olarak kardiyovasküler hasarlar ve hiperlipidemi oluşabilmektedir. Konjestif kalp yetmezliği, akciğer ödemi ve üremik perikardit sık görülen komplikasyonlardır.

5. Gastrointestinal belirtiler:

Kan üre düzeyinin yüksek olmasına bağlı olarak hastalarda bulantı, kusma ve iştahsızlık görülebilmektedir. Ayrıca oral mukozada ülserler, halitozis, gastrik ülser, GİS kanamaları, konstipasyon ve diyare görülebilmektedir. Üremik sendroma bağlı gastrik irritasyon, dehidratasyon, elektrolit kaybı ve hipertansif ensefalopati gelişebilmektedir.

6. Hematolojik belirtiler:

Hastalarda anemi ve kanama-pıhtılaşma bozuklukları görülebilmektedir. Aneminin başlıca nedenleri eritrosit yapımının azalması, eritrosit ömrünün kısalması ve kan kayıplarıdır. Eritrosit yapımının azalmasının nedeni; eritropoetin oluşumunda azalma, kemik iliğinin baskılanması, demir emilimi ve kullanımında meydana gelen bozukluk ve folik asit eksikliğidir. Normal erişkinlerde yaşam süresi 120 gün olan eritrositlerin ömrü üremik toksinler ve mikroanjyopati nedeni ile KBH hastalarında 70-80 güne düşmektedir [112]. KBH hastalarında trombosit fonksiyon bozukluğu nedeni ile pıhtılaşma süresi uzamakta ve kanamalara yatkınlık gözlenmektedir.

7. Dermatolojik belirtiler:

KBH hastalarında hemen hepsinde idrarda atılamayan pigmentlerin ciltte birikimi ve anemi etkisi ile deri rengi kirlili koyu kahverengidir. Ciltte kolaylıkla morarmalar olmaktadır. Özellikle boyun, göğüs, bacak ve kollarda kaşıntı olmaktadır. Cilt genellikle kurudur ve cilt kuruluğu diyaliz hastalarında daha belirgindir.

8. Nörolojik belirtiler:

Hastalarda erken dönemde konsantrasyon bozuklukları görülmektedir. Üremi bulguları ilerledikçe hastalar baş dönmesi ve uykusuzluktan şikayetçi olurlar. Ayrıca kas krampları, kronik baş ağrıları ve konvülsiyonlar görülebilmektedir.

9. Renal osteodistrofi:

Renal osteodistrofi erken dönemde genellikle klinik belirti vermemektedir. Kontrol edilmediği durumlarda diyaliz döneminde ağrıya neden olmakta ve hastanın fiziksel aktivitesi ve mobilizasyonunu kısıtlayabilmektedir. Paratiroid hormonun fazla salgılanmasına bağlı olarak osteitis fibroza, osteoskleroz, osteomalazi ve osteoporoz görülebilmektedir.

2.2.6 Kronik böbrek hastalığı ve kemik iyileşmesi

Böbrekler serum Ca⁺, P, PTH, kalsitriol ve FGF-23 düzeylerini etkileyerek kemik ve mineral metabolizmasında önemli rol oynar. KBH erken evrelerinden itibaren kemik oluşumu, kemiğin yeniden düzelmesi ve büyümesinde ayrıca mineral

metabolizmasının düzenlenmesinde sorunlar ortaya çıkabilmektedir. KBH olanlarda kemik ve mineral metabolizması bozuklukları Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) tarafından aşağıdaki sorunlardan en az birinin varlığı olarak tanımlanmaktadır [113].

1. Ca, P, PTH veya D vitamini metabolizmasının bozuklukları
2. Kemik histolojisinde ve boy uzamasındaki sorunlar
3. Damarlar ya da diğer yumuşak dokularda kalsifikasyonlar

Renal osteodistrofi KBH olanlarda komplikasyon olarak ortaya çıkan kemik patolojilerinin tanımlamak için kullanılan bir terimdir. Yüksek döngülü kemik hastalığı (osteitis fibrosa sistika, ikincil hiperparatiroidizm) serum PTH fazlalığına bağlı olarak ortaya çıkan ve sıklıkla tedavisiz KBH hastalarında görülen bir tablodur. Düşük döngülü kemik hastalığı (adinamik renal osteodistrofi) ise yoğun ve uzun süreli Ca ve D vitamini desteği alıp serum PTH'sı baskılanan KBH hastalarında görülen bir durumdur [114].

2.2.6.1 Kemik ve mineral metabolizması bozukluklarının patogenezi

Böbrekler 1α -hidroksilaz enzimi ile 25-hidroksi vitamin D₃'ün aktif hali olan kalsitriola dönüşmesinin sağlarlar. Kalsitriol, serum Ca düzeyini bağırsaklardan Ca emilimini arttırarak düzenlemektedir. KBH'a bağlı olarak böbrek kitlesinde azalma olur. Böylelikle kalsitriol sentezi azalır ve hipokalsemi gelişir. Hipokalsemi PTH salınımını arttırır ve PTH kemik matriksinden Ca ve P rezorpsiyonu ile regülasyon sağlamaya çalışır. PTH'nun P atılımını sağlaması nedeni ile serum fosforu normal veya hafif düşük düzeyde kalır. GFH'nın düşmesini takiben idrarla P atılımı azalır ve serum P düzeyleri giderek artar. Bu nedenler hiperfosfatemi Evre IV ve V KBH aşamasına kadar görülmez [115]. Hiperfosfatemi PTH salınımını arttırır ve 1α -hidroksilaz aktivitesinin baskılar. Uzun süreli hipokalsemi, hiperfosfatemi ve düşük kalsitriol ikincil hiperparatiroidizme yol açar ve bu durum paratiroid bezinde hiperplaziye neden olur.

FGF-23 ikincil hiperparatiroidizm patogenezinde rol alan ve fosfatürik etkiye sahip bir hormondur. FGF-23 böbreklerden P atılımını arttırır ve kalsitriol sentezini

baskılar. KBH evresi ilerledikçe serum FGF-23 düzeyleri artar, fakat GFH'da azalmaya bağlı olarak P atılımı gerçekleşemez. Artan FGF-23 düzeyleri kalsitriol sentezini baskılayarak PTH salınımını artırır ve ikincil hiperparatiroidizm gelişmesine neden olur [116].

2.2.6.2 Kemik ve mineral metabolizması bozukluklarının değerlendirilmesi

Renal osteodistrofi, KBH bulunan bireylerin serumunda Ca, P, ALP ve PTH düzeyi takibi yapılarak önlenebilmektedir. KBH bulunan bireylerde laboratuvar testlerinin hangi sıklıkta yapılacağı K/DOQI rehberinde tanımlanmıştır (Tablo 2.7) [116].

Tablo 2.7: KBH evrelerine göre serum Ca, P, ALP ve PTH kontrol sıklığı ve hedef PTH değerleri

KBH evresi	Ca, P ve CO ₂ kontrol sıklığı	PTH ve ALP kontrol sıklığı	25(OH) ₂ D ₃ kontrol sıklığı	Hedef PTH düzeyi (pg/ml)
II	Yıllık	Yıllık	En az yılda bir	35-70
III	6 ayda bir	6 ayda bir	En az yılda bir	35-70
IV	3 ayda bir	3 ayda bir	En az yılda bir	70-110
V	Ayda bir	3 ayda bir	En az yılda bir	200-300

Serum ALP düzeyleri osteoblastik aktivitenin artışı ile orantılı olarak yükselmektedir. Serum PTH düzeyleri GFH'nın azalması ile artar. Vücuttaki D vitamini depoları miktarı serum 25-OH vitamin D₃ miktarı ile gösterilebilmektedir. Normal D vitamini düzeyi 20 ng/ml'nin üzerinde olmalıdır. D vitamini düzeyinin 20-30 ng/ml arası olması yetersizlik, <20 ng/ml olması eksiklik olarak tanımlanır [114].

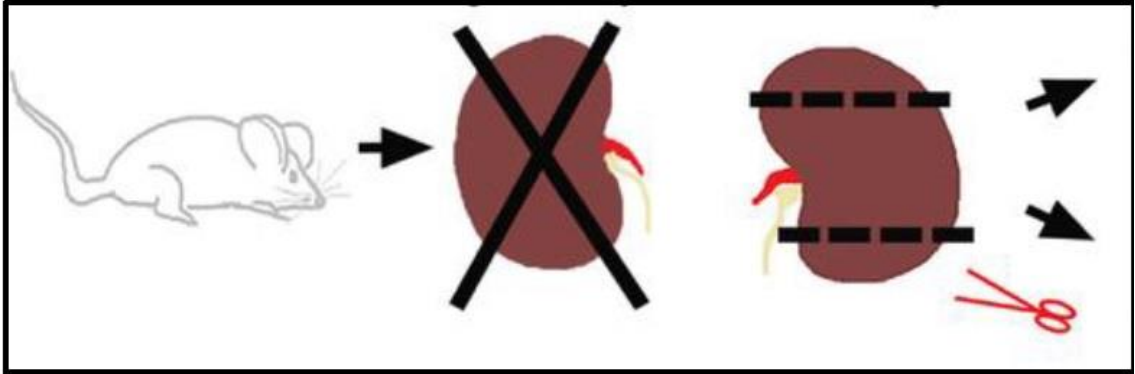
KBH kemik kitlesinde azalmaya neden olsa da erken evre KBH hastalarında kemik ve mineral bozukluklarına tanı konmasında anlamlı yararı bulunmamaktadır. Evre III ve IV KBH hastalarında klinik ve laboratuvar olarak kemik hastalığını düşündüren bulgular varsa direk grafi çekilmelidir. Evre V KBH olanlarda ise yılda bir kez direk grafi çekilmesi önerilmektedir. Ağır ikincil hiperparatiroidizm varlığında direkt grafide subperiosteal rezorpsiyon görülmesi tipiktir. KBH'na bağlı kemik hastalığı tanısında altın standart yöntem kemik biyopsidir.

2.2.7 Kronik böbrek hastalığı deneysel modelleri

KBH patofizyolojisinin daha iyi anlaşılabilmesi ve KBH evrelerinde artışın önüne geçilmesi için deneysel modellere ihtiyaç vardır. Yapılacak olan deneysel modelin mevcut patoloji ve etiyojolojiye benzer olması önem taşımaktadır. Deneysel çalışmalarda kullanılan canlıların insanlara göre daha hızlı KBH geliştirmesi beklenmektedir. KBH çalışmalarda sıçan, fare ve tavşan kullanımı ön plandadır ancak uygulanacak yöntemler yüksek mortalite oranlarına sahiptir. KBH modelleri cerrahi ve farmakolojik olarak iki başlık altında incelenebilir.

2.2.7.1 Cerrahi yöntemler

Subtotal Nefrektomi: 5/6 Nefrektomi modeli olarak da bilinmektedir. İlerleyici böbrek yetmezliği modelleri arasında en sık kullanılan modellerden biridir. Cerrahi teknik olarak ligasyon, ablasyon veya iki yöntem bir arada kullanılabilir. Subtotal nefrektomi modeli ilk kez 1932 yılında Chauntin ve ark. tarafınca tanımlanmıştır [117]. Yöntemin modern şekillenmesi 1988 yılında Gagnon ve ark.'nın tanımladığı fare modeli ile olmuştur. Bu yöntemde sol böbreğin üst ve alt pollelerinin ablasyonu veya ligasyonu uygulandıktan sonra bir hafta sonra ikinci operasyonda sağ böbreğe nefrektomi uygulanmıştır [118].



Şekil 2.18: Sağ nefrektomi ve sol 2/3 nefrektomi yöntemi [108]

5/6 Nefrektomi modelinin avantajı kompansement mekanizmalarının devreye girmesi ile mortalitenin azaltılmasıdır. Laboratuvar olarak kan üre azotu cerrahi yapılan sıçanlarda kontrol grubuna göre 1,5- 4,8 kat artmış bulunurken %80 oranında glomeruloskleroz görülür. Seth ve ark bu tekniği modifiye ederek tek seansa indirmişlerdir. Ayrıca olası komplikasyonların azaltılmasına yönelik inhale anestezi

kullanmışlardır [119]. Kren ve ark. bu yöntemi sağ nefrektominin ardından 1 hafta sonra renal pöleri bağlamak yerine renal arterin dallarına ligasyon uygulayarak modifiye etmişlerdir. Bu şekilde serum kreatinin miktarı ortalamanın 2 katından fazla artış göstermiştir [120].

Tek taraflı üriner obstrüksiyon: İnterstisyel fibrozis çalışmaları için uygulanan yöntemdir. Karın orta hattın abdominal kesi ile girilerek diseksiyonla böbreğe ulaşılır. Üreterlerden birine dikiş konularak üreter lümeni kapatılır. Ligasyon uygulanan renal kalikte hidronefroz gelişir [121].

2.2.7.2 Farmakolojik yöntemler

Kronik böbrek hastalığı oluşturmaya yönelik sık kullanılan ajanlar;

Adenin: Oral yolla yem içerisine karıştırılarak verilir. İlacın 2 haftadan uzun süre alınması sonrası böbrek tübüllerinde dilatasyon, tübül bazal membranlarında kalsifikasyon, interstisyel inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fibrozis gelişir. Oral alımın 4 haftadan uzun sürdürülmesinde ağır anemi, hiperfosfatemi ve hipokalsemi gözlenir [122].

Adriamisin: Tek taraflı nefrektomi uygulanır ve takibindeki toplamda 2 defa olacak şekilde 3 hafta aralıklarla 2 mg/kg uygulanır; farelerdeki ilaç dozu 10-11 mg/kg, i.v olarak yapılır. Böbrekte lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu, glomerüloskleroz, interstisyel fibrozis ve proteinüri gelişmektedir [123].

Puromisin: Sıçanlarda tek taraflı nefrektomi yapıldıktan sonra 100-150 mg/kg, i.p uygulanır. İlk uygulanmadan 4-6 hafta sonra 2-3 hafta boyunca haftalık 40-45 mg/kg, i.p olacak şekilde tekrarlanır. Böbreklerde lenfosit ve makrofaj infiltrasyonu, glomerüloskleroz, proteinüri ve interstisyel fibrozis gözlenir [124].

Siklosporin: İki farklı şekilde uygulanabilmektedir. 4-8 hafta boyunca günlük 1-6 mg/kg ya da 28 gün boyunca günlük 15-25 mg/kg, i.p olarak uygulanabilmektedir. Uygulama sonrası serum kreatinin seviyeleri yükselir. Böbreklerin tübül epitel hücrelerinde

vaküolizasyon, dilatasyona neden olur. Böbrek tübül hücrelerinin apoptozisini takiben böbrekte atrofi oluşturarak interstisyel alanda band şeklinde fibrozis gelişimine neden olur. Böbrek damarlarında ise arteriolar hyalinoz izlenir [125].

Sisplatin: Kanser tedavisinde kemoterapi ajanı olarak kullanılan sisplatin böbrek tübülü çevresinde fibrozise neden olmaktadır. KBH modeli oluşturmak için fare modelinde lethal dozda olmayan Sisplatin 7-10 hafta süre ile 2 mg/kg/hafta dozunda uygulanmaktadır [126].

Methotreksat: Antineoplastik tedavide kullanılan antimetabolit grubundan olan ve folik aside benzeyen bir ilaçtır. Dihidrofolat redüktaz enzimini bloke ederek malign hücrede folatın aktif formu olan tetrahidrofolat oluşumu engeller. Böylece DNA ve RNA sentezi bozular. Oral olarak 3 gün doz arttırılarak 60, 90 ,120 mg/kg olacak şekilde verilir. Takibinde 10 mg/kg olacak şekilde i.p uygulanır. Böbreklerde oksidatif stres yaratarak fibrozise neden olur [127].

2.3 KÖK HÜCRELER

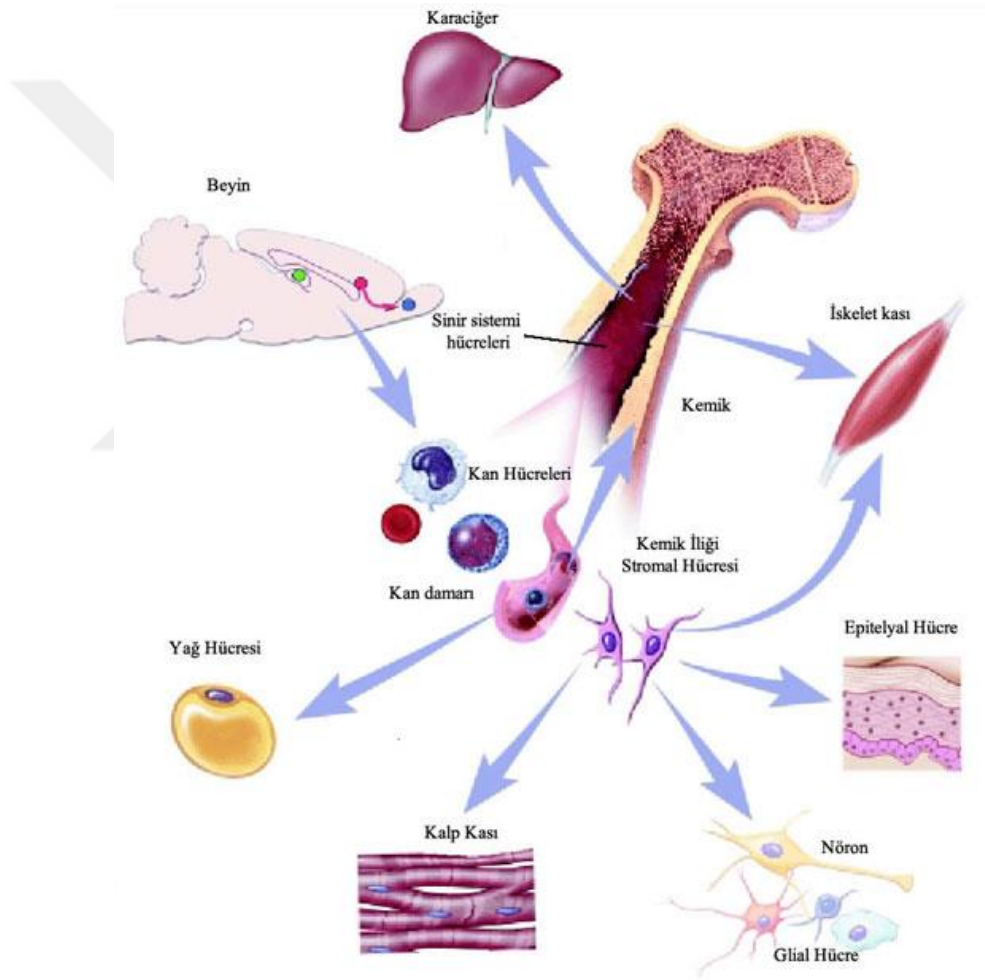
2.3.1 Genel bilgiler

Kök hücreler farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahip, çok uzun süre bölünebilen ve kendini yenileyebilme özelliği olan farklılaşmamış hücrelerdir. Vücutta yenilenmesi gereken dokulardan aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Bu dönüşümü genler ve dış uyaranlar belirlerler [128]. Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda ölüm ya da hasar meydana gelince kök hücreler hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye dönüşüm gösterirler. Kök hücrelerin bu yetenekleri hücre hasarlarına bağlı gelişen Alzheimer, Tip 1 diyabet, Multiple skleroz, ALS gibi hastalıkların tedavileri konusunda umut verici olmuş ve kök hücre tedavileri konusundaki ilgiyi arttırmıştır [129].

Kök hücre araştırmalarında; hücre, doku veya organların biyolojik işlevlerini yerine koymayı (rejeneratif tıp) ya da tamir etmeyi (reparatif tıp) sağlayacak yöntemler üzerinde çalışılmaktadır. Bir hedef doku veya organa, o organın işlevlerini eski haline getirmeye yetecek kadar sayıda ve kalitede izole edilmiş ve özellikleri belirlenmiş olan hücrelerin nakledilmesi ile bu amaca ulaşılabilir. Kök hücreler, bu amaca hizmet edebilecek yani hücre tabanlı tedavide kullanılacak başlıca unsur olarak görünmektedir [130].

Kök hücreler mezenkimal ve embriyonel olarak 2 gruba ayrılır. Mezenkimal kök hücreler (MHK), erişkin kök hücre tipidir. Stromal kökenli olmaları nedeni ile genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşımaları, MKH’lerin tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli taşımalarının temelini oluşturmaktadır. Birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeni ile içinde buldukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarına önemli katkı sağlarlar. MKH temel kaynakları kemik iliği ve adipöz dokulardır. Yapılan son çalışmalarda kemik iliğinden elde edilen kök hücreler ile yağ hücrelerinden elde edilen kök hücrelerin farklılaşma kapasitelerinde fark olmadığı gösterilmiştir [131-135].

Günümüzde, kök hücre biyolojisindeki en tartışmalı konulardan biri kök hücre plastisitesi ile ilişkilidir. Dokuya özgün kök hücrelerin, kaynak dokudan daha farklı bir hücre tipine farklılaşabilme yeteneğine “erişkin kök hücre plastisitesi” denmektedir. 1983 yılında Sale tarafından allojenik hematopoetik kök hücre nakli sonrası, yaygın akciğer ossifikasyonların bağlı olarak solunum yetmezliğinin tespiti üzerine in vivo plastisite kavramının ilk düşünceleri doğmuştur [136]. Sonraki yıllarda, başta kemik iliğinde bulunan kök hücrelerin in vitro ve in vivo koşullarda yalnızca kaynaklandıkları doku ve organların hücrelerini değil vücudun diğer işlevsel hücrelerine de dönüşebildiklerini (plastisite) gösteren raporlar yayınlanmıştır [8,137,139].



Şekil 2.19: Kemik iliği kök hücrelerinin farklılaşma ürünleri [138]

Bjornson ve ark. beyin kök hücrelerinin kan hücreleri ve iskelet kas hücrelerine dönüşebildiğini göstermiştir [139] (Şekil 2.19). Kök hücrelerin plastisitesini açıklayan dört mekanizma teorisi mevcuttur. Bunlar;

1- Transdeterminasyon: Bazı hücre dizilerini oluşturmaya programlanmış olan kök hücre diğer kök hücreye değişir ve dönüştüğü hücre tiplerini meydana getirir.

2- Transdiferansiyasyon: Farklılaşmamış olan hücre bir diğer farklılaşmış hücrenin özelliklerini kazanır.

3- Dediferansiyasyon: Bir progenitör veya prekürsör hücrenin dönüşümü sonrası bir diğer hücre dizinine farklılaşması.

4- Hücre füzyonu: Kök hücre veya olgunlaşmış hücrelerin yönlendirilmiş olan hücre dizileri ile birleşerek yeni hücre dizimine yol açmasıdır.

Transdiferensiyasyon terimi ise sıklıkla kök hücrelerin plastisite potansiyeli anlamında kullanılmaktadır. Transdiferensiyasyon, birkaç özgün türde doğal olarak meydana gelir. Örneğin, semender ve civcivlerde gözün lensi çıkartıldığı zaman, iris hücreleri lens hücrelerine dönüşür [129].

2.3.2 Kök hücrelerin sınıflandırılması

Kök hücreler buldukları dokuya göre embriyonik kök hücreler ve erişkin kök hücreler olmak üzere iki genel gruba ayrılabilir. Farklanma potansiyellerine göre kök hücreler totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent kök hücreler olarak sınıflandırılırlar. Bu sınıflandırma kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerine göre (Tablo 2.8).

Tablo 2.8: Kök hücrelerin farklılaşma yeteneklerine göre sınıflandırılması [108]

Totipotent	Tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve yeteneğe sahip hücrelerdir.
Pluripotent	Blastokist aşamasını takiben çok geniş hücre gruplarını oluşturabilen hücrelerdir.
Multipotent	Farklı organ sistemlerinde, farklı doku tiplerine dönüşebilme yeteneği olan hücrelerdir.
Oligopotent	Lenfoid ve myeloid gibi farklı hücre tipine dönüşebilen hücrelerdir.
Unipotent	Tek bir doku tipinde çoğalabilen hücrelerdir.

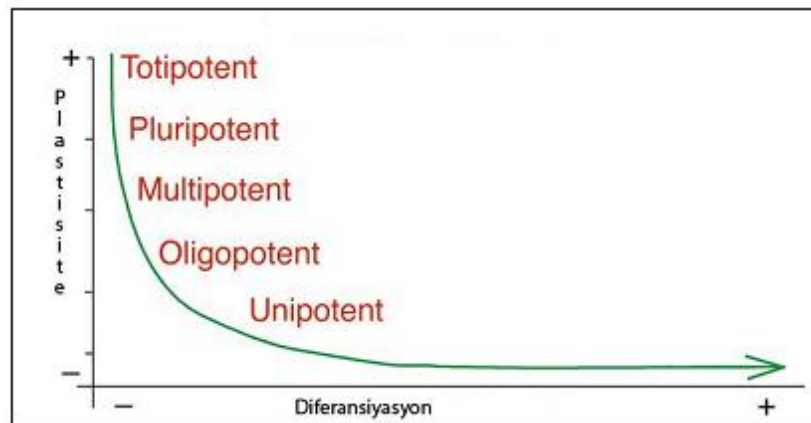
Totipotent Hücre: Erkeğin spermi ile kadının yumurtası birleştiğinde oluşan hücre (zigot) tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu hücelere her şeye dönüşebilen anlamına gelen totipotent hücre denir. Döllenmeden sonraki ilk 4 gün içinde oluşan hücrelerin her biri totipotent hücredir ve her bir hücre ayrı bir organizmayı oluşturabilir.

Pluripotent Hücre: Döllenmeden sonraki 5. günden itibaren meydana gelen hücreler blastokist adı verilen küresel bir şekil alır. Bu kürenin içindeki hücreler vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip olmalarına rağmen, artık tek başlarına tüm organizmayı oluşturacak güce sahip değildirler. İşte bu tür hücelere pluripotent hücre denir.

Multipotent Hücre: Birbirine yakın hücre gruplarını oluşturabilen kök hücrelerdir. Kan kök hücreleri, kemik iliğinde bulunur ve gerektiğinde beyaz kan hücrelerine, kırmızı kan hücrelerine ve trombositlere dönüşebilir.

Oligopotent hücre: Lenfoid ve myeloid hücrelerde olduğu üzere sadece birkaç hücre grubunu oluşturan kök hücrelerdir.

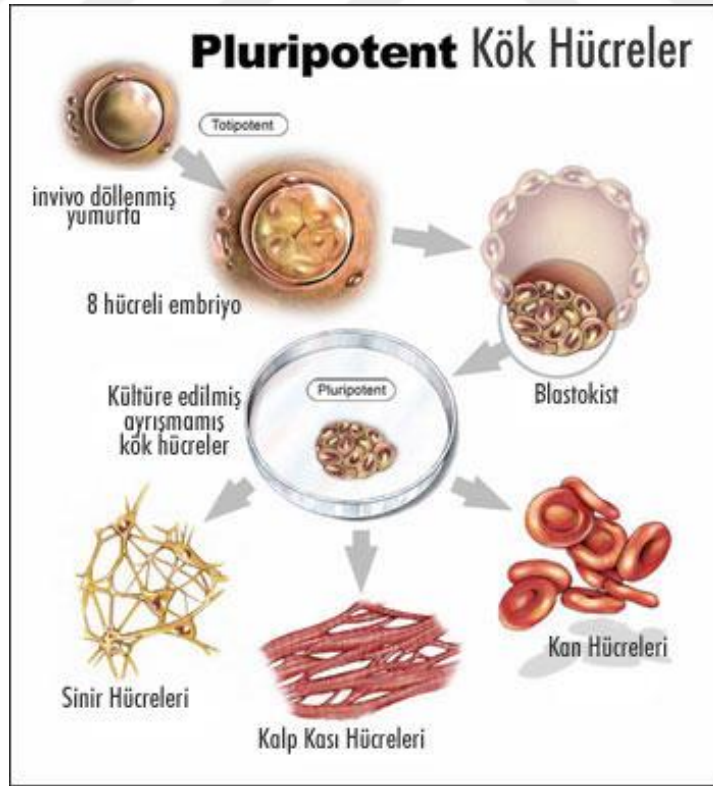
Unipotent hücre: Kas ana hücresinde olduğu üzere bir hücre tipini oluşturan kök hücrelerdir (Şekil 2.20).



Şekil 2.20: Kök hücrelerin farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması [140].

2.3.3 Embriyonik kök hücreler

Vücuttaki tüm hücelere dönüşebilecek potansiyele sahip ilk embriyonel hücre “totipotent” özelliindedir. Bu hüceler sınırsız farklılaşma yeteneğine sahip kök hücelerdir. Erken embriyonel dönemde 4 hücreden 8 hücreye kadar olan tüm blastomerler totipotenttir. Fertilizasyonun yaklaşık 5. gününde bu hüceler “blastokist” denilen içi boşluklu hücre topluluklarına dönüşürler. Blastokistin iç hücre kitlesindeki hücelerin (embriyoblastlar), endoderm, ektoderm ve mezodermden köken alan yaklaşık 250 hücre tipine farklılaşabilirdikleri gösterilmiştir [141]. Pluripotent özellikteki insan embriyonel kök hüceleri blastokistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Embriyonel kök hücelere yüksek seviyede telomeraz aktivitesi içerirler, hücre replikasyonu ile aktivasyonda azalma gözlenmez, bu nedenle sınırsız proliferasyon kapasitesine sahiptirler. Kök hücelere embriyon gövdesi dışına çıkarıldıklarında deneysel yolla farklılaşmaları ve dokulardaki hücelere benzer hücelere dönüşebildikleri gösterilmiştir (Şekil 2.21). Ancak yüksek telomeraz enzimi etkinliği sonucunda kontrolsüz çoğalma ile tümör hücelesine dönüşme olasılığı da yüksektir [142].



Şekil 2.21: Kök hücelere farklılaşma özelliklerine göre sınıflandırılması [143].

Fetal hayatın ilerleyen dönemlerinde hücreler daha özel görevlere sahip olup erişkin tip kök hücrelere dönüşürler. Bu erişkin kök hücreleri tipik olarak yer aldıkları dokunun hücre tiplerini üretirler. İnsan embriyonik kök hücreleri ilk defa 1998 yılında James Thomson ve ark tarafından üretilmiştir [144]. Doku tamiri ve parkinson, alzheimer, kalp yetmezliği gibi birçok hastalığın giderilmesinde etkili olabilecek embriyonel kök hücre kullanımı beraberinde etik ve medikolegal tartışmalar getirmiştir.

2.3.4 Erişkin kök hücreler

Erişkin tip kök hücreler farklılaşmış hücreler arasında latent evrede bekleyen, buldukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamakta görevli farklılaşmamış hücrelerdir [145]. Erişkin kök hücreler embriyonik kök hücreler kadar farklılaşma kapasitesine sahip olmasalar da pluripotent özelliktedirler. Bu hücreler köken aldıkları dokulardan bağımsız olarak mezodermal, ektodermal ve endodermal farklılaşma gösterebilmektedirler [146].

Yetişkinde kök hücreler kemik iliği, beyin, bağırsak gibi çeşitli organ ve dokularda bulunurlar (Tablo 2.9). Kök hücrelerde bulunması gereken iki temel özellik vardır. Birincisi, simetrik bölünme ile kendisini yenileyebilmeli, ikincisi gerektiğinde başka hücreye dönüşebilmelidir. Böylece kök hücre eksik dokuyu tamamlar iken bir yandan da kendi yedeğini de meydana getirirler. Çeşitli sinyallerle özelleşen kök hücreler farklı bir hücreye döndüğünde pluripotenslik özelliğini kaybeder.

Tablo 2.9: Kök hücre kaynakları ve oluşturdukları hücreler [147]

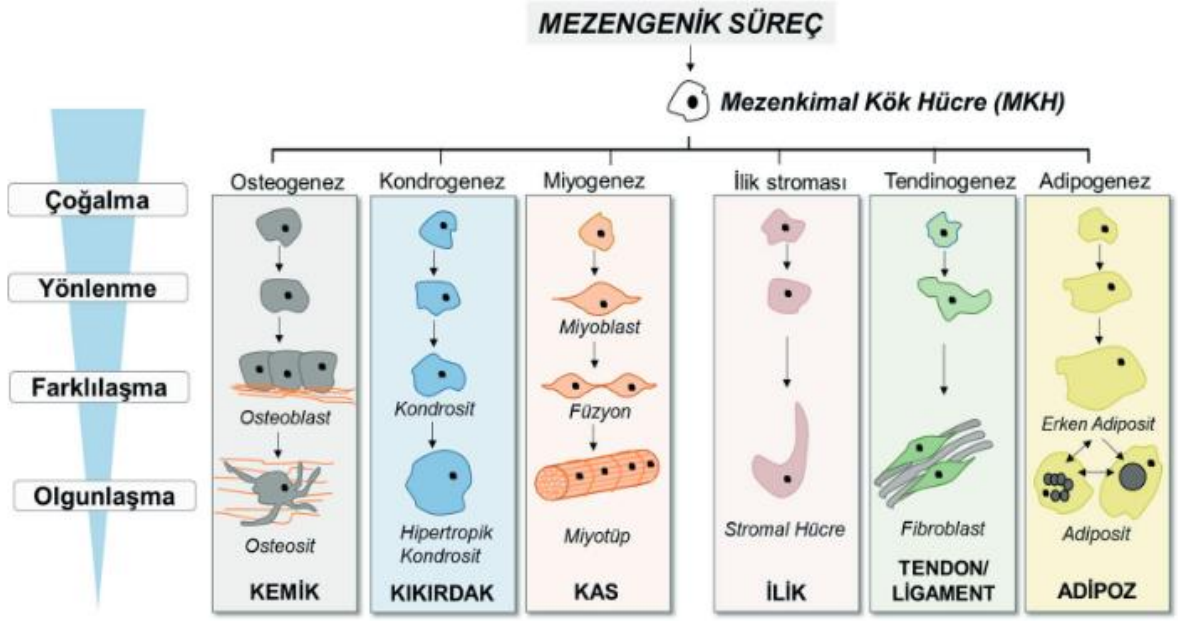
Kök Hücre	Kaynak	Üretilen
Hematopoetik	Kemik iliği	Kan, endotel, hepatosit, kas hücreleri
Nöral	Beyin	Nöronlar, astrositler, oligodendrositler, kan hücreleri
Epitelial	Bağırsak, epidermis	Epidermal katlardaki tüm hücreler
Mezenkimal	Kemik iliği, yağ, kıkırdak	Kemik, kıkırdak, tendon, kas, ilik stroması,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

Erişkin kök hücreler ile ilgili ilk çalışmalar hematopoetik kök hücreler ile yapılmıştır. 1924’de Alexander A. Maximov farklı kan hücrelerine dönüşebilen öncül hücreler tanımlamıştır [148]. 1960’larda Ernest A. McCulloch ve James E. Till ilk kez kemik iliği hücrelerinin klonal özelliğini ortaya çıkarmışlardır [149]. 1976 yılında Friedenstein ve ark., MKH’lerin kendini yenileyebildiğini, değişik bağ doku elemanlarına farklılaşabileceğini ve fibroblastlara benzer yapıları olduğunu göstermişlerdir [150]. 1976 yılından günümüze malign ve malign olmayan hastalıkların tedavilerinde kök hücre naklinde erişkin türde hematopoetik kök hücreler kullanılmaktadır. Dokular içindeki erişkin kök hücreler bölünme yeteneklerini kaybederlerse hasarlı veya hastalıklı dokuların tamiri ve yenilenmeleri imkansız hale gelir [151].

2.3.4.1 Mezenkimal kök hücreler

MKH’ler, erişkin tip kök hücre grubuna dahildir. Stromal kökenli olmaları nedeni ile genel anlamda “destek hücresi” özelliği taşırlar. Bu sebepten MKH’ler tıbbın birçok alanında kullanım potansiyeli bulunmaktadır. Kemik iliği, yağ hücresi ve kıkırdak gibi birçok dokudan elde edilebilen, sayıca çoğaltılmaya elverişli dayanıklı hücrelerdir. Salgıladıkları çözünür faktörler, hücreler arası veya hücre dışı matriks ile yakın ilişki halinde bulunmaları nedeni ile içinde buldukları dokuya özel hücrelerin fonksiyonlarını düzenleyici etkilere sahiptirler [152].

MKH’ler multipotent özellikleri ile yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon, ligament hücrelerine farklılaşabilirler [153] (Şekil 2.22). 1966’lı yıllarda kemik iliğinden elde edilen stromal hücrelerin kültür kabına yapışma özelliklerine göre hematopoetik hücrelerden ayrımı ile MKH dönemi başlamıştır [155]. 1982 yılında Friedenstein’in fetal buzağı serumu içeren kemik iliği kültürünün ortama yayılması sonrasında MKH’lerin kemik hücreleri, adipositler ve fibroblastlara benzeyen yapışkan hücre kolonilerine dönüştüğünü göstermiştir [156]. Sonraki çalışmalarda MKH’leri her üç germ yaprağından köken alan hücre ve/veya dokuları oluşturan bir multipotent kök hücre kaynağı olduğu kabul edilmiştir. Günümüzde MKH’ler vücut sıvıları dahil birçok doku ve organımızdan izole edilebilmektedir.



Şekil 2.22: Mezenkimal kök hücrelerin farklılaşabildiği dokular [154].

Uluslararası Hücresel Tedavi Birliği (The International Society for Cellular Therapy; ISCT) yayımlandığı kılavuzda MKH'lerin tanımlanması için 3 kriter önermiştir [157];

- 1) Plastik hücre kültür kabına yapışabilme özelliği,
- 2) İn vitro koşullarda adipojenik, osteojenik ve kondrojenik farklılaşabilme,
- 3) CD 73, CD 90 ve CD 105 belirteçlerini %95 in üzerinde ve CD14, CD34, CD45 ve HLA-DR belirteçlerini %2'den az oranda eksprese etmeleri.

MKH'lerin hayvanlarda ve insanlarda lenfositlerin çoğalmasını engelleyerek bağışıklık yanıtlarını düzenleyici etkileri olduğu bildirilmiştir. HLA özdeş HKH'lerle birlikte nakledildiklerinde akut ve kronik GVHD'nin (Graft Versus Host Disease; Konağın karşı vericinin hücrelerine karşı reaksiyonu) azalmasına neden olmuştur [158]. Son yıllarda, otolog olarak farklı kaynaklardan elde edilen MKH'ler kullanılarak kemik, kıkırdak ve kornea gibi üç boyutlu doku parçacıklarının üretilmesi gerçekleştirilmiş ve bu üretilen doku parçacıklarının (özellikle kemik ve kıkırdak) klinik denemeler kapsamında insanlarda uygulanmasına başlanmıştır [158].

2.3.4.2 Mezenkimal kök hücre kaynakları

MKH eldesi için ana kaynak sayılan kemik iliği günümüzde yerini adipöz dokuya bırakmaktadır. İnsanda ilk kez 2001 yılında Zuk ve ark. tarafından ayrıştırılarak tanımlanan AKKH'i, diğer yetişkin kök hücre kaynaklarıyla karşılaştırıldığında düşük verici morbiditesi ve yüksek oranda elde edilebilme özellikleri nedeni ile doku mühendisliği uygulamaları için uygun hücre kaynağı olarak görülmektedir [159].

Kemik iliği ve adipöz doku dışında birçok dokudan da MKH izole edilebilmektedir. 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 nedeni ile ayrıştırılarak çoğaltılabilmeleri mümkündür [158,161] (Tablo 2.10).

Tablo 2.10: Yetişkinde mezenkimal kök hücre kaynaklarına örnekler

Kemik iliği	Adiposit, astrosit, nöron, kardiyomiyosit, kondrosit, osteoblast, kas, hepatosit, endotel hücresi, stroma hücresi (fibroblast)
Kas dokusu	Adiposit, endotel hücresi, nöron, kondrosit, osteosit
Spongios kemik	Adiposit, kondrosit, osteoblast
Dermis	Adiposit, kondrosit, kas, osteoblast
Adipöz doku	Kondrosit, kas, osteoblast, stroma hücresi (fibroblast), endotel hücresi
Periosteum	Kondrosit, osteoblast
Perisit	Kondrosit, osteoblast
Periferik kan	Adiposit, fibroblast, osteoblast, osteoklast

MKHlerin, fibroblastoid morfoloji gösterme, çok yönlü farklılaşabilme ve bazı yüzey işaretleri taşımaları gibi özellikleri 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 [155].

Kemik iliği

Kemik iliği kaynaklı kök hücreler; hematopoetik, mezenkimal ve endotelyal prekürsör hücreler olmak üzere üç ana hücre grubundan oluşurlar. Hematopoetik kök hücreler 1960 yılında Till ve McCulloch'un yaptıkları çalışmada ortaya konulmuştur. Bu çalışmada ölümcül dozda radyasyona maruz bırakılan farelerin dalaklarındaki nodüllerin diğer deneklere aktarıldığı sırada görülmüştür [162].

Multipotent özellikte olan kemik iliği kaynaklı MKH'ler stromal yapıları sayesinde hematopoetik kök hücrelerin çoğalma ve farklılaşmasında yardımcı olurlar. MKH çalışmalarında uygulanan kemik iliği aspirasyonunda 1×10^6 mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arası değişen sayıda MKH elde edilebilmektedir [163].

Amniyotik sıvı

Ekstraembriyonik kaynaklar içerisinde doğum öncesi kök hücre elde edilebilen tek kaynak amniyon sıvısıdır. Amniyon sıvısı içerisinde fetal deri, gastrointestinal trakt epiteli ve solunum yolu hücreleri bulunmaktadır. Gebeliğin ilerleyen haftalarına göre sıvının hücre kompozisyonunda değişiklikler olmaktadır [164]. Amniyotik sıvıdan kök hücre izolasyonu 2003 yılında Anker PS tarafınca tanımlanmıştır [165].

Umblikal kord

Umblikal kord konusunda yapılan kök hücre çalışmalarında ilk bulunan hücreler hematopoetik kök hücrelerdir. Yapısal olarak embriyonik kök hücre ile erişkin kök hücre arasında bulunmaktadırlar. 2000 yılında Erices A ve ark. tarafınca yapılan çalışmada umblikal kordun MKH açısından zengin olduğu gösterilmiştir [166]. MKH eldesi için umblikal kordun kanından faydalanıldığı gibi Wharton jelinden de kök hücre elde etmek mümkündür [167].

Adipöz doku

Adipöz doku ya da yağ dokusu adipositlerden oluşmuş olan gevşek bağ dokusudur. Adipöz dokunun yağ formunda enerji depolaması, vücudun destek ve izolasyonunu sağlamak gibi görevleri vardır. Normal ağırlıktaki bir insanda, erkeklerde vücut ağırlığının %15-20'sini, kadınlarda ise vücut ağırlığının %20-25'ini yağ dokusu

oluşturmaktadır. Mezoderm kaynaklı olan yağ dokusunun bulunduğu konum ve fonksiyonlarına göre birkaç tipi bulunmaktadır. Bunlar; beyaz, kahverengi, mekanik, kemik iliği ve meme yağ dokusudur. Beyaz yağ dokusu hücreleri, sitoplazmalarının ortasında tek bir yağ damlacığı içerirler. Vücudun enerji kaynağı sağlarlar ve leptin, adiponektin, lipokalin gibi adipokin faktörler salgılayarak endokrin organ görevi yaparlar. Adipositlerden ve adipöz stromal hücrelerden açığa çıkan 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 oynadığı bilinmektedir. Multiloküler yağ dokusu (kahverengi yağ dokusu) hücrelerinin sitoplazmalarında ise çok sayıda lipid damlacığı ve kahverengi mitokondriyumlar mevcuttur [168]. Kahverengi yağ dokusu içerdiği organelleri sayesinde termoregülasyonu sağlar. Beyaz adipöz doku yağı depolarken kahverengi adipöz doku yağı yakar [169]. Mekanik adipöz doku avuç içi, göz çevresi gibi özelleşmiş bölgelerde destek görevi sağlarlar. Memedeki adipöz doku ise laktasyon sonrasında meme glandlarına destek ve enerji sağlar. Kemik iliğindeki adipöz doku ise hematopoetik kök hücre ve progenitör hücreler için düzenleyici sinyaller sağlamaktadır.

1966 yılında Rodbell adipöz dokuda, adipositler progenitör hücreler, fibroblastlar, kan ve endotel hücrelerinden oluşan heterojen 'stromal vasküler fraksiyonu'(SVF) tanımlamıştır [170]. SVF içerdiği kök hücre dışında çeşitli büyüme faktörleri sentezleme yeteneği olan preadiposit, adipoblast ve endotelyal hücreler de içermektedir. Zuk ve ark. yaptığı çalışmada adipöz dokunun mezenkimal hücrelerden oldukça zengin olduğunu göstermişlerdir [160]. Poznanski ve ark. yaptıkları çalışmada yağ dokusunun kök hücre bakımından oldukça zengin bir doku olduğunu göstermişlerdir [171]. Ayrıca adipöz doku santimetre küp başına kemik iliğine göre 100 ile 1000 kat daha fazla pluripotent hücre içermektedir [172-173].

Adipöz dokunun eldesi edilmesi cerrahi eksizyon veya liposuction ile yapılabilir. Kullanılan liposuction tekniğine bağlı olarak alınan SVF'nin içinde %2-10 arasında adipöz kaynaklı kök hücre bulunmaktadır. Cerrahi otörlerce kök hücre kaybının önlenmesine yönelik cerrahi eksizyon tekniğinin kullanılması ve lazer ya da ultrason

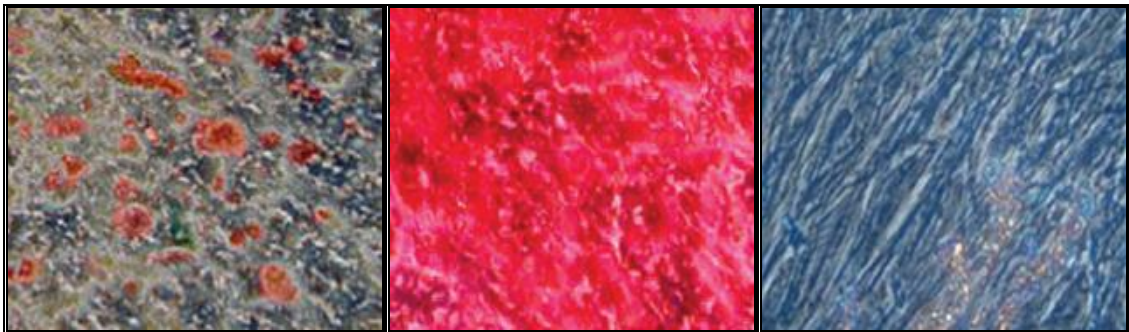
liposuction yönteminden uzak durulması önerilmektedir [174]. Toplanan dokulardan kök hücre eldesi için tanımlanmış protokoller mevcuttur. Bu yöntemlerde ortak olarak kollajenaz veya tripsin gibi enzimler ile hücreler arası bağlantıların koparılması ve santrifüj yöntemi ile hücreleri yoğunluklarına göre ayırma hedeflenmektedir [175].

AKKH'ler doğal sürecinde olgun adipositlere dönüşme eğilimindedirler ancak dış etkenlerin değişmesi durumunda farklı dokulara dönüşebilmektedir. Bu dönüşüm AKKH'lerin yüzey belirteçlerinin aktivasyonu ile gerçekleşmektedir (Tablo 2.11).

Tablo 2.11: AKKH'lerin yüzey belirteçleri ve görevleri [176]

Yüzey Belirteci	Görevi
CD29 (beta-1-integrin)	Anjiogenezis
İnterselüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1:CD54)	İmmunglobulin süper gen ailesi
CD44 (Hyaluronat reseptörü)	Ekstraselüler maktriks gelişimi
HLDR-, MHC class 1+	İmmün modülasyon, azalmış rejeksiyon
CD105, CD73, CD90 pozitifliği CD45, CD34 ve CD14 veya CD11b, CD79a veya CD19 negatifliği	Mezenkimal stromal hücre kriterleri

Multipotent yapıdaki AKKH'ler askorbat, betagliserofosfat, deksametazon ve vitamin D3 etkisinde osteojenik farklılaşmaya uğramaktadır [177]. AKKH hepatosit büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörü ile uyarılması durumunda hepatositlere dönüşüm gerçekleşmekte ve kök hücrelerin albümin ve diğer fraksiyonlarda protein ürettikleri gözlenmektedir [178]. Huang ve ark. tarafından 2004 yılında yapılan çalışmada TGFb1, askorbik asit, insülin ve transferin etkisi ile kondrojenik farklılaşma oluşturulmuştur [179] (Şekil 2.23).



Şekil 2.23: Adipojenik, Osteojenik ve Kondrojenik farklılaşma [180]

2.3.4.3 Mezenkimal kök hücrelerin fenotipik özellikleri

MKH'lerini diğer dokulardaki hücrelerden ayıran karakteristik özellikleri bulunmaktadır. Plastik ve cam gibi yüzeylere kolayca tutunabilmeleri MKH'lerin kültür petri kaplarına yapışmalarını kolaylaştırmaktadır. Bu nedenle in vitro kültürlerde izolasyonları kolaylaşmaktadır. Düşük yoğunluktaki kemik iliği mononükleer hücreleri "basal media" olarak adlandırılan fetal buzağı serumu (FBS) veya %10'luk fetal calf serumunda (FCS) 2-3 gün bekletildiklerinde petri kabının yüzeyinde kök hücreler görülmeye başlar. Petri kabına tutunmamış olan hücreler bu aşamada uzaklaştırılır ve hücreler birleşip bir tabaka oluşturana kadar FBS veya FCS eklenmeye devam edilir. MKH tripsin ile muamele edilip, ileri pasajlarla sayıları çoğaltıldıktan sonra toplanabilirler.

Kemik iliğindeki 1 milyon mononükleer hücreden 2-5 tanesi MKH'dir. Adipöz dokuda ise santimetre küp başına kemik iliğine göre 100 ile 1000 kat daha fazla pluripotent hücre bulunmaktadır [172]. MKH'lerin toplamının yaklaşık %10 kadarı hücre döngüsünün S, G2, M fazlarında proliferasyon olurken %90'ı G0/G1 fazında beklerler. Yapılacak olan indüksiyon ile daha fazla kök hücrenin aktivasyonu mümkün olabilmektedir. Aktive olan MKH'ler sitokin sentezleme özelliğine sahiptirler. Mikroskopik incelemede MKH'ler fibroblastoid, çubuk şeklinde gözlenmektedir. Hücreler, düşük yoğunluklarda kültür ortamında koloni oluşturmaya eğilim gösterirler. Yüksek hücre yoğunluğunda ise koloni oluşturmak yerine yan yana dizilmiş hücre grupları halinde çoğalmaktadırlar [181].

2.3.4.4 Mezenkimal kök hücrelerin dokularda gösterilmesi

Günümüzde MKH'lerin klinik olarak yararlı sonuçları olduğu bilinmektedir. Ancak bu hücrelerin verildikten sonraki durumu, hasarlı dokuya göçü, yerleşim özellikleri, orada çoğalmaları, farklılaşma özellikleri, kısacası hücrelerin infüzyonunu takiben son durumları hakkında yeterli çalışmalar bulunmamaktadır. Erişkin kök hücre çalışmalarının %80'den fazlası kemik iliği ya da hematopoetik kök hücrelerde gerçekleştirilmiştir.

Kök hücrelerin takip edilmesine yönelik farklı yöntemler bulunmaktadır. Hücrelerin yeşil floresan protein (GFP) ile transfekte edilmesi ve floresan hücrelerin dokularda takibi ise en çok uygulanan yöntemlerden biridir [182]. Genetik işaretleme kalıcı olması yönünden tercih edilen bir yöntemdir. Kısa süreli deneysel çalışmalarda carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE), 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) gibi floresan işaretlemeleler de kullanılabilir.

Vücuttaki her hücrenin yüzeyinde o hücreye özgü yüzey reseptörü bulunmaktadır. Bu durum kök hücrelerde de benzerdir. Bu sayıca az ve diğer hücreler benzer kök hücrelerin saptanması amacıyla kök hücre belirteçleri (marker) geliştirilmiştir. Bu yüzey reseptörlerinin floresan işaretlemelelerle işaretleme ardından sayılması işlemi; floresan yardımcı hücre sayımı (FACS) olarak ifade edilmekte ve böylece mevcut kök hücre sayısı belirlenebilmektedir [183]. Hücrelerin yüzeyinde yer alan, hücrede sinyal yolları üzerinde veya hücre yapışma molekülleri olarak rol oynayan bu belirteçlerden birçoğu kısaca “CD” (Farklılaşma Kümeleri=Clusters of Differentiation) olarak bir başlık altında toplanmış olup, hücre türüne göre çok özgün veya çok yaygın olarak bulunurlar [184].

Tablo 2.12: Kök hücre kaynakları ve CD markerları [185]

Kaynak	Kök hücre/Progenitör Markerlar
Hematopoetik kök hücreler	CD11a+ CD11b+ CD14+ CD34+ CD44hi CD45 + Ly6G C+ CD90 (Thy-1) CD117 (cKit+) CD164
Endothelial progenitör	CD34+
Embriyonik kök hücre	CD31+ CD146+
İndüklenmiş pluripotent kök hücre	CD31+ CD146+
Umbilikal kordondan türemiş myeloid progenitör hücreler	CD14+
Mezenkimal kök hücreler	CD29+ CD31- CD34- CD44+ CD45- CD73+ CD79+ CD90+ CD105+ CD 133+ CD140b+

2.3.4.5 Mezenkimal kök hücreler ve rejeneratif tıp

Rejeneratif tıp, teknolojik gelişmeler ile birlikte hızla önem kazanarak birçok araştırmacı ve bilim adamı için ilgi odağı haline gelmiştir. Günümüzde rejeneratif tıp alanında hastalıklı ve hasarlı organları yenileyici, kanser tedavisi hatta ölümsüzlük de dahil olmak üzere birçok konuda çalışmalar yapılmaktadır. Rejeneratif tıp temelinde kök hücre, büyüme faktörleri, hasar görmüş ve yaşlanmış hücrelerin onarılıp yerine yenilerinin koyularak veya mevcut dokunun rejenerasyonunu sağlayarak fonksiyonlarını iyileştirmeyi hedeflemektedir.

MKH'lerin 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 potansiyelinin gösterilmiş olmasıdır. Çeşitli araştırmalar bu hücrelerin in vitro koşullarda uygun uyaranlar ile osteojenik, dipojenik, kondrojenik, miyojenik farklılaşma kapasitelerinin olduğunu ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir [146]. Mezenkimal kök hücreler, in vitro ortamda kolaylıkla farklılaşmaya yönlendirilebilmektedir. Adipojenik, osteojenik, kondrojenik farklılaşma özelliklerinin in vitro ortamda 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 çalışmalarda gösterilmiştir [171-172].

Mezenkimal kök hücrelerin karakter kazanabilmesi için kök hücrenin kaynaklandığı dokudan uzaklaştırılması, hazırlanması ve elde edilmesini takiben uygun şartlarda kültüre edilerek istenilen hücre türüne farklılaştırılması ve sadece farklılaştıkları türdeki hücrelerin çoğaltılması gerekmektedir. İn vitro karakterizasyon işlemi için farklı protokoller mevcuttur (Tablo 2.13).

Farklılaşma çalışmalarında, MKH'lerin hedeflenen farklılaşmış hücrelere dönüşümünün gerçekleştiğini göstermek için histokimyasal, immünohistokimyasal veya immünfloresan yöntemler kullanılır. Mezenkimal kök hücrelerin, kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizilerine de farklılaşabilme niteliği, özellikle rejeneratif tıp ile ilgili alanlarda çok ilgi uyandırmış, bu konuda çok sayıda çalışma yapılmıştır. Kök

hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokulardan farklı dokulara dönüşebilme özelliğini tanımlamaktadır [186].

Tablo 2.13: MKH'lerin karakterizasyonunda kullanılan başlıca farklılaşma protokolleri [147]

Protokol	Medya	Serum	Uygulama
Adipojenik	DMEM	FBS(% 10)	0.5mM IBMX,1 mikroM deksametazon, 10 mikroM insülin, 200 mikroM indometazin, % 1 antibiyotik/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

(DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium, FBS: Fetal buzağı serumu, HS: İnsan serumu)

2.3.4.6 Mezenkimal kök hücrelerin klinik kullanımı

Kök hücreler son yıllarda yüzlerce yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Doku mühendisliğindeki kullanımlarına ve hücre bazlı tedavilere ek olarak farklı birçok sistemik ve lokal hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadırlar. Kanser hastalarının malign hücrelerine kemoterapötik ilaçların taşınmasını sağlayan genlerle modifiye edilmiş mezenkimal kök hücrelerle yapılmış başarılı çalışmalar mevcuttur.

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.

Endotelial progenitör hücre tedavisi ve terapötik vaskülogenezin plastik cerrahide çeşitli uygulamaları vardır. Son zamanlarda problemlilerde yeni damar

oluşumunu arttırmak için kök hücre nakilleri uygulanmaktadır [187] Endotelial progenitör hücreleri sisteme enjekte edildikten sonra seçici bir şekilde iskemik dokulara yerleşir, böylece bu hücreler iskemik flepleri kurtarmada önemli rol oynayabilir. Terapötik anjiyogenezin flep yaşayabilirliğini artırma, yara iyileşmesini geliştirme, doku çoğalmasını hızlandırma potansiyeli olup tek başına büyüme faktörlerinden daha çok, hasarlı hücreleri yenileyerek faydalı olmaktadır.

Kök hücrelerin terapötik anjiyogenezis yapıcı etkileri birçok çalışmada gösterilmesine rağmen flep cerrahisinde kullanımına ait ilk çalışma ise Ichioka ve ark. tarafından yapılmıştır [188]. Bu çalışmada, sıçanlarda kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin dorsal cilt fleplerindeki revaskülarizasyon üzerine etkisi araştırılmış ve kapiller dansitede iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı yönde belirgin artış tespit etmişlerdir. Mezenkimal hücrelerin vasküler endotelial hücrelere farklılaşma kabiliyetleri olduğu bilinmektedir. Zheng ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, VEGF-transduced mezenkimal kök hücrelerin iskemik fleplerde neovaskülarizasyonu arttırdığı gösterilmiştir [189].

Lu ve ark.'nın sıçanlarda yaptığı bir çalışmada AKKH'lerin random patternli cilt fleplerinin yaşayabilirliğini arttırdığını göstermişlerdir. Kemik iliği kökenli kök hücrelerin de sıçan cilt fleplerinde neovaskülarizasyonu arttırıp flep dolaşımına olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir [190]. Uysal Ç. ve ark. yaptığı çalışmada ise sıçan dorsal cilt fleplerinde oluşturulan iskemi reperfüzyon hasarının adipöz doku kökenli kök hücre uygulanması ve bir takım büyüme faktörlerinin regülasyonu sonucu iskemi reperfüzyon hasarının önlenebileceği gösterilmiştir [191].

Kemik iliği kaynaklı MKH'lerinin de novo miyokard oluşturduğu gösterilmiştir. Yapılan çalışmalarda miyokard enfarktüsü ve koroner arter hastalıklarında intrakoroner kök hücre infüzyonunun, kalp kası rejenerasyonunda oldukça etkili olduğu bildirilmiştir [192]. Oftalmolojide de araştırmacılar hasar görmüş göze korneal kök hücre transplante ederek tekrar görmeyi sağlamışlardır [193]. Aynı hücrelerin başka uyaranlarla nöral hücre serisine de dönüşebildikleri gözlenmiş ve ALS gibi hastalıklarda spinal kordaki

hasarlı bölgeye verilen kök hücrelerin ablatif sinir hücrelerini rejenere ettiği ve sonuçta lökomotor fonksiyonun geri kazanıldığı gösterilmiştir [194].

Osteopeni ve osteoporoz gibi birçok insanı etkileyen hastalıkları tedavi etmek için çalışmalar yapılmaktadır. Bu konuda kemik onarımına yönelik farmakolojik, gen ve hücre tedavileri denenmektedir. Osteoblast farklılaşması iskelet dokusunun oluşması ve kemik şekillenmesinde önemli bir aşamadır [195]. MKH'lerin in vitro osteojenik potansiyelinin gösterilmesini takiben MKH'lerin skafold ve biyomateryellere eklenmesi ile defektlerin onarımına yönelik önemli çalışmalar yapılmıştır. Bu biyomateryallerden en dikkat çekici olanları atelokollajen, hidroksiapatit trikalsiyom fosfatdır [196].

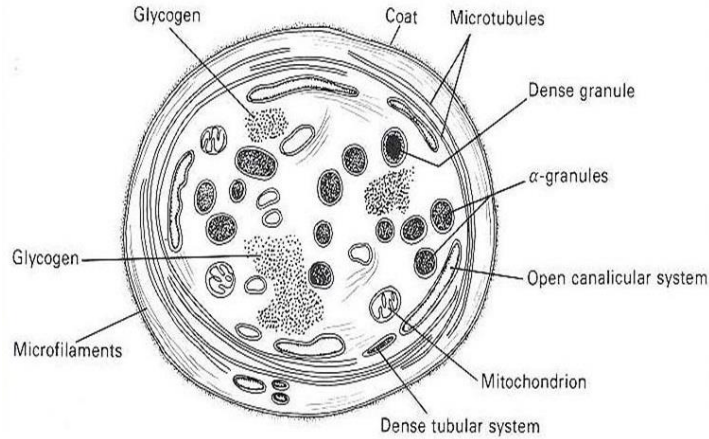
Kemik defekti onarımına yönelik bir çalışmada AKKH ile kalvarial kemik defekti onarımı araştırılmıştır. Sıçanda deneysel yarık damak modelinde poliaktik asit skafolda AKKH emdirilerek defekte uygulanmış ve defekt kapatılmıştır. Kök hücre uygulanmayan skafoldda defekt açık kalmıştır [197].

Literatürde MKH'ler ile yumuşak doku onarımları [198], kırık onarımı [199], yara iyileşmesi [200], neovaskülarizasyon [201], sinir onarımı [202], gibi farklı konularda başarılı uygulama sonuçları bildirilmiştir.

2.4 TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA

2.4.1 Trombositlere genel bakış

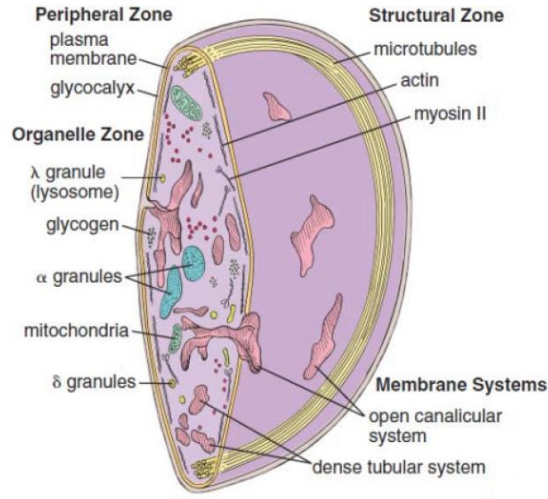
Trombositler 2-4 μm çapında, disk şeklinde, mitokondri ve mRNA içermesine rağmen çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Kemik iliğinde megakaryositlerin sitoplazmalarından koparak meydana gelirler. Bir megakaryositte ortalama 2000-7000 trombosit oluşmaktadır. Mikrolitrede (μl) ortalama 200000-400000 trombosit bulunmaktadır. Kanda çekirdeksiz olarak 7-10 gün yaşarlar. Yapısal olarak çekirdekleri yoktur ancak mitokondri, mikrotübül ve granüller (α , δ ve λ) içerirler (Şekil 2.24). Her trombositte ortalama 50-80 granül bulunmaktadır. Bu granüller yapılarında 30'dan fazla protein bulundururlar. Aktive olan trombositlerde bu içerik salınır. Yapılan çalışmalarda yaklaşık trombositlerde yaklaşık 1000'den fazla protein tipi bulunmuştur [204]. Dolaşımdaki trombositlerin büyük kısmı aktive olmadan retiküloendotelial sistem tarafından temizlenirler. Trombositlerin aktive olması durumunda içerdikleri birçok protein ve büyüme faktörlerini ortama salgırlar. Trombositler, hemostazis, hücre membranı adherensi, agregasyon, pıhtı oluşumu ve anjiogeneziste rol oynarlar [205].



Şekil 2.24: Trombositlerin ultrastrüktürel yapısı [203]

Periferik yaymada küme şeklinde görülen trombositler tek olarak incelendiğinde periferik bölgelerinde açık mavi boyanan hyalomer ve merkezinde mor granül içeren granülomer gözlenmektedir. Bu parçacıklar trombosit plazma membranına bağlanan açık kanalikuler bir sistem içermektedir [206]. Trombositlerin periferinde trombosit disk şeklini veren demet şeklinde mikrotübüller bulunmaktadır. Hyalomer bölgesinde, tübüler sistem olarak bilinen elektrondan yoğun düzensiz tüpler bulunur. Hyalomer

içerisindeki mikroflamanlar aktin filamanları sayesinde trombositte hareket sağlar ve agregasyon sırasında filopodların ve yüzey uzantılarının uzatılmasını sağlamaktadır (Şekil 2.25). Yapısal olarak trombositler, organizasyon ve fonksiyonlarına göre 4 bölgede incelenebilir. Bunlar; periferel bölge, membran bölge, yapısal bölge, organel bölgesidir.



Şekil 2.25: Trombositlerin bölgesel incelemesi [207]

1- Periferel bölge: Hücre yüzeyi glikoprotein, GAG ve plazmadan absorbe edilmiş pıhtılaşma faktörlerini içeren glikokaliks ile kaplanmış hücre membranından oluşmaktadır. Trombosit fonksiyonları için reseptör görevi gören integral membran proteinleri bulunmaktadır.

2- Membran bölge: Açık kanaliküler sistem (AKS) ve yoğun tübüler sistem (YTS) olmak üzere iki çeşit kanaliküler sistemden oluşmaktadır. AKS, megakaryosit sitoplazmasının bölünmeye katılmamış olan trombosit demarkasyon kanallarının gelişimsel kalıntısıdır. YTS ise megakaryositlerin ER'lerinden köken alan elektrondan yoğun materyal içermektedir. Ayrıca kalsiyum deposu olarak fonksiyon gösterirler. YTS kanallarının trombosit yüzeyi ile bağlantısı bulunmamaktadır.

3- Yapısal bölge: Mikrotübülleri, aktin filamanlarını, miyozin, aktin bağlayan proteinleri içerir ve plazma membranını destekleyen ağ yapısı gösterir. Her aktin filaman ağının altında trombositlerin disk şeklini sağlayan 8-24 adet mikrotübül demeti bulunur.

4- Organel bölge: Trombositlerin merkezini oluşturur. Mitokondri, peroksizomları, glikojen partiküllerini ve granülleri içerir (α , δ ve λ).

Alfa granülleri: 300-500 nm çapında fibrinojen, TDGF ve diğer trombosit ilişkili proteinleri içermektedir. Alfa granüllerin hemostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein içerirler.

Delta granüller (yoğun cisimler): 250-300 nm çapında kalsiyum, pirofosfat, ADP ve ATP gibi enerji moleküllerini içerirler. Bu granüller ayrıca serotonin depolamada görevlidirler.

Lambda granülleri: 175-250 nm çapında lizozomal enzimleri içerir. Bakterisidal etkisi olan glikozidaz, proteaz gibi proteinleri içerirler. Pıhtının rezorpsiyon fazında görevlidirler.

Tablo 2.14: Trombosit yapısındaki granüllerin içerikleri [208]

Dens Granül ‘Pro-agregan moleküller’	Alfa Granül ‘Adezyon ve yenilenme molekülleri’	Lizozomlar ‘Temizlik molekülleri’
<p>Nükleotidler: Adenin: ATP, ADP Guanin: GTP, GDP</p> <p>Aminler: Serotonin (5-HT) Histamin</p> <p>Bivalan katyonlar: Kalsiyum Magnezyum Pirofosfat</p>	<p>Proteoglikanlar: Trombosit özgül: βTG, PF4 Serglisin, HRGP PBP, CTAP-III, NAP-2</p> <p>Adezif glikoproteinler: Fibronektin, Vitronektin, Thrombospondin, vWF</p> <p>Hemostaz ile ilgili faktör ve kofaktörler: Fibronektin, Faktör V, VII, XI, XIII Kininojenler, Plazminojen, Protein S</p> <p>Hüresel mitojenler: PDGF, TGFβ, ECGF, EGF, VEGF, IGF, İnterlökin-β</p> <p>Proteaz inhibitörleri: α2 makroglobülin, α2-antitripsin</p> <p>Diğer: İmmünglobülinler: IgG, IgA, IgM Albümin, GPIa/Multimerin</p>	<p>Asit proteazlar: Katepsin D, E Karboksipeptidaz A, B Kollajenaz Asit fosfataz Arilsülfataz</p> <p>Glikohidrolazlar: Heparinaz N-asetil-glukozaminidaz β-glukronidaz β galaktozidaz β-gliserofosfataz Glukozisaz Fukozikaz Arabinozidaz Mannoizidaz</p>

2.4.2 Trombosit fonksiyonları

Trombositler hemostazda önemli rollere sahiptir. Trombositler damar bütünlüğünü kontrol ederler ve damar duvarı hasarında açığa çıkan bağ doku, trombosit adezyonunu uyarır. Bunun sonucu primer agregasyon meydana gelerek defektli alanda trombosit tıkaçı oluşur. Tıkaç içindeki trombositlerin alfa ve delta granüllerinden salgılanan serotonin, ADP ve Tromboksan A₂ sekonder agregasyonu gerçekleştirir. Serotonin yaralı bölgedeki damar düz kaslarını kasarak kan akışını yavaşlatır. Tromboksan A₂ ve ADP primer hemostatik tıkaç oluşumunda görev yapar. Trombosit üzerindeki glikokaliksler plazmada çözünür halde bulunan fibrinojeni fibrine çevirir. Fibrin başlangıç aşamasında pıhtı için gevşek bir ağ oluşturur. Bu ağ içinde trombositler ve kırmızı kan hücreleri hapsolür. Trombosit tıkaç zaman içinde hemostatik tıkaç şekline dönüşür. Pıhtı oluşumu tamamlandıktan sonra trombositlerde bulunan aktin ve miyozin pıhtının kontraksiyonunu sağlayarak normal kan akışına olanak sağlar. Pıhtı görevini tamamladığında inaktif plazminojen endotel tarafından salgılanan plazminojen aktivatörü tarafından aktif plazmine çevirilerek pıhtının erimesine neden olur [209].

2.4.3 Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri

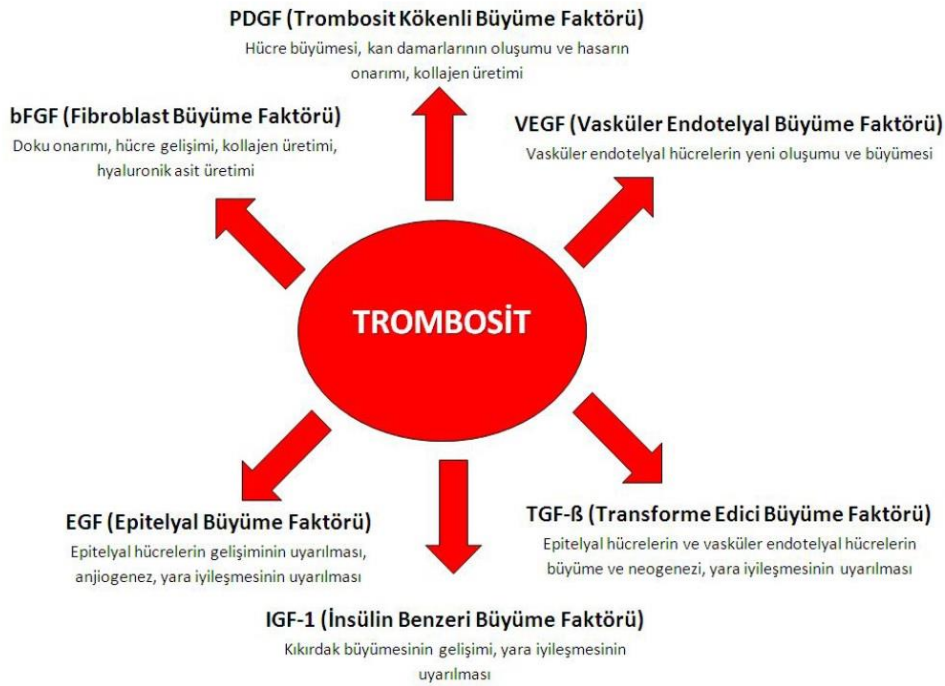
Trombositleri alfa granüllerinin yapılarında bulunan büyüme faktörlerini sekresyon fazında ortama salgırlar ve ortamda mevcut olan büyüme faktörleri hasarlı dokuda iyileşmeyi tetikler. Bu büyüme faktörleri; PDGF, FGF, VEGF, EGF, TGF- β , IGF-1'dir (Şekil 2.26).

2.4.3.1 Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF):

30.000 dalton ağırlığında, A ve B zincirleri olarak adlandırılan disülfid kaplı 2 polipeptid zincirden oluşan bir moleküldür. Bu zincirler farklı genler tarafından kodlanmıştır. Hem homodimer (PDGF-AA, PDGF-BB) hem de heterodimer (PDGF-AB) formları bulunmaktadır. Daha sonradan keşfedilen formlarında PDGF-CC ve PDGF-DD aktif büyüme fonksiyonu için ekstrasellüler proteolitik yarıklanma (klivaj) gerekmektedir [211]. PDGF'ler trombositlerin alfa granüllerinden kaynaklanmaktadır ancak monosit, makrofaj, fibroblastlar ve endotelial hücreler gibi farklı hücre ve dokulardan da izole edilmişlerdir. PDGF mezenkimal kaynaklı fibroblast, glial hücre,

düz kas ve kemik hücrelerinin çoğalmasını arttırmaktadır. PDGF hücre çoğalmasında yeterlilik faktörüdür ve IGF'ler gibi ilerletme faktörleri ile sinerjik etki gösterir. PDGF mitojenik ve kemotaktik aktivite göstererek bağ dokusu büyümesini, protein sentezini stimüle ederek yara iyileşmesinde önemli rol oynar [212].

PDGF'ler yara iyileşmesinde kilit rolü olan büyüme faktörleridir. Başlıca fonksiyonları bağ doku ve kemik iyileşmesinde hücrelerin mitogenezi uyarıdır [213]. Osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasını ve kemik kollajen sentezini uyarırken osteoklast sayısını artırarak kemik rezorpsiyonunun uyarırlar ve kemikte remodeling fazını hızlandırır ayrıca anjiogenezisi uyararak neovaskülerizasyona neden olurlar [212]. Osteoblastların hücre bölünmesini ve kemotaksisini stimüle ederler [214].



Şekil 2.26: Trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin görevleri [210]

2.4.3.2 Fibroblast büyüme faktörü (FGF):

FGF, asidik FGF (aFGF veya FGF-1) ve bazik FGF (bFGF veya FGF-2) gibi 20'den fazla büyüme faktörünü içeren bir aileden oluşmaktadır. FGF'ler sinyalini 4 adet tirozin kinaz reseptörü aracılığı ile iletirler (FGFR 1-4). FGF-1 her çeşit reseptöre bağlanabilirken FGF-7 bağlanabilmek için keratinosit büyüme faktörüne (KGF-7)

ihtiyaç duymaktadır. Salınan FGF'lere ekstrasellüler matrikste heparan süfat bağlanır ve inaktif hale gelen FGF büyüme faktörü rezervi olarak saklanır.

FGF-2 ve KGF-7 yara tamirinde görev alarak epitelizasyona yardımcı olur. FGF-2 anjiogenezise önemli katkılarda bulunur. FGF'ler kan hücrelerinin farklılaşmasında ve yeni kemik iliği stroması oluşumunda görevlidirler. Ayrıca iskelet ve kardiyak kasların gelişimi, akciğer olgunlaşması ve karaciğerin endodermal hücrelerden özelleşmesinde rol oynamaktadır [215].

2.4.3.3 Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF):

VEGF ailesi homodimerik proteinleri içeren VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D ve PlGF gibi faktörler içermektedir. Bu faktörler önemli bir anjiogenez mediatörüdür ve neovaskülarizasyon esnasında regülatör özelliktedirler. VEGF'nin anjiogenik aktivitesi sayesinde kemik rejenerasyonu üzerinde olumlu etkileri bulunmaktadır [216]. Yara bölgesinde meydana gelen hipoksi VEGF'nin en önemli uyarandır. Uyarılmış olan faktörler, fibroblast, inflamatuvar ve endotelial hücre proliferasyonunu ve migrasyonunu hızlandırır ve vasküler geçirgenliği artırır [217].

2.4.3.4 Epidermal büyüme faktörü (EGF):

Epidermal büyüme faktörü tek zincirli 53 aminoasit içeren bir proteindir ve yapısal olarak TGF- α ile benzer yapıdadır ve aynı reseptöre tutunurlar. EGF'nin asıl kaynağı üriner doku ve tükürük bezleridir. Ayrıca serebrospinal ve amniyotik sıvılardan izole edilebilmektedir. EGF, epitelyum, endotel ve mezodermal kaynaklı hücrelerin DNA sentezini artırarak hücre büyümesini uyarırlar. Etkileri deri ve müköz membranların bazal hücreleri ile sınırlıdır. Bazal membranın spesifik bileşenlerini oluşturmak için bu bazal hücrelerin uyarılması, replikasyonu ve migrasyonunu indüklerler [218].

2.4.3.5 Transforme edici büyüme faktörü (TGF- β):

TGF- β fonksiyonel olarak BMP, aktivin, inhibin, müllerian inhibiting substance gibi geniş fonksiyonlara sahiptir. TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere 3 izoform içeren, 30 üyeden oluşan üst aileye üyedir. TGF- β 1 en geniş dağılıma sahip olanıdır.

TGF'ler trombositler, endotel hücreleri, lenfositler ve makrofajlar gibi birçok hücre tarafından üretilen homodimerik proteindir. Hücre replikasyonu ve farklılaşması için majör düzenleyici olan TGF- β , çift fonksiyonlu ve pleotropik yapıdadır. Bağlandığı reseptöre göre hücre büyümesini uyarır ya da inhibe eder. Genel olarak tüm hücre tiplerinin matriks sentezini artırır ve kemik matriks depozisyonunu uyarır. TGF- β 'nın kemik hücre proliferasyonunda, hücrelerin farklılaşma durumu, kültür koşulları ve konsantrasyonuna bağlı olarak artış ve azalmaya neden olabildiği gösterilmiştir. İn vitro olarak kemik yakınına enjekte edildiğinde, yeni kıkırdak ve kemik oluşumunu arttırdığı ancak kemik alanının uzağına enjekte edildiğinde yeni kemik oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [219].

TGF- β 1 ve TGF- β 2'nin hücre replikasyonu ve matriks sentezini uyardığı gösterilmiştir. Osteogeneziste osteoblastların çoğalmasını uyararak kemik kollajen üretimini doğrudan attırırlar. Yara iyileşmesi, immun yanıtın düzenlemesi, enflamasyon regülasyonu ve embriyogeneziste rolleri bulunmaktadır [214].

2.4.3.6 İnsulin benzeri büyüme faktörü (IGF-1):

İnsulin benzeri büyüme faktörleri tümör hücreleri dahil birçok hücrenin farklılaşması ve çoğalması için pozitif düzenleyici ajanlardır. Hücre koruyucu özellikte olan sitokinler hücreler için çoğalma mediatörleri olmakla beraber hücre apoptozisini de düzenleyici etkiye sahiptirler [220].

IGF üreten ve bu faktörlere duyarlı olan kemik hücreleri, inaktif formdaki IGF'ler için depo görevi görür. RNA sentezi ve iletimi etkinliğinde artış ve protein yıkımında azalma gibi pleotropik etkilere sahiptir. Fibroblast kökenli dokuların rejenerasyonunda ilerleyici faktör olarak rol alırlar. Kemik hücrelerinde IGF'ler preosteoblastların hem proliferasyonu hem de tip I kollajen sentezi ile birlikte osteoblastlara farklılaşmayı uyarırlar. Böylece sentezlenen kemikteki hücre sayısı ve her bir hücrede depolanan ekstrasellüler matriks miktarını arttıırırlar [219].

2.4.4 Trombositten zengin ürünler

“Trombositten zengin plazma” terimi ilk olarak 1954 yılında Kingley tarafından kullanılmıştır [221]. Kingley çalışmasında trombosit konsantrelerinin kan pıhtılaşmasındaki önemini belirterek günümüzün kan transfüzyonu bilimine katkıda bulunmuştur. 1970 yılında Matras ve ark. fibrin yapıştırıcı ile ilgili ilk yayını yaptıktan birkaç yıl sonra otolog bir karışım olan ‘trombosit-fibrinojen-trombin’ karışımı oftalmoloji, genel cerrahi ve nöroşirürjide kullanılmaya başlamıştır [222]. 1986 yılında Knighton trombosit konsantrelerinin, klinik yara iyileşmesini stimüle ettiğini bildirerek iki basamaklı santrifüj işlemi ile elde ettiği ürünü kronik ülser hastalarının tedavisinde kullanmıştır [223]. Tam olarak trombositten zengin plazma (PRP) teriminin kullanılması 1998 yılında Marx ve ark. tarafınca maksillofasiyal kemik grefti rekonstrüksiyonunda TZP ürünlerinin kullanılması ile gerçekleşmiştir [224].

Trombosit konsantrelerinin hazırlanmasında farklı yöntemler mevcuttur. Kullanılan yöntem farklılığı elde edilen trombosit konsantrelerinin içeriğini de etkilemektedir. Trombosit konsantreleri temel olarak Trombositten zengin plazma ve trombositten zengin fibrin olarak 2 sınıfta incelenebilir.

2.4.4.1 Trombositten zengin plazma (TZP)

TZP, kısaca küçük hacimdeki plazma içine sıkıştırılmış otolog trombosit konsantrisi olarak tanımlanabilir. TZP içerisinde yüksek seviyede trombosit, büyüme faktörleri ve pıhtılaşma faktörleri bulunmaktadır [225]. İşlenmemiş pıhtı bünyesinde %94 kırmızı kan hücreleri, %5 trombosit ve %1 beyaz küre hücreleri bulunmaktadır. TZP tarafından oluşturulan pıhtıda ise bu oran %94 trombosit, %5 kırmızı kan hücreleri ve %1 beyaz kan hücreleri olarak değişir [226].

TZP'nin çeşitli klinik kullanım şekilleri mevcuttur. TZP direk lezyon bölgesine enjekte edilerek, içerisine kalsiyum eklenerek jelleştirildikten sonra başka hücreler için taşıyıcı olarak ya da greft materyelleri ile karıştırılarak kullanılabilir [227]. TZP'nin etkinliğini kaybetmeden 8 saat içerisinde uygulanması önerilmektedir fakat ilk 1 saatte büyüme faktörlerinin %95'i salınır bu nedenle en hızlı şekilde kullanımı önerilmektedir. Etkinliği uygulanan bölgede 7 güne kadar devam etmektedir [228].

Büyüme faktörlerince zengin olan TZP, mitogenezis, makrofaj aktivasyonu ve anjiogenezis üzerine ilk olarak PDGF etki göstermektedir. Ayrıca TZP içerisinde yüksek konsantrasyonda bulunan TGF'nin bağ dokusu ve kemik yenilenmesi ile hücrel aktiviteyi arttırarak kemik ve yumuşak doku iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir. Arıkan ve ark. 2007 de yaptığı çalışmasında, kemik grefti materyelleri ile TZP uygulamalarının erken kemik rejenerasyonu ve yumuşak doku iyileşmesine öncülük ettiği gibi, matür trabeküler kemik yoğunluğunu da %15-30 oranında attırdığını göstermektedir [229].

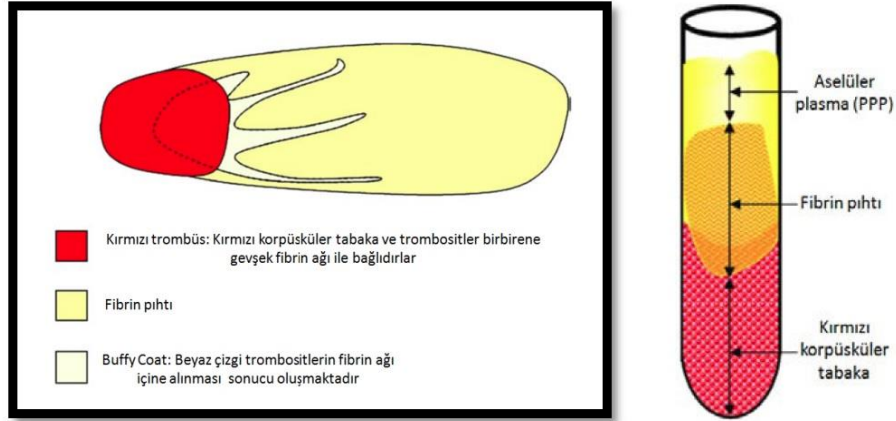
TZP ayrıca makrofaj hücrelerinin aktivasyonunu sağlayarak defans mekanizmasının harekete geçmesini, içerdiği lökositler ve lökositlerden salgılanan interlökinler sayesinde spesifik olmayan immün cevabın oluşmasını sağlamaktadır. 2010 yılında Kathleen ve ark. tarafınca yapılan çalışmada TZP'nin Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Candida albicans ve Cryptococcus neoformans gibi bakterilere karşı antimikrobial özellik taşıdığı ve konak dokuda bu etkinliğin sürdüğü gösterilmiştir [230].

TZP klinikte birçok alanda kullanım bulmaktadır. Bunların başlıcaları; oral-maksillofasiyal cerrahi, baş-boyun cerrahisi, otolaringoloji, kardiyovasküler cerrahi, ortopedi, oftalmoloji, yanık tedavisi, yumuşak doku lezyonlarının tedavisi ve plastik cerrahi pratik uygulamalarıdır [225-230].

2.4.4.2 Trombositten zengin fibrin (TZF)

TZF protokolü ilk defa 2001 yılında Choukroun ve ark. tarafından tariflenmiştir [220]. TZF trombosit ve büyüme faktörlerinden zengin bir membran elde etmeyi sağlayan bir trombosit konsantratıdır. Protokol tıbbi bir alete veya özelleşmiş bir makinaya ihtiyaç duymamaktadır. Uygulamada venöz kan kuru cam tüplere toplanır ve düşük hızda santrifüj edilir [3000 rpm-10 dk veya 2700 rpm- 12 dk]. PRF'de kana herhangi bir antikoagülan verilmediği için kan tüpe temas eder etmez pıhtılaşma başlar (Şekil 2.27). Yavaş santrifüj etkisi altında fibrin ağ 3 boyutlu yapı kazanarak sitokin ve hücre göçüne izin verir [231]. TZP'den farklı olarak TZF uygulamadan sonra hemen çözünmez ve doğal kan pıhtısına benzer şekilde yavaşça şekillenir. Bu süreç sırasında

trombositler aktive olur ve bu da fibrin matrikste trombosit ve lökosit büyüme faktörlerinin absorbe olmasını sağlar [220]. Bu otolog materyel maksillofasiyal cerrahi ve implant cerrahisinde kullanım alanı bulmaktadır.



Şekil 2.27: PRF katmanlarının şematik görünümü [232]

2.4.5 Trombositten zengin plazma ve kemik iyileşmesi

Günlük kullanımı son dönemlerde artan TZP; otojen, ksenojen, allojen greft materyelleri ile karıştırılarak kullanılmaktadır. TZP salgıladığı büyüme faktörleri sayesinde, greft materyalinin integrasyonunu sağlamaktadır. Yapılan deneysel ve klinik çalışmalarda TZP ile kemik greftinin kombine kullanılmasının osteogenezisi ve kemik formasyonu kalitesini arttırıldığı bildirilmiştir [232].

Kemik rejenerasyon hızı insanlarda 1.0-1.5mm/gündür. İnsan ortalamasına en yakın hayvan olan domuzlarda ise 1.2-1.5mm/gündür. Hakimi ve ark.'nın 2009 yılında domuzlar üzerinde yaptığı bir çalışmada TZP ile kombine greftleme yapılan defektin kortikal kısmının %55.9 unun, sadece kemik grefti kullanılan kortikal defektin ise %39.3 ünün 6 hafta sonra yapılan histomorfometrik analiz sonucu yeni kemik dokusu ile dolduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak TZP ile kombine olarak greftlenen olgularda kemik rejenerasyon miktarı TZP kullanılmayan olgulara oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunmuştur [233].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

DA16/42 proje numaralı deneysel çalışma, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 03/10/2016 tarih ve 16/43 sayılı izni ile uygun görülmesini takiben deneye başlandı. Denekler Başkent Üniversitesi Üretim ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi. Çalışmada sayısı biyoistatistik ön değerlendirilme ile tespit edilmiş, ağırlıkları 350 ile 450 gr arasında değişen, 62 adet Sprague Dawley cinsi sağlıklı erkek sıçan kullanıldı. Deney Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Ünitesi Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmada; Kronik böbrek hastalığı olan sıçanlarda adipöz kökenli stromal vasküler fraksiyonun ve trombosit zengin plazmanın kemikte yara iyileşmesi üzerine etkileri araştırıldı.

3.1 Deney hayvanlarının gruplandırılması

Cerrahi işlemler sırasında kullanılan 62 sıçan, Grup I (n:12), Grup II (n:12), Grup III (n:12), Grup IV (n:16) olmak üzere dört gruba ayrıldı. 10 sıçan MKH ve TZP eldesi için kullanıldı. Gruplardaki tüm sıçanlara kemik kırığı uygulandı. Grup I hariç diğer gruplara KBH modeli uygulandı. III. Grup sıçanlarına kemik kırığı bölgesine sadece TZP verildi. IV. Grup sıçanlarının kemik kırığı bölgesine TZP ve SVF tedavisi uygulandı (Tablo 3.1)

Grup I (n:12): Sağlıklı kontrol grubu

Grup II (n:12): KBH'lı kontrol grubu

Grup III (n:12): KBH'lı TZP grubu

Grup IV (n:16): KBH'lı TZP + SVF grubu

Tablo 3.1: Deneysel çalışmanın zaman/yöntem özeti

Grup I -----6. hafta --- kemik kırığı + kırık fiksasyonu -----	12.hafta
Grup II -----Nefrektomi ---6. hafta --- kemik kırığı + kırık fiksasyonu -----	12. hafta
Grup III -----Nefrektomi----6. hafta --- kemik kırığı + kırık fiksasyonu + TZP-----	12. hafta
Grup IV -----Nefrektomi----6. hafta --- kemik kırığı + kırık fiksasyonu + TZP + SVF---	12. hafta

3.2 Deney hayvanlarının bakımı

Tüm deney hayvanlarına, 12 saat karanlık, 12 saat aydınlık olacak şekilde standart oda koşulları sağlandı. Oda ısısı 18-20 °C arasında tutuldu. Sıçanlar yem ve musluk suyu ile beslendi. Operasyondan önce hayvanlara 24 saat açlık uygulandı. Hipotermi oluşmasını engellemek için sıçanlar ışık kaynağı altında ameliyat edildi ve uyanma esnasında da vücut ısıtması uygulamaya devam edildi.

Tüm sıçanların kuyrukları gruplarını ve hangi hayvan olduğunu belirtecek şekilde numaralandı. Sıçanlar kafeslere dörderli dağıtıldılar. Tüm hayvanlara cerrahi sonrası dönemde cilt altı 0.02 mg/kg fentanil (Sufenta 5 mcg, Janssen Cilag inc.) ile analjezi uygulandı. Çalışma sonunda tüm sıçanlar, periton içine 150 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc) enjekte edilerek sakrifiye edildi.

3.3 Deneyde kullanılan malzemeler

Kullanılan alet, malzeme, farmakolojik ve kimyasal ajanlar, Tablo 3.2 ve 3.3 ve 3.4'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Anestezi ve cerrahide kullanılan farmakolojik maddeler.

Kullanılan Farmakolojik Maddeler	Uygulama Yolu	Uygulama Dozu- Amacı
Ketamin hidroklorür	Periton içi	40mg/kg – Anestezi
Ksilazin hidroklorür	Periton içi	5 mg/kg- Anestezi
Fentanil	Subkutan	0.02 mg/kg- Analjezik
Povidon-iodür (%10)	Haricen	Antisepsi
Pyedif BG deri spreyi	Haricen	Antisepsi (1 kez)

Tablo 3.3: SVF eldesi sırasında kullanılan kimyasal maddeler (* Gibco-invitrogen, ** Santa Cruz, inc.)

SVF elde edilmesinde gerekli kimyasallar	Uygulama amacı
Fetal buzağı serumu (PBS)*	Kök hücre eldesi
Fosfat tamponlu serum fizyolojik (PBS)*	Yıkama, PH dengeleme
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)*	Kök hücre eldesi
Kollajenaz, Tip 1*	Hücrelerin birbirinden ayrıştırılması
1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI)**	Kök hücrelerin işaretlenmesi

Tablo 3.4: Deneysel çalışma sırasında kullanılan malzemeler

Kullanılan Malzemeler	
Tartı	21G enjektör ucu (Yeşil iğne)
Enjektör 5-10-60 ml	Santrifüj cihazı
İnsulin enjektörü (1 ml)	50 ml konik santrifüj tüpü
22G damaryolu	Serolojik pipet
22G kelebek set	Thoma lamı ve lamel
Tıraş makinesi	Işık mikroskobu
Cetvel	Petri kabı
Çizim kalemi	200 µm'lik hücre süzgeci
Steril eldiven	Vakumlu boş biyokimya tüpü
Steril örtüm seti	Silikon yaprak
Steril gazlı bez	Dremel 3000 Tur motoru
Beyaz tıbbi flaster	Elmas matkap ucu
11 ve 15 numara bistüri	Zımpara kağıdı
Adson penset	İpek dikiş (4/0, 3/0 keskin iğneli)
Steven's doku makası	Vicryl dikiş (6/0, 3/0, yuvarlak iğneli)
Portegu	Periost elevatörü
Bipolar koter cihazı	

3.4 Kırık modeli ve cerrahi işlemler

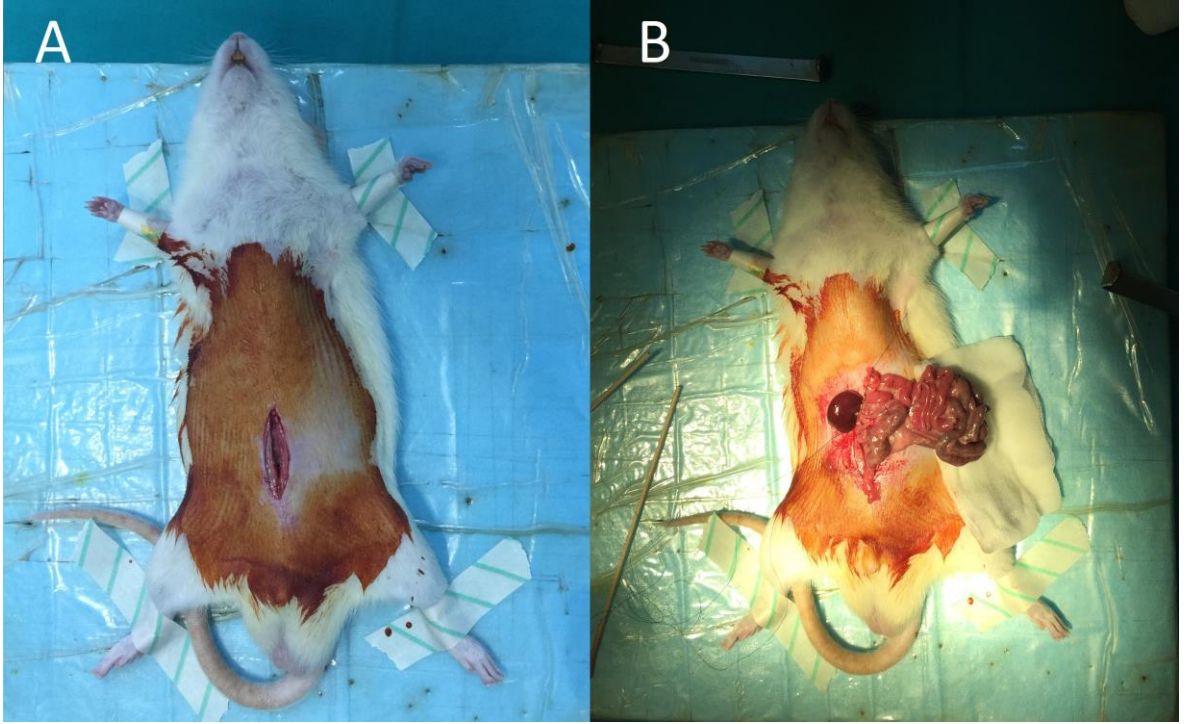
Deneysel araştırma başlamadan önce, tasarlanmış olan çalışma planı 4 sıçan üzerinde pilot çalışma yapılarak denendi. Böylece operasyon tekniği ve deney planında iyileştirme uygulandı. Operatif tekniğin detayları aşağıda anlatılmıştır.

3.4.1 Kronik böbrek hastalığının oluşturulması (5/6 Nefrektomi)

Çalışmadaki II, III. ve IV. Gruptaki sıçanlara 2013 yılında Seth ve ark.'ın tanımladıkları tek seanslı 5/6 nefrektomi modeli uygulandı [234]. Cerrahi öncesi deney hayvanlarına, periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc), 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer inc) uygulanarak anestezi verildi. Anestezi derinliği ekstremitte çekme yanıtı ile değerlendirildi. Anestezinin idamesi için başlangıç dozunun yarısı ile devam edildi. Anestezi prosedürünün başlamasını takiben ameliyat alanları elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi. Deney hayvanları dört ekstremiteleri

flaster ile supine pozisyonda tespit edildi. Ameliyat alanı %10 povidon-iodin (Baticon antiseptik solüsyon, Adeka, ltd) ile temizlendi ve cerrahi süresince sterilite koşulları sağlandı.

Morbiditenin azaltılmasına yönelik iki taraflı lomber kesi yerine vertikal planda abdominal kesi tercih edildi. Ksifoid çıkıntısı ve suprapubik bölge arasında 4 cm uzunluğunda kesi yapıldı (Şekil 3.1A). Cilt kesisini takiben her iki rektus abdominis kası arasından girildi. Rektus kılıfı ve periton geçildikten sonra sağ nefrektomi için cilt, bağırsak ansları ve karaciğer ekarte edildi. Karın içerisi yapılara zarar vermemek için bağırsaklar deney hayvanının vücut ısısına uygun ısıda gazlı bez üzerine konuldu (Şekil 3.1B).

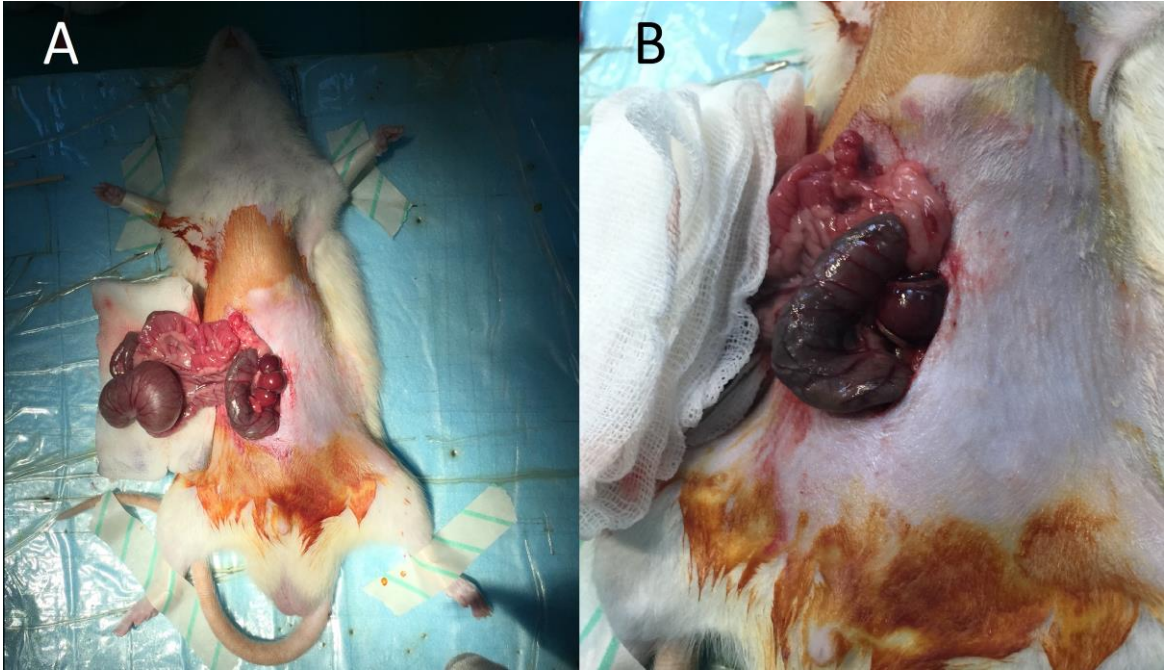


Şekil 3.1: A) 4 cmlik orta hat kesisi B) Sağ böbrek için cilt bağırsak anslarının ekarte edilmesi

5/6 nefrektomi modelinde sağ böbreğin tamamı alınmaktadır. Işık mikroskopu altında sağ böbreğin kapsülü soyuldu. Sürrenal bez korundu ve renal hilus ortaya konulduktan sonra renal hilus (renal arter, renal ven, üreter) ana trunkusun 5 mm proksimalinden 6.0 Vikril (Ethicon Inc) dikiş ile bağlanarak sağ böbrek eksize edildi. Eksize edilen böbrekler tartıldı.

Sol 2/3 nefrektomi için vücut dışına alınan bağırsaklar karşı tarafa geçirildi. Cilt, bağırsak ve dalak ekarte edilerek sol böbreğe ulaşıldı. Mikroskop altında böbreğin kapsülü sürrenal bez korunarak eksize edildi. Böbreğin renal hilusu (renal arter, renal ven ve üreter) mikrodiseksiyonla ortaya konuldu ve hasarlanmamasına özen gösterildi. Sol böbreğin üst ve alt polü 4.0 ipek (Doğsan, Ltd) dikişlerle korteks rengi solacak ancak renal korteksi kesmeyecek sıkılıkta bağlandı (Şekil 3.2A). Bağlamalar sırasında renal pedikül ve üreterlerin hasar görmemesine özen gösterildi. Bağlamaların distal kısımları 11 numaralı bistüri ile kesildi ve çıkan parçalar sağ böbreğin ağırlığının 2/3'ü olacak şekilde tartıldı (Şekil 3.2B). Tartı eksikliği durumunda az alınan polden tekrar eksizyon uygulandı. Açığa çıkan renal medulla bölgesinde bipolar koter yardımı ile hemostaz sağlandı.

Hemostaz sağlandıktan sonra bağırsak ansları doğal pozisyonuna alındı. Periton kapaması öncesinde sıvı kayıplarının replasmanı için 2 cc intraperitoneal serum fizyolojik verildi. Periton, rektus abdominis kası 4.0 yuvarlak vikril ile kilitli devamlı dikiş ile onarıldı. Cilt 3/0 ipek (Doğsan, Ltd) ile devamlı ve kilitlemeli dikiş tekniği kullanılarak onarıldı.



Şekil 3.2: A) Abdominal organların ekarte edilmesi. Sol böbreğin üst ve alt pollerinin kortekse zarar vermeyecek sıkılıkta bağlanması B) Sol böbreğin alt ve üst pollerinin çıkartılması sonrası görüntüsü

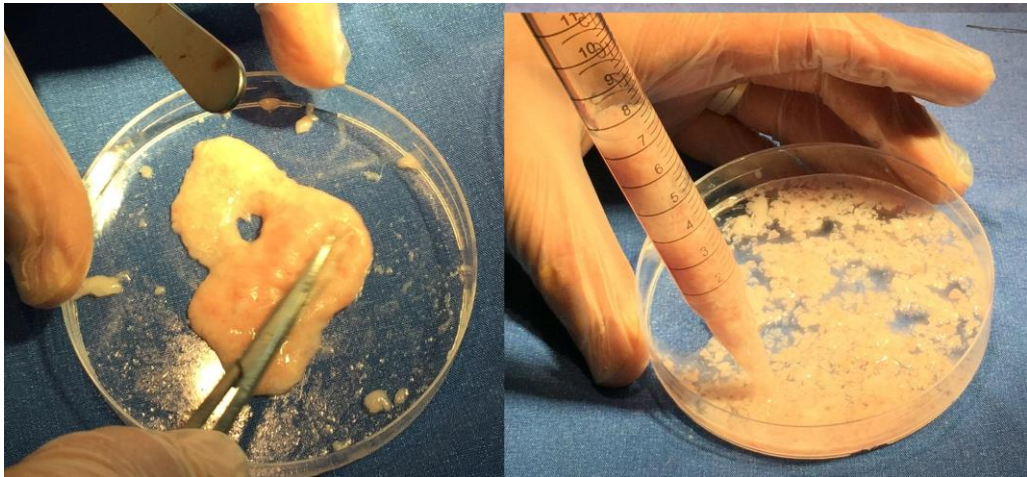
3.4.2 Stromal vasküler fraksiyonun hazırlanması

SVF ve TZP eldesi için ayrılan 10 deney hayvanında 5/6 nefrektomi modeli uygulandıktan sonra 6 hafta takip edildi. KBH gelişimi biyokimyasal olarak kanıtlanan deney hayvanları, Ogawa ve ark.'nın yayınlamış oldukları protokole göre SVF eldesi için kullanıldılar [235]. Deney hayvanlarının inguinal bölgeleri anestezi sonrası tıraş edildi ve supine pozisyonda cerrahi masaya tespit edildi. Karın orta hattın başlayan kesiler bilateral inguinal bölgelere doğru uzatıldı. İnguinal yağ yastıkçıkları bilateral eksize edildi ve 10 deney hayvanından yaklaşık 8 gr kadar yağ doku çıkarıldı (Şekil 3.3).



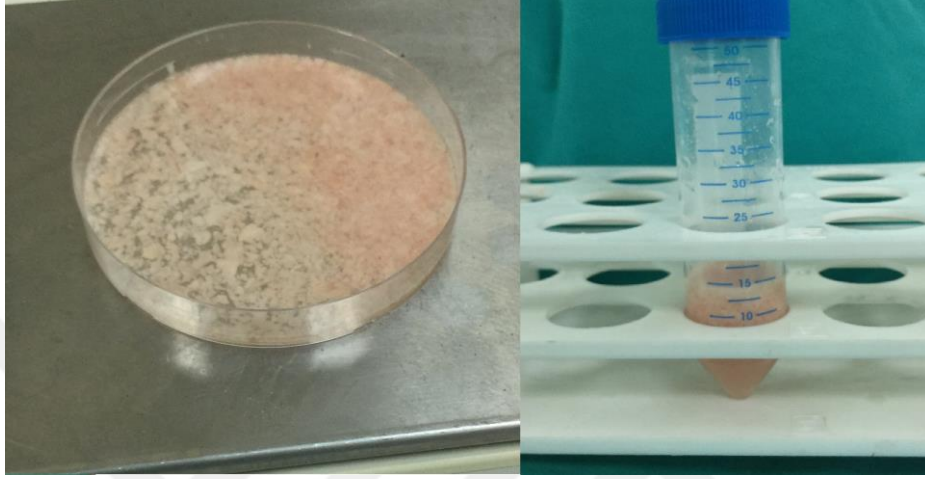
Şekil 3.3: İnguinal bölgeden fibroadipöz doku alınması ve petri kabında tartılması

Elde edilen adipöz dokuların PBS ile yıkanmasını takiben petri kaplarına alınarak, mekanik olarak bistüri ve doku makası yardımıyla küçük parçalara ayrıldı. Bu sırada vasküler ve fibrotik yapılar ayıklanarak uzaklaştırıldı (Şekil 3.4).



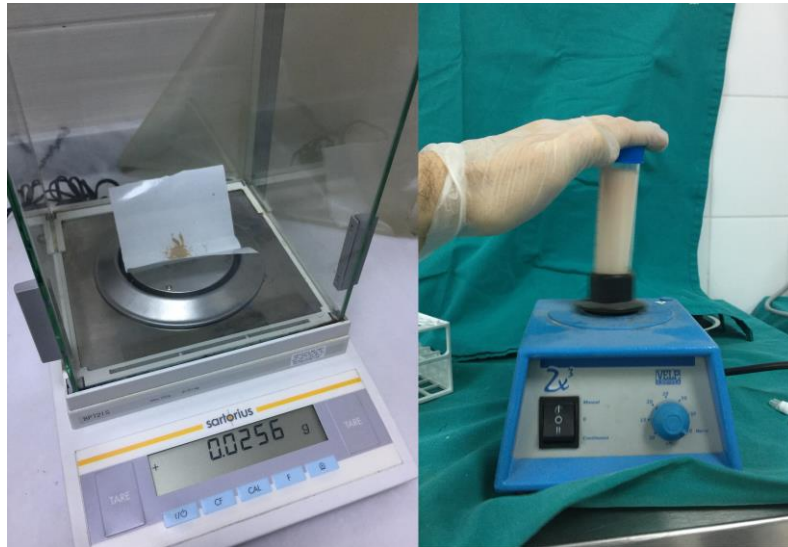
Şekil 3.4: Petri kabı içerisinde yağ dokunun doku makasıyla parçalanması ve pipetle transferi

Ayıklama işlemi tamamlandıktan sonra kalan adipöz dokular yeni petri kaplarına alındı. Bu kapların içine kontrol medium (DMEM, %10 FBS ve %1 antibiyotik (penisilin/streptomisin)) eklenerek, 1 saatlik inkübasyona bırakıldı. Sonrasında dokular, 3 defa PBS ile 5 dakika boyunca yıkayıp süspansiyon haline getirildi. Yıkama işlemini takiben dokular 50 cc'lik konik santrifüj tüpüne alındı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Yıkama sonra dokuların petri kabı içerisinde ve santrifüj tüpündeki görüntüsü

Santrifüj tüpünün içerisine %0,15'lik tip 1 kollajenaz hassas terazide (Sartorius, sartonet) tartılarak eklendi. Karışım 37 °C'de 30 dakika çalkalamalı su banyosu ve vorteks (Biyosan vorteks V-1 plus) ile karıştırıldı. Bekleme süresinin sonunda kollajenazı nötralize etmek için homojenize olan süspansiyona eşit volümde (15 ml) kontrol medium eklendi ve 5 dakika kadar karıştırıldı (Şekil 3.6).



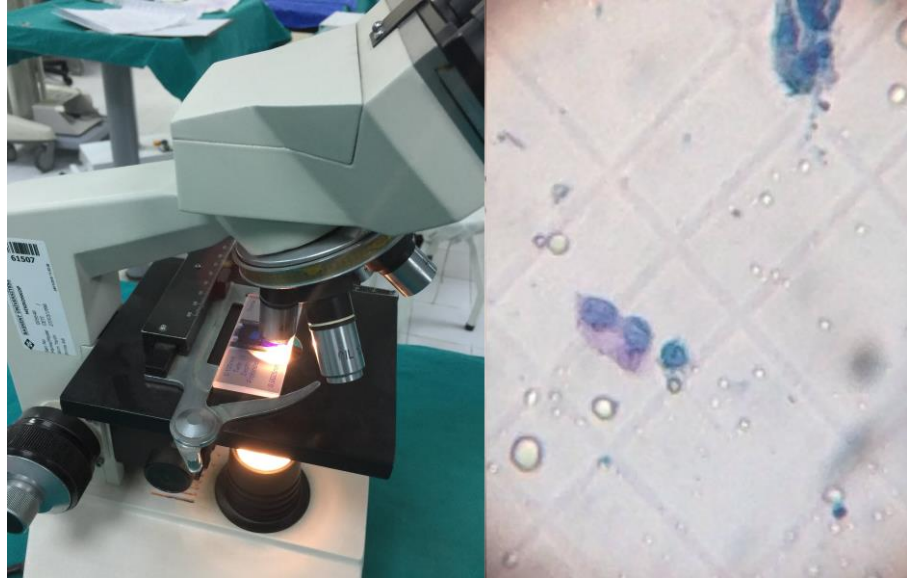
Şekil 3.6: Tip 1 kollajenin hassas terazide tartılması ve karışımın vorteks ile karıştırılması

Oluşan süspansiyon 200 µm'lik hücre süzgecinden geçirilerek hücre dışı dokular (örn: fasyalar, bağ dokular, vb...) temizlenmesini takiben hücre süspansiyonu 260 G'de (1300 rpm) 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı, alttaki birikmiş kök hücrelerin olduğu pellet dikkatli bir şekilde alınarak 10 cc'lik santrifüj tüpüne konuldu (Şekil 3.7).



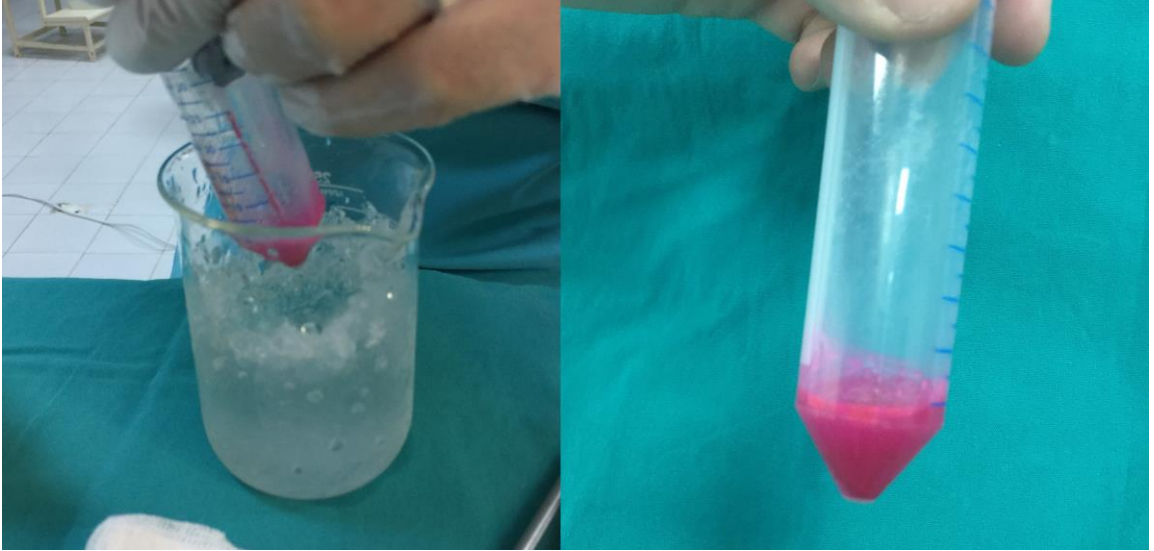
Şekil 3.7: Santrifüj cihazının ayarlanması ve süspansiyonun santrifüj sonrası görüntüsü

Mikropipet yardımı ile toplanan SVF'ye PBS eklenerek 10cc'ye tamamlandı. Hücre sayımı için mikropipet kullanılarak süspansiyondan 0,1 ml alındı ve metilen mavisi ile boyandı. Işık mikroskobu altında Thoma lamında hücre sayımı yapıldı (Şekil 3.8). Kök hücre sayı hesaplaması ile yaklaşık olarak 56×10^7 adet hücre tespit edildi.



Şekil 3.9: Thoma lamında ışık mikroskobu yardımıyla kök hücre sayılması ve büyük sitoplazmalı kök hücrelerin mikroskopik görüntüsü

Hücre sayımını takiben 10 cc'lik hücre süspansiyonu 260 G' de tekrar 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı, alt kısımdaki kök hücrelerin olduğu pellet bırakıldı. Kök hücre işaretlenmesi için sitoplazmik boyama için kullanılan 1,1'-Diocetadecyl-3,3,3',3'- tetramethylindocarbocyanine (DiI) uygulandı. DiI sitoplazmaya bağlandıktan sonra hücrenin transplante edildiği bölgede takibini sağlamaktadır [236]. DiI, %25'lik konsantrasyonda %99'luk etanol çözeltisinde çözüldü ve 1/100 oranında PBS ile seyreltilti. DiI soğuk ortamda sitoplazmaya bağlanmak olup in vivo koşullarda sitoplazmadan ayrılmadığından SVF içeren tüp bu hali ile buz dolu bir kabın içine konuldu. Tüpün içerisine 200 µl DiI eklendi. +4 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı (Şekil 3.10).



Şekil 3.10: DiI sitoplazmik boya çözeltisinin +4 °C'de 5 dakika inkübasyona bırakılması

İnkübasyon periyodu sonrasında, DiI sitoplazma bağlantısının fiksasyonu için 7 ml PBS konuldu ve karıştırıldı. Hücre DiI fiksasyonunun ardından, süspansiyon 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonunda tüpün üst kısmında kalan süpernatant atıldı, alttaki 56×10^7 adet DiI işaretli kök hücrelerin olduğu pelletin üzerine %1 penisilin/streptomisin içeren 5 ml PBS eklendi, karıştırıldı ve tekrar süspansiyon haline getirildi. Grup IV (SVF + TZP) içerisindeki 16 deney hayvanının her birine 3.5×10^7 hücre kök hücre verilmesi planlandı. Elde edilen kök hücreler kalsiyum glukronatla sertleştirilmiş TZP içerisine konuldu ve kırık bölgesine uygulandı.

3.4.3 Trombositten zengin plazmanın hazırlanması

SVF eldesi için anestezi altında 10 adet deney hayvanından intrakardiyak kanülasyon ile yaklaşık 20 cc kan elde edildi. Elde edilen kan pıhtılaşmanın engellenmesi için sodyum sitratlı tüplere konuldu (0.3 mL, 0.109 M (%3,2) Na₃-Sitrat) (Şekil 3.11).



Şekil 3.11: Sıçanlardan TZP hazırlanması için intrakardiyak kan alınması

Toplanan kan iki aşamalı santrifüj protokolüne uygun şekilde santrifüj için hazırlandı [237]. 22°C sıcaklıkta 3000 rpm devirde santrifüj cihazında 13 dakika santrifüje tabi tutulmasının ardından eritrositlerin tüpün en alt kısmında toplandığı ve plazma, trombosit vb. kan elemanlarının ayrıldığı gözlemlendi. Üstte kalan plazma ile beraber bu ara tabaka ayrı bir tüpe alındı. Plazma ve trombositleri içeren bu tüp ikinci kez 5000 rpm devirde 17 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonucunda trombositlerin üzerinde yine beyaz ince bir tabaka oluşturduğu ve trombositlerden fakir plazmanın en üstte toplandığı görüldü (Şekil 3.12).



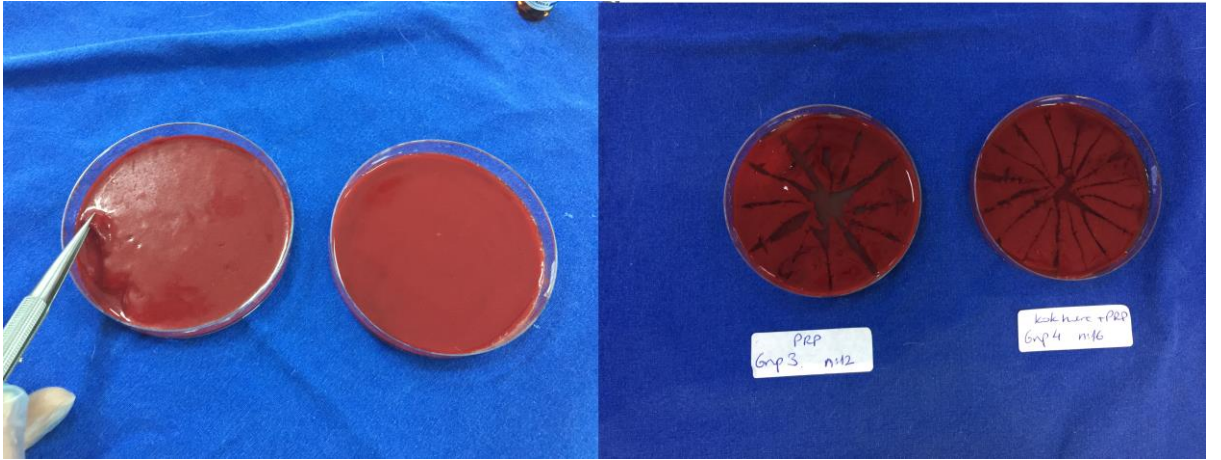
Şekil 3.12: Sodyum sitratlı tüplerin santrifüj cihazından dikkatli alınması ve TZP'nin santrifüj sonrası görüntüsü.

Oluşan trombosit konsantrisinin trombositten zengin kısmı TZP jelleştirme işlemi ile kemik kırığı bölgesine uygulanacak duruma getirildi [238]. Elde edilen TZP, Grup III ve Grup IV teki sıçan sayıları hesaplanarak her bir hayvana uygulanacak TZP miktarına uygun olacak şekilde iki petri kabına paylaştırıldı. Kaplardaki TZP üzerine yavaş infüzyon ile kalsiyum glukonat eklendi (Şekil 3.13).



Şekil 3.13: Kalsiyum glukonatın sıçanlardan hazırlanmış TZP ile petri kabında birleştirilmesi

Kalsiyum glukonat ilavesini takiben petri kapları içindeki TZP'lerin jelleştiğinden emin olmak amacı ile penset ile elevasyon testi uygulandı. Grup III için hazırlanan jelleşmiş TZP bistüri yardımı ile denek sayısına uygun şekilde 12 eşit parçaya bölündü. Grup IV için ayrılmış TZP üzerine KBH'lı sıçanlardan elde edilen SVF konularak karıştırıldı. SVF karıştırılmış olan TZP denek sayısına uygun olarak 16 eşit parçaya bölündü ve cerrahi kırık bölgesine uygulanmak üzere hazırlandı (Şekil 3.14).



Şekil 3.14: TZP'nin jelleştirme kontrolü ve TZP'lerin kırık üzerine uygulanmak üzere eşit parçalara bölünmesi

3.4.4 Cerrahi kırık modelinin hazırlanması

Tüm gruplardaki hayvanların KBH cerrahisini takiben 6. haftada KBH geliştiği kanıtlandıktan sonra (1. Grup hariç) daha önceden tanımlanmış olan kırık modeli planlandı [239]. Kırık oluşturulması için tur motoru (Dremel 3000, Model 255) ve elmas matkap ucu kullanıldı (Şekil 3.15).



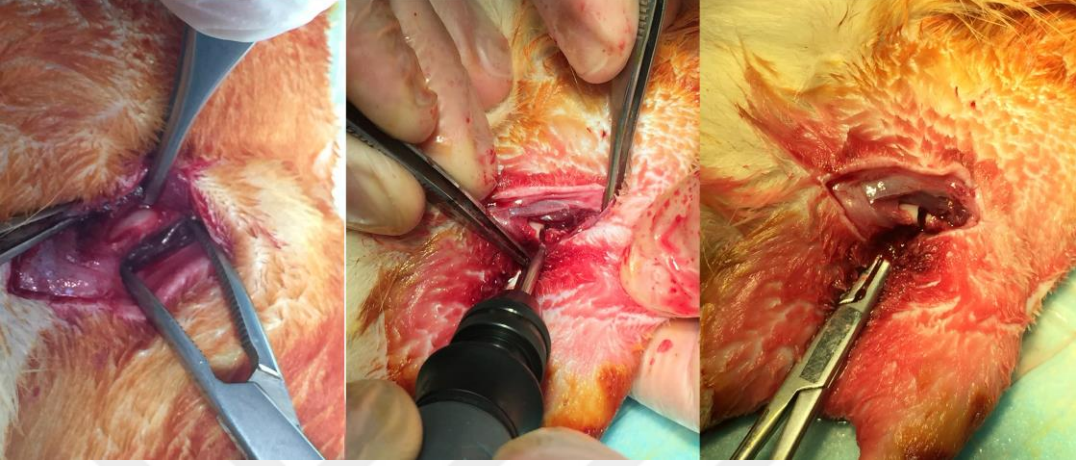
Şekil 3.15: Çalışmada kullanılan tur motoru ve elmas ucu

Anestezi için tüm hayvanlara periton içine 40 mg/kg ketamin hidroklorür (Ketalar, Pfizer inc), 5 mg/kg ksilazin hidroklorür (Rompun, Bayer inc) uygulandı. Anestezi derinliği ekstremitte çekme yanıtı ile değerlendirildi. Anestezinin idamesi, başlangıç dozunun %50'si ile sağlandı. Hayvanlar uyuduktan sonra ameliyat alanları elektrikli tıraş makinesi ile temizlenerek cerrahi masaya üç ekstremiteden flaster ile prone pozisyonda tespit edildi. Sağ bacak manüpilasyon amacı ile serbest bırakıldı. Ameliyat alanı %10 povidon-iodin ile temizlendi ve cerrahi süresince sterilizasyon koşulları sağlandı. Hayvanların femoral bölgesinde 3 cm'lik kesi planlandı (Şekil 3.16).



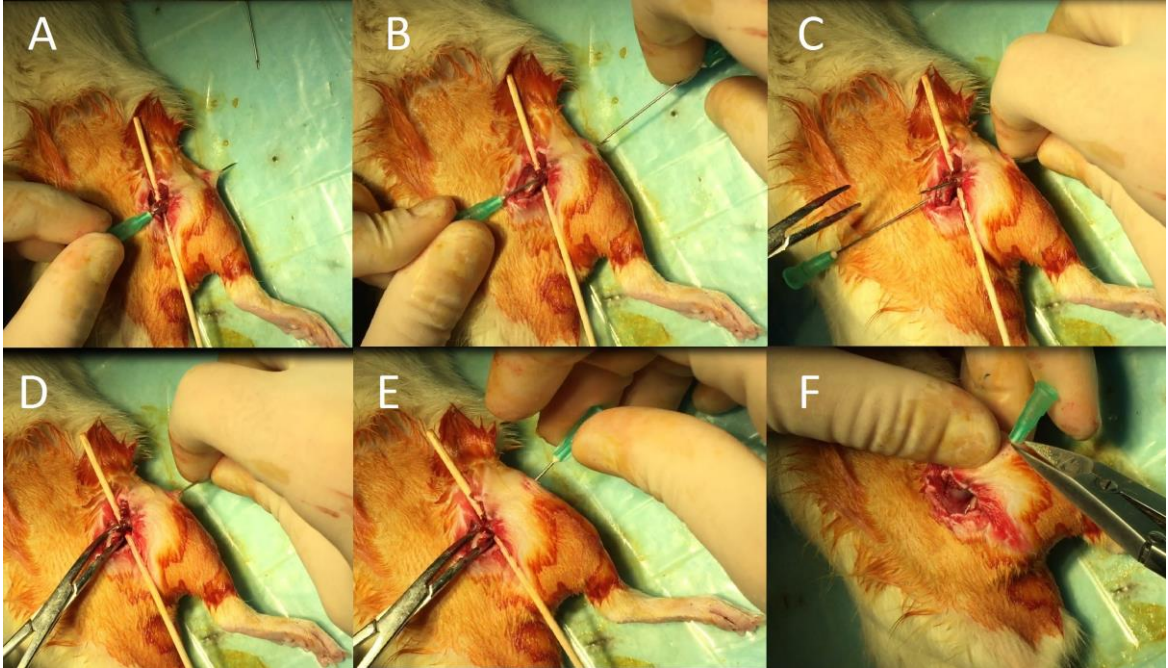
Şekil 3.16: Hayvanın cerrahi masaya sabitlenmesi ve kesi planı çizimi

Cilt kesisini takiben kas ve yumuşak doku diseksiyonları yapılarak sağ femur kemiğine ulaşıldı. Kemiğin distal 1/2'lik kısmı femoral arter korunarak yumuşak doku bağlantılarından ayrıldı. Cilt ve cilt altı dokuları ekarte edilerek femur distal 1/3'lük kısmında tur ile kırık oluşturuldu (şekil 3.17).



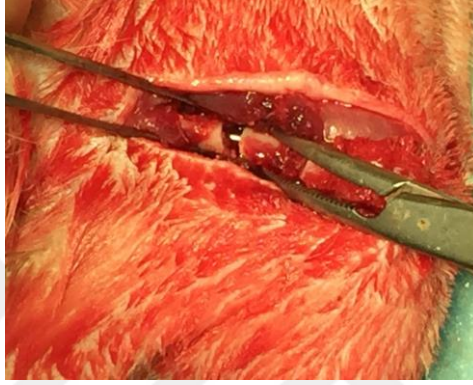
şekil 3.17: Sıçan sağ femur kemiğinin diseksiyonu ve tur aleti ile kemik kırılması sonrası görüntüsü

Kırık sonrası kemik stabilitesinin sağlanması için 21 Gauge enjektör iğnesi (Yeşil enjektör, BD Syringe) kullanılarak intramedüller çivileme yöntemi uygulandı. Kırık ucundan medüller kanalın distaline ilerletilen iğne patella dislokasyonu sonrası ortaya çıkarılan interkondiller alandan geçilerek cilt dışına çıkarıldı (şekil 3.18A).



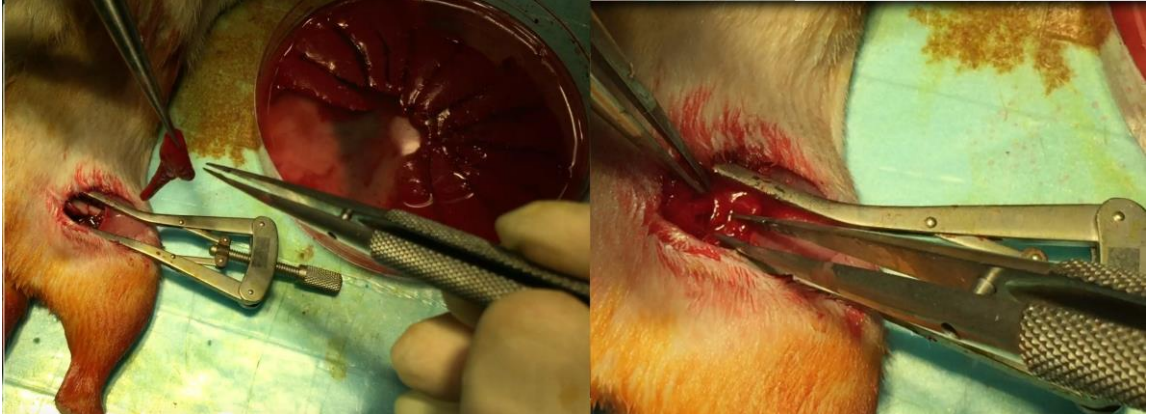
şekil 3.18: Oluşturulan kemik kırığının intramedüller olarak sabitlenmesinin aşamaları

Medüller kanaldan cilde çıkarılan 21G iğnenin kanalı kullanılarak cilt yönünden medulla içerisine ucu keskin yeni bir 21G iğne ile girildi (Şekil 3.18B). Kanalın içinden geçirilen iğne kırık ucundan çıkarıldı ve medullada olduğu kontrol edildi (şekil 3.18C, D). Kırık ucunun proksimal kısmı klemp ile sabitlenerek femur distalinden geçmiş olan iğne ucu kırığın proksimal parçası ile birleştirildi (Şekil 3.18E). İğne kalça eklemine ulaşmaya kadar ilerletildi. İğnenin cilt kısmından ekpoze olan plastik parçası kesilerek bölgeden uzaklaştırıldı (Şekil 3.18F). Medulla içerisinde bulunan iğnenin sağlamlığı kontrol edilerek kırık uçları birbirine temas edecek şekilde kapatıldı (Şekil 3.19).



Şekil 3.19: Kemik kırık uçları arasında stabilizasyonun kontrolü

Kırık bölgesinin stabilizasyonunu takiben I. ve II. gruptaki hayvanların kırık hatları serum fizyolojik ile yıkanarak cilt altı ve cilt dikişleri ile operasyon sahası kapatıldı. III. ve IV. gruptaki hayvanların kırık bölgesi üzerine jelleştirilmiş TZP uygulandı. III. Gruptaki hayvanların kırık bölgesine sadece jelleştirilmiş TZP uygulandı. IV. Gruptaki hayvanların kırık hattına SVF içeren TZP uygulandı (Şekil 3.20). Cilt primer onarıldı. Operasyon sonrası 6 hafta kallus oluşumu beklendikten sonra hayvanlar sakrifiye edildi.



Şekil 3.20: Jelleştirilmiş TZP'nin kırık hattı üzerine direkt uygulanması

3.5 Deney protokolü

Bu çalışmada toplam 62 adet deney hayvanı kullanılmıştır. Kronik böbrek hastalığı bulguları saptandıktan sonra kemik kırığı oluşturulmuştur. Kemik iyileşmesinin mekanik, radyolojik ve biyokimyasal özelliklerinin TZP ve SVF etkisi altında oluşturduğu değişiklikler irdelenmiştir.

Deney Yapım Kronolojisi:

1. Gün: Grup II, III, IV: 5/6 KBH modeli ile nefrektomi uygulanması.

3. Hafta: Grup I, II, III, IV: KBH takibi amaçlı kuyruk kanından hemoglobin, üre ve kreatini alınması.

6. Hafta: Grup I, II, III, IV: Kuyruk kanından hemoglobin, üre, kreatini, PTH, D vitamini ve kalsiyum alınması. Kemik kırığı modeli ve kırık sabitlemesi uygulanmıştır. Donör hayvanlardan TZP ve SVF hazırlanması. 3. grubun kırık hattına TZP uygulanması. 4. grubun kırık hattına TZP ve Diİ boyalı kök hücre içeren SVF uygulanması.

12. Hafta: Grup I, II, III, IV: Kuyruk kanından PTH, D vitamini ve kalsiyum ölçülmesi sonrası hayvanların sakrifiye edilmesi. Her gruptan 2 adet hayvandan böbrek biyopsisi alınması. Tüm gruplardaki hayvanlar için direkt femur grafisi ve BT görüntülenmesini takiben hayvanların rastlege seçilerek mekanik stres testi ve patolojik inceleme uygulanması.

Grup I: (Kontrol, n:12): İlk 6 hafta hayvanlara cerrahi uygulanmayacaktır. Nefrektomi grupları ile sonuç karşılaştırma amaçlı 3. haftada üre, kreatinin, hemoglobin ve 6. haftada üre, kreatinin, hemoglobin, PTH, D vitamini ve kalsiyum değeri ölçülecektir. 6. haftanın sonunda hayvanların tamamının femoral bölgesine kesi yapılarak kemik fraktürü uygulanacak ve intramedüller iğne ile kırık onarımı uygulanacaktır. 12. haftada hayvanların femurları alınıp radyolojik olarak görüntülenecektir. Rastgele seçilen hayvanlara mekanik stres testi ve patolojik testler uygulanacaktır. Sakrifiye edilme aşamasında hayvanların kuyruk kanından PTH, D vitamini ve kalsiyum örnekleri alınacaktır.

Grup II: (Kontrol KBH, n:12): 12 adet hayvana daha önceden literatürde tariflenen 5/6 nefrektomi modeli yapılacaktır. KBH parametresi olarak 3. haftada üre, kreatinin, hemoglobin değerleri ölçülecektir. KBH ve kemik metabolizması arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacı ile 6. haftada üre, kreatinin, hemoglobin, PTH, D vitamini ve kalsiyum değerleri ölçülecektir. 6. haftanın sonunda hayvanların femurlarında kırık oluşturulacaktır. Kırık sabitlemesini takiben çalışmanın 12. haftasında radyolojik görüntüleme yapılacaktır. Hayvanlar rastgele seçilerek kemik biyopsisi ve mekanik stres testi için sakrifiye edilecektir. Gruptaki hayvanların kanından PTH, D vitamini ve kalsiyum değerleri ölçülecektir.

Grup III: (KBH + TZP, n: 12): 12 adet hayvana önceden tariflenmiş 5/6 KBH modeli uygulanacaktır. Hayvanların kuyruk kanından 3. ve 6. haftada KBH'nın tespit edilebilmesi için üre, kreatinin ve hemoglobin değerleri ölçülecektir. Kemik kırığı öncesi KBH için kan alınması sırasında PTH, D vitamini ve kalsiyum değerleri ölçülecektir. 6. haftada tamamlanan KBH protokollerini takiben kemik kırığı oluşturulacak ve fiksasyon uygulanacaktır. Kök hücre ve TZP eldesi için ayrılan nefrektomi uygulanmış donör hayvanların kanından TZP hazırlanıp III. gruptaki hayvanların kemik iyileşmesi bölgesine uygulanacaktır. Deneyin 12. haftasında Grup II de tarif edilen şekilde kan tahlilleri, mekanik ve radyolojik tetkikler yapılacaktır.

Grup IV: (KBH + TZP + SVF, n: 16): 16 adet hayvana KBH cerrahisi uygulanacaktır. Hayvanların kuyruk kanından 3. ve 6. haftada KBH'nın tespit edilebilmesi için üre, kreatinin ve hemoglobin değerlerine bakılacaktır. KBH için kan alınması sırasında kemik iyileşmesi parametreleri PTH, D vitamini ve kalsiyum değerlerine bakılacaktır. 6. haftada kırık oluşturulduktan sonra kırık fiksasyonu uygulanacaktır. Kırık bölgesine böbrek hastalığı oluşturulan kök hücre donör hayvanlarından TZP ve SVF elde edilip kırık bölgesine uygulanacaktır. Deneyin 12. haftasında Grup II de tarif edilen şekilde kan tahlilleri, mekanik ve radyolojik tetkikler uygulanacaktır. Kök hücre ile işaretlenmiş hücrelerin immunohistokimyasal boyamaları ve mikroskopik incelemeleri yapılacaktır.

Donör Grup: 10 adet hayvana tarif edilen KBH protokolü uygulandıktan 6 hafta sonra kök hücre ve trombosit zengin plazma donörü olarak kullanılacaktır. Hayvanlardan aynı soydan gelen sıçanların hücrelerinin bireyler arasında immunolojik

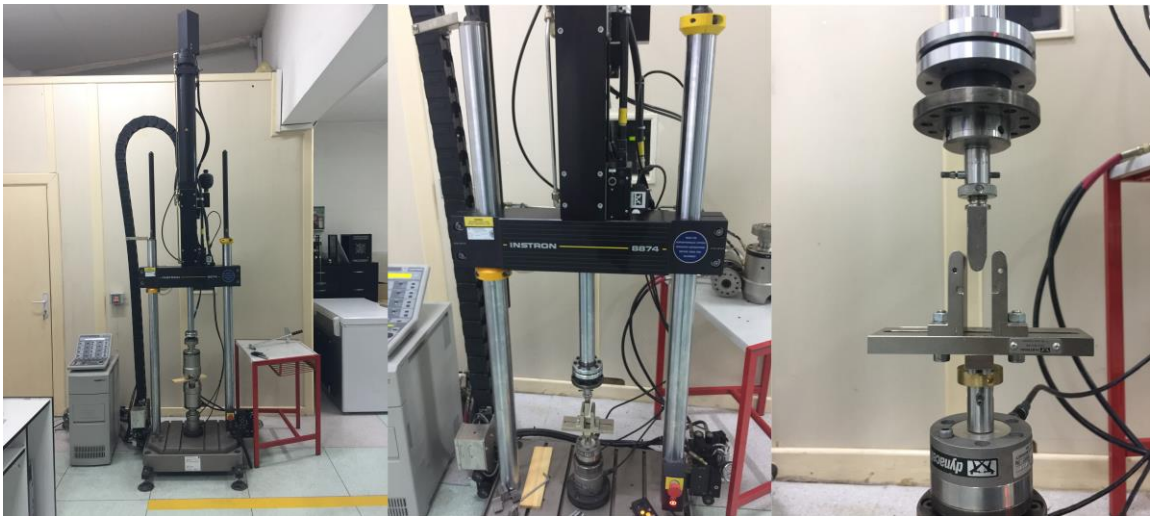
reaksiyon yaratmadan nakil edilebilmesi mümkün olmaktadır. Grup III ve IV teki hayvanlara uygulanacak kök hücre ve TZP'nin aynı özellikteki sıçanlardan alınması önemlidir. Kronik böbrek hastalığının kök hücre onarım kapasitesini azalttığına yönelik çalışmalar literatürde mevcuttur. Bundan dolayı böbrek yetmezliği oluşturulmuş olan III. ve IV. Gruptaki hayvanlara uygulanacak olan kök hücre ve TZP'nin de böbrek yetmezliği hastası hayvanlardan alınarak sağlıklı donörlere bağlı oluşabilecek muhtemel olumlu sonuçların çalışmayı etkilememesi sağlanacaktır. Donör hayvanlarda KBH oluştuğunun teyidi amacı ile 3. ve 6. haftalarda üre, kreatinin ve hemoglobin değerleri ölçülecektir.

3.6 Makroskopik değerlendirme

Kemik iyileşmesinin makroskopik değerlendirmesi radyolojik ve mekanik olarak yapılmıştır. Radyolojik tetkikler ve değerlendirme; Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi Radyoloji bölümünde gerçekleştirilmiştir. Kemik iyileşmesinin mekanik değerlendirilmesi Başkent Üniversitesi Ankara Bağlıca Kampüsünde, Makine Mühendisliği Fakültesinde yapılmıştır.

3.6.1 Kemik dayanıklılığı ölçülmesi (Mekanik stres testi)

Kemik dayanıklılığının ölçülmesinde daha önce tanımlanmış olan üç nokta bükme testi (three point bending) kullanılması planlandı [239]. Tüm gruplardan 6 hayvan sıçan rastgele seçilerek mekanik stres testi için hazırlandı. Bükme testi için Universal Kuvvet Cihazı (Instron 8874) kullanıldı (Şekil 3.21).



Şekil 3.21: Universal kuvvet cihazı ve bükme testi için hazırlanan test düzeneği

Kallus oluşumunun 6. haftasında sakrifiye edilen hayvan kemiklerinin boyutları ölçülerek Universal Kuvvet Cihazının kalibrasyonu yapıldı. Test öncesinde oda sıcaklığı 23°C ve nem oranı %30 olarak ölçüldü. Cihaza konulacak olan kemiklerin düzenden kaymaması ve kemik dışı dokuların sonuçları etkilememesi için kemiklerin yüzeyindeki yumuşak doku artıkları temizlendi. Düzeneğe gelecek kemik uç kısımları bisti ve zımpara kağıdı ile düzeltilti. Kemiklerin boyları ölçülerek kayıt edildi. Test edilecek kemik yüzeyleri ve pozisyonları kontrol edilerek uygulama standart hale getirildi. Kemik kırılma işlemine 2 Newton preload ile başlanıp kemik kırılana ya da ek kuvvete dayanma gücü tükeninceye kadar devam edildi (Şekil 3.22).



Şekil 3.22: Test edilecek kemiklerin temizlenmesi. Normal kemik ve kallus oluşmuş kemiğin görüntüsü

3.6.2 Radyolojik değerlendirme

Tüm hayvanlara deney bitiminde (12. Haftada) sakrifiye edilmelerini takiben kemik iyileşmesi ve kallus değerlendirilmesine yönelik direkt grafi ve BT görüntülemesi yapıldı. KBH olan hayvanların femurlarının sağlıklı hayvan femurları ile karşılaştırılması için I. gruptaki sağlıklı hayvanların cerrahi geçirmeyen taraftaki femurlarına ait grafi ile kıyaslandı. KBH'ın erken dönem etkilerinin değerlendirilmesine yönelik kök hücre ve TZP eldesi için sakrifiye edilen hayvanların (Donör hayvanlar) femurları kontrol grubu olarak alındı. 12. hafta KBH kontrol grubu olarak II. grup hayvanların sağlam femurları kontrol amaçlı olarak alındı. Yöntemde standart sağlandıktan sonra hayvanların femurları modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemine göre değerlendirildi (Tablo 3.5) [240]. Kırık hattında oluşan kallus kalınlıkları çekilen BT görüntülemesi ve direkt grafielde karşılaştırmalı olarak ölçüldü.

Tablo 3.5: Modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemi

Kallus oluşumu		Birleşme (proksimal ve distal)		Yeniden yapılanma	
Kallus oluşumu yok	0	Birleşme yok	0	Var	2
Defektin %25'ini dolduran kallus oluşumu	1	Muhtemel birleşme	1		
Defektin %50'sini dolduran kallus oluşumu	2	Radyografik birleşme	2		
Defektin %75'ini dolduran kallus oluşumu	3				
Defektin %100'ünü dolduran kallus oluşumu	4				

3.7 Laboratuvar değerlendirmesi

Tüm hayvanların böbrek fonksiyon testleri ve kemik iyileşmesi parametrelerinin bakılmasına yönelik 0, 3, 6 ve 12. haftalarında kuyruk kanları alındı (Şekil 3.23) Alınan kan örnekleri Başkent Üniversitesi Klinik Biyokimya Laboratuvarında değerlendirildi.



Şekil 3.23: Sıçanın kuyruk veninden kan alınması

3.7.1 Kronik böbrek hastalığı doğrulanması

KBH'nın biyokimyasal değerlendirilmesine yönelik 0, 3, 6 ve 12. haftada Grup II, III ve IV içerisinde yer alan hayvanların ve kontrol amacı ile I. Gruptaki sağlıklı hayvanların kanında BUN, kreatinin ve hemoglobin değerlerine bakıldı. Her hayvan için yaklaşık 300 mikrolitre kan EDTA'lı hemogram tüplerine alındı. Hayvanların serum BUN düzeyleri Architect c8000 (Abbott Diagnostics) üreaz metoduyla kinetik olarak ölçüldü. Serum kreatinin düzeyleri Architect c8000 cihazında kinetik alkalın pikrat metoduyla kolorimetrik olarak değerlendirildi. Kan hemoglobin seviyeleri EDTA'lı kandan fotometrik-kinetik yöntemle otomatize sedimentasyon cihazı olan TEST-1 (Alifax) cihazında ölçüldü. Hayvanların cerrahi morbidite ve KBH'a bağlı oluşabilecek komplikasyonlar göz önünde bulundurularak kan alma işlemleri gerekli olan en düşük miktarda tutulmaya çalışıldı.

3.7.2 Kemik iyileşmesi testleri

Tüm sıçanların 6 ve 12. haftada KBH değerlendirilmesi için kan alındığı sırada, kemik iyileşmesi parametreleri olan PTH, D vitamini ve kalsiyum bakılmak üzere fazladan 1 cc kan alındı. Kalsiyum düzeyleri; Schwarzenbach ile o-cresolphtalein kompleksyon yöntemi ile fotometrik olarak ölçüldü. PTH düzeyleri IMMULITE 2000 (Siemens Healthcare Diagnostics inc. Flansers NJ. 07836 USA) cihazında chemiluminescent immünokimyasal yöntem ile ölçüldü. D vitamini (25(OH)D₃) seviyeleri Rat Vitamin D(VD) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) kitinin firma katalog önerilerine (Katalog no:201-11-0614, SunRed Biotechnology) uygun şekilde Bio-Rad ELISA okuyucu cihazında ölçüldü.

3.8 Histopatolojik değerlendirme

KBH gelişiminin histopatolojik dokümantasyonu için tüm gruplardaki sıçanların kalan böbrekleri alındı. Her gruptan 6 hayvanın rastgele seçilen kemikleri mekanik stres testine gönderildikten sonra kalan kemikler patolojiye getirildi. Kemik kallus oluşumunun gösterilmesine yönelik kırık kemikler ile birlikte sağlam taraftaki femur kemikleri de alınarak numaralandırıldı (Şekil 3.24). Biyopsi örnekleri %10'luk nötral formaldehid solüsyonu içerisinde konularak fikse edildi ve 4 °C'de 24 saat bekletildi. Kemik dokuların formaldehid fiksasyonunu takiben Morse Çözeltisi ile (%10'luk sodyum sitrat, %20'lik formik asit) dekalsifikasyon işlemi uygulandı. Kemik dokular 4 gün sonra dekalsifikasyon sıvısından çıkarıldıktan sonra tekrar formaldehite konularak muhafaza edildi.



Şekil 3.24: Patoloji preparatlarının numaralandırılması ve kasetlere yazılması

Kemik dokunun proksimal ve distal metafizleri kallus dokusuna zarar vermeyecek şekilde kesildi. Kallus dokusunun tam orta hattından kemiğin medullasına paralel planda tam kat kesi yapıldı. Kemiğin medullaya bakan kısmı kasetin alt kısmına denk gelecek şekilde yerleştirildi (Şekil 3.25).



Şekil 3.25: Kemik dokunun patoloji kasetine yerleştirilmesi

Parafin bloğa gömülen dokulardan 5 µm kalınlığında kesitler hazırlanarak hematoksilin, hematoksilin-Eozin (H&E), ve immün boya olan osteokalsin ile birer çift olacak şekilde lam boyaması yapıldı. Işık mikroskopi ve immunflorasan mikroskopi altında kesitler incelendi. Bu biyopsilerin histopatolojik incelemeleri Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji A.D.'da aynı patolog tarafından, örneklerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin (kör olarak) yapıldı.

3.8.1 Kemik dokunun mikroskopik değerlendirilmesi

Kemik iyileşmesinin derecesi Allen ve ark.'nın tanımladığı sınıflandırma kullanılarak yapıldı [241]. Bu sınıflandırmada kırık dokunun kemik dokuya dönüşümü ve kallus dokusunda kemikleşmeyi gösteren 7 farklı skor mevcuttur.

Skor 0; Kemik birleşmemesi (non-union), (fibröz dokular)

Skor 1; Tamamlanmamış kırık birleşmesi (fibröz doku içeren kırık)

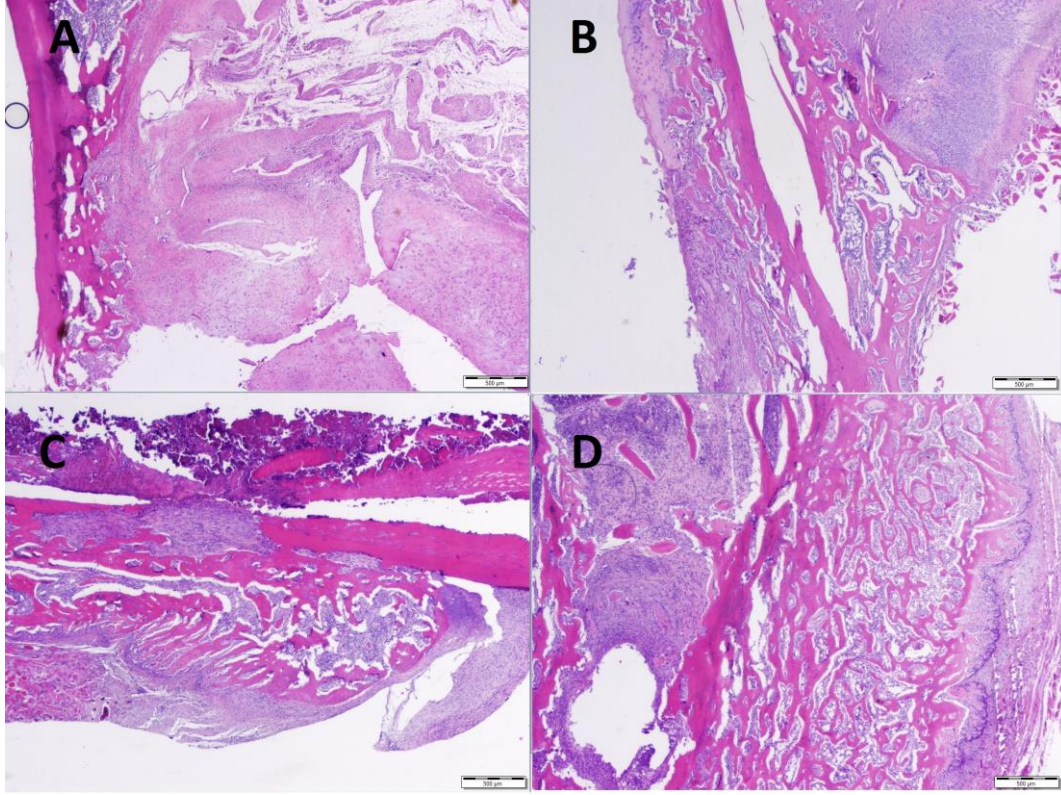
Skor 2; Tamamlanmış kırık birleşmesi (tamamen kırık doku)

Skor 3; Tamamlanmamış kemik birleşmesi (az seviyede kemikleşme), (az miktar trabeküler kemik ile birlikte yoğun miktarda kırık doku), (Şekil 3.26A)

Skor 4; Tamamlanmamış kemik birleşmesi (orta seviye kemikleşme), (eşit miktarda kırık doku ve kemik doku), (Şekil 3.26B)

Skor 5; Tamamlanmamış kemik birleşmesi (ileri seviye kemikleşme), (az miktar kırıkta doku ile birlikte yoğun miktarda trabeküler kemik), (Şekil 3.26C)

Skor 6; Tam kemik kaynaması (tamamen kemik doku), (Şekil 3.26D)



Şekil 3.26: Allen ve ark. kırık iyileşmesi skorlamaları; Kemiklerin mikroskop altında görüntüsü, H&E boyama, x20 büyütmede. A; skor 3, B; skor 4, C; skor 5, D; skor 6 örnekleri.

Kemik dokunun sağlamlığı gösterilmesinde kemik doku mineralizasyon açısından üç farklı seviye olarak skorlandı.

Skor 0; Mineralizasyon yok

Skor 1; Az mineralizasyon

Skor 2; Çok mineralizasyon

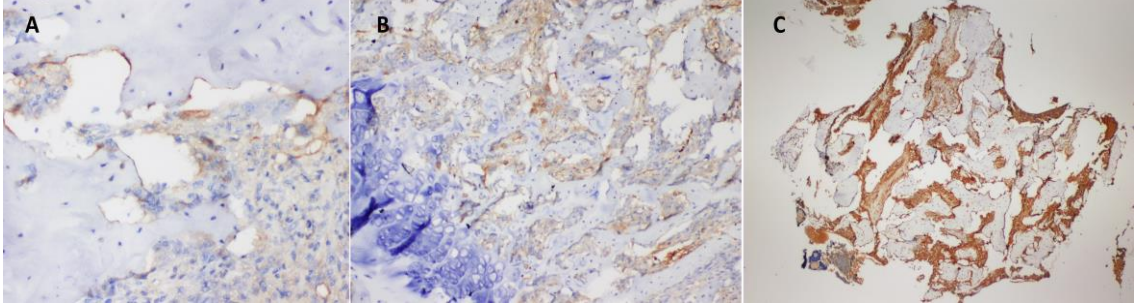
3.8.2 Kemik doku immünolojik boyanması

Kemik dokunun immünohistokimyasal boyanması osteokalsin ile yapıldı. Osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks proteini olan osteokalsin mineral depolamasında ve kemik remodeling fazının düzenlenmesinde rol alır. Kemik dokudaki osteoblastik aktivite osteokalsin yoğunluğuna göre üç kategoride skorlandı.

Skor 1; x200 büyütmede rahat şekilde görülebilen osteokalsin birikimi (Şekil 3.27A)

Skor 2; x100 büyütmede rahat şekilde görülebilen osteokalsin birikimi (Şekil 3.27B)

Skor 3; x40 büyütmede rahat şekilde görülebilen osteokalsin birikimi (Şekil 3.27C)



Şekil 3.27: Osteokalsin yoğunluğu skorlaması

3.8.3 Diİ işaretli kök hücrelerin izlenmesi

Bu değerlendirme sadece Diİ işaretli kök hücre grubu için uygulandı. Preparatlar immunfloresan mikroskop ile değerlendirildi. Eosin boyasındaki kırmızı renk ile Diİ işaretli hücrelerdeki kırmızı rengin görüntü açısından karışıklık yaratmasının engellenmesine yönelik kesitler sadece hematoksilin ile boyandı [242]. Takip eden kesitlerde H&E boyaması kullanılarak immünfloresan mikroskopta endotelial hücrelerin tespit edilmesi sağlandı. Bu endotelial hücrelerden MKH kaynaklı olanların (Diİ ile işaretli olanlar) 565 nm dalga boyundaki floresan mikroskopta kırmızı-mor renkte görünmesi beklenmektedir [243]. Preparatlar Başkent Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Laboratuvarı'nda değerlendirildi. İmmünohistokimyasal incelemeler için Nikon Eclipse E600 floresan mikroskop kullanıldı. Preparatlar 20x, 40x, 60x ve 100x büyütmelerde incelendi. Görüntüler, renkli dijital video kamera (Nikon CCD) ile bilgisayar ortamına aktarıldı ve bilgisayar programı olarak Cytovision Genus Software kullanıldı.

3.9 Biyoistatistiksel değerlendirme

Kemik iyileşmesi parametreleri; mekanik dayanıklılık, radyolojik incelemeler, laboratuvar sonuçları, histopatolojik inceleme sonucunda bulunan osteoblast yoğunlukları, kallus dokusu büyüklüğü verilerinin gruplar arasındaki farkları istatistiksel olarak değerlendirildi. Öncelikle sürekli değerlerin tanıtıcı istatistikleri verildi. Değerler, ortalama \pm Standart sapma ve medyan (min.-max) olarak ifade edildi. Varyans analizi ön şartlarının uygunluğuna bakıldı. Sürekli değişkenlerin normal

dağılıma uyumu Shapiro-Wilk Testi ile kontrol edildi. Grup varyanslarının homojen olup olmadığı Levene Testi ile değerlendirildi. Daha sonra dört grup olan değişkenler varyans analizi ön şartları sağlanıyorsa Tek Yönlü Varyans Analizi (One Way Anova) ile analiz edildi. Varyans analizi ön şartları sağlanmıyorsa Kruskal-Wallis Testi kullanıldı. Takibinde hangi gruplar arasında fark olduğunun belirlenmesi için çoklu karşılaştırma testlerinden Bonferroni Dunn testi yapıldı. Günler ile gruplar arasında değerlendirme yapılırken İki Faktörlü Faktörlerden Biri Tekrarlayan Varyans Analizi (Mixed Design (Repeated Measures)) kullanıldı. Tekrarlı ölçüm varyans analizi için gerekli olan önşartlardan Mauchly's küresellik testi sonucu Grup*Gün etkileşimi küresellik varsayımının sağlandığı belirlendi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Veriler SPSS paket programında (SPSS Ver. 17.0, SSPS Inc, Chicago IL, USA) değerlendirildi.

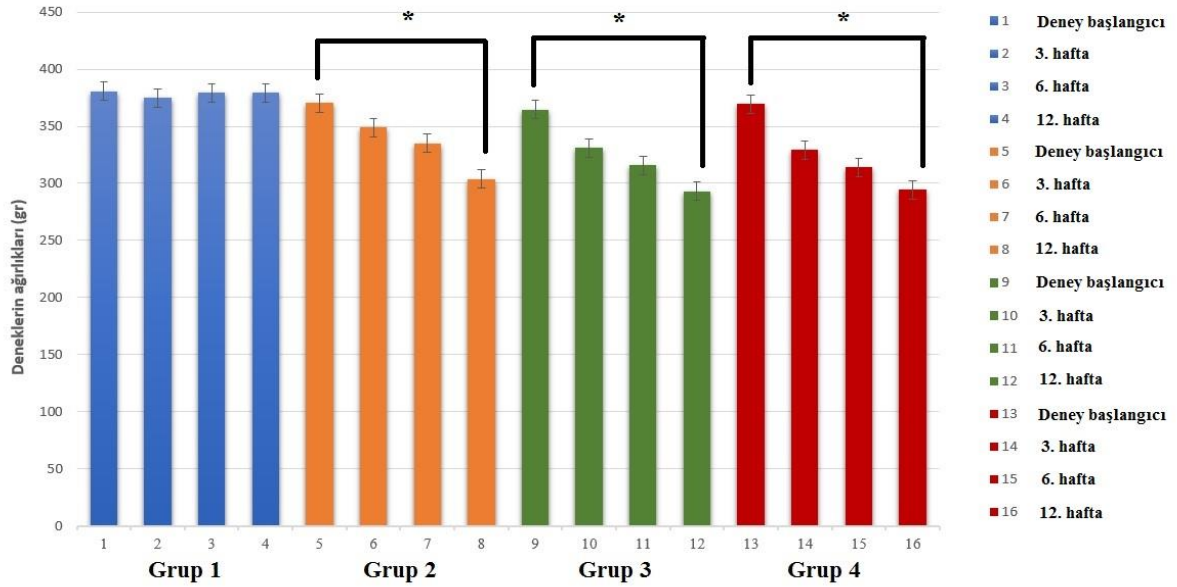
4. BULGULAR

4.1 Ağırlık değerlendirilmesi

Deneyin başlangıcı, deneyin 3, 6 ve 12. haftalarda hayvanların ağırlıkları ölçüldü. Grup II, III ve IV de bulunan KBH'li hayvanların ağırlık değişimi anlamlı olarak bulundu ($p<0.05$) (Tablo 4.1) (Şekil 4.1).

Tablo 4.1: Çalışmadaki sıçanların deney sırasındaki ağırlık değişiklikler

Denek Numaraları	1. Grup 0. gün	1. Grup 3. hafta	1. Grup 6. hafta	1. Grup 12. hafta	2. Grup 0.gün	2. Grup 3. hafta	2. Grup 6. hafta	2. Grup 12. hafta	3. Grup 0.gün	3. Grup 3. hafta	3. Grup 6. hafta	3. Grup 12. hafta	4. Grup 0. gün	4. Grup 3. hafta	4. Grup 6. hafta	4. Grup 12. hafta
1	385	389	397	384	356	326	317	295	380	366	340	324	402	345	345	300
2	402	378	394	400	360	310	300	272	364	283	302	270	400	347	360	349
3	410	420	425	430	375	365	342	308	355	350	319	305	360	351	361	358
4	404	380	381	387	405	384	352	342	384	325	332	296	402	321	324	300
5	399	368	390	392	361	332	336	309	393	315	305	266	375	285	288	261
6	370	408	404	410	354	312	288	250	360	340	320	327	370	326	345	318
7	360	356	358	360	361	351	325	295	356	354	299	315	356	323	335	350
8	359	350	352	355	352	333	346	305	341	365	360	320	384	360	332	312
9	382	367	366	358	381	369	350	315	370	333	330	325	387	362	312	300
10	354	332	342	340	417	411	382	340	356	278	274	270	363	283	263	241
11	360	348	352	354	371	358	376	323	350	288	265	198	306	317	265	214
12	380	385	375	378	365	360	327	300	352	342	317	300	367	344	320	295
13													364	330	320	323
14													362	300	243	216
15													364	352	300	275
16													350	324	312	297
Ortalama	380,77	374,62	379,46	379,385	370,31	349	335,23	303,769	364,69	331,15	315,62	293	369,5	329,38	314,06	294,313
Standart sapma	18,364	24,309	23,903	25,4722	19,615	28,3169	26,552	24,7975	14,784	29,777	25,643	35,7864	22,967	23,767	33,641	42,4687



4.2 Kemiklerin makroskopik bulguları

Kemik dokularının iyileşmesi gruplar arasında tarafsız olarak karşılaştırıldı. Morfolojik olarak kallus dokusu miktarı ve kemiğin düzgün iyileşmesi sırası ile Grup IV> Grup III> Grup I> Grup II olarak bulundu (Şekil 4.2).



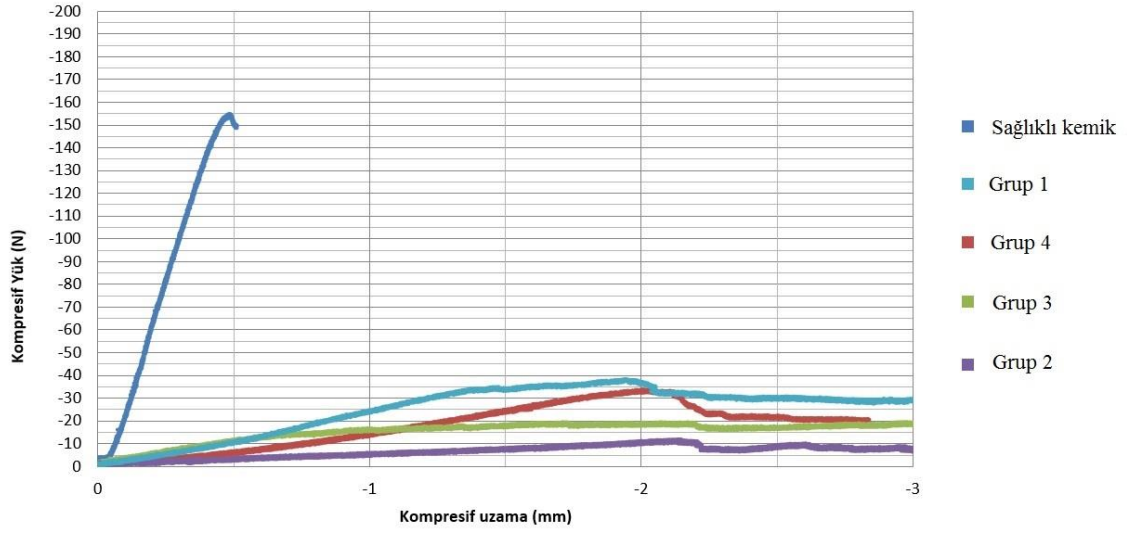
Şekil 4.2: Kemiklerin makroskopik görüntüsü; A: Grup I, B: Grup II, C: Grup III, D: Grup IV

4.3 Kemik dayanıklılığı sonuçları (Mekanik yöntem)

Mekanik stres testi için her gruptan rastgele seçilen 6 adet sıçana üç nokta bükme testi uygulandı. Kemiklerin mekanik dayanıklılıkları sırası ile Grup IV> Grup III> Grup I> Grup II olarak ölçüldü (Tablo 4.2) (Şekil 4.3).

Tablo 4.2: Her gruptan rastgele seçilen 6 sıçanın mekanik dayanıklılığı

Denek Numaraları *	Mekanik dayanıklılık (N)			
	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
1		16	24	
2	35	12		
3			18	37
4		10	22	
5	42	18		
6			25	28
7				
8	32	15		
9				35
10	38,5		19	42
11	36			
12	46	12	15	37
13				45
14				
15				
16				
Ortalama	38,2	14,14286	21	35,8
Standart sapma	5,07543	2,733537	3,5	4,534314



Şekil 4.3: Kemik dokunun üç nokta bükme testi sonuçlarının ortalaması

4.4 Kemik iyileşmesinin radyolojik bulguları

Modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemine göre yapılan skorlamada test sonuçları: 3.91 ± 0.64 (Grup I) (Tablo 4.3), 3.5 ± 0.64 (Grup II) (Tablo 4.4), 5.08 ± 1.44 (Grup III) (Tablo 4.5), 5.43 ± 0.99 (Grup IV) (Tablo 4.6) olarak bulundu.

Tablo 4.3: Grup I sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları

Denek Numarası	Kallus Oluşumu	Birleşme (Proksimal ve distal arası)	Yeniden Yapılanma	Skor sonucu	Kallus Kalınlığı (mm)
Grup I- 1	2	1	0	3	1,6
Grup I- 2	3	1	0	4	1,8
Grup I- 3	2	2	0	4	1,8
Grup I- 4	3	1	0	4	2
Grup I- 5	3	1	0	4	3,2
Grup I- 6	4	1	0	5	2,8
Grup I- 7	2	2	0	4	2,7
Grup I- 8	3	1	0	4	2,1
Grup I- 9	3	2	0	5	1,5
Grup I- 10	2	1	0	3	1,7
Grup I- 11	3	2	0	4	2,5
Grup I- 12	2	1	0	3	2,3
Ortalama	2,66	1,33	0	3,91	2,16
Standart Sapma	0,62	0,47	0	0,64	0,51

Tablo 4.4: Grup II sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları

Denek Numarası	Kallus Oluşumu	Birleşme (Proksimal ve Distal arası)	Yeniden Yapılanma	Skor sonucu	Kallus Kalınlığı (mm)
Grup II- 1	2	1	0	3	1,2
Grup II- 2	2	2	0	4	1,3
Grup II- 3	2	1	0	3	2,4
Grup II- 4	3	1	0	4	2,2
Grup II- 5	2	2	0	4	1,9
Grup II- 6	2	1	0	3	1,5
Grup II- 7	2	1	0	3	1,7
Grup II- 8	3	1	0	4	2,2
Grup II- 9	2	1	0	3	1,3
Grup II- 10	2	1	0	3	0,8
Grup II- 11	2	1	0	3	2,1
Grup II- 12	3	2	0	5	2,4
Ortalama	2,25	1,25	0	3,5	1,75
Standart Sapma	0,43	0,43	0	0,64	0,50

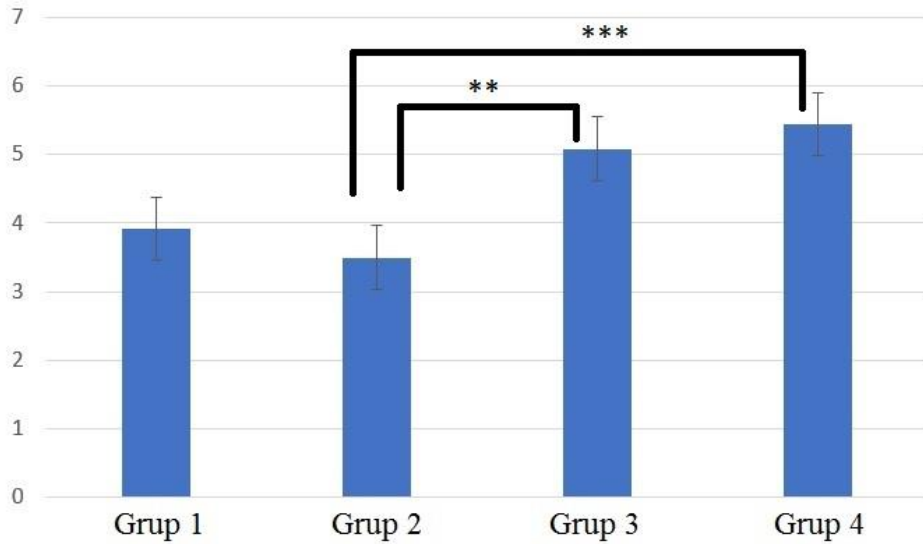
Tablo 4.5: Grup III sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları

Denek Numarası	Kallus Oluşumu	Birleşme (Proksimal ve Distal arası)	Yeniden Yapılanma	Skor sonucu	Kallus Kalınlığı (mm)
Grup III- 1	2	2	0	4	2,3
Grup III- 2	3	1	0	4	3,1
Grup III- 3	4	1	2	7	2,6
Grup III- 4	2	2	0	4	3,1
Grup III- 5	3	2	2	7	3
Grup III- 6	4	1	0	5	2,9
Grup III- 7	3	2	2	7	3,1
Grup III- 8	2	1	0	3	2,8
Grup III- 9	4	2	0	6	3,1
Grup III- 10	2	1	0	3	2,9
Grup III- 11	3	1	2	6	3,3
Grup III- 12	3	2	0	5	2,7
Ortalama	2,91	1,5	0,66	5,08	2,90
Standart Sapma	0,75	0,5	0,94	1,44	0,26

Skorlama sistemi sonuçlarına göre TZP ve SVF tedavisinin sonuçları istatistiksel olarak anlamlı gösterildi (Şekil 4.4)

Tablo 4.6: Grup IV sıçanların modifiye Lane ve Sandru skorlama sonuçları ve ölçülen kallus kalınlıkları

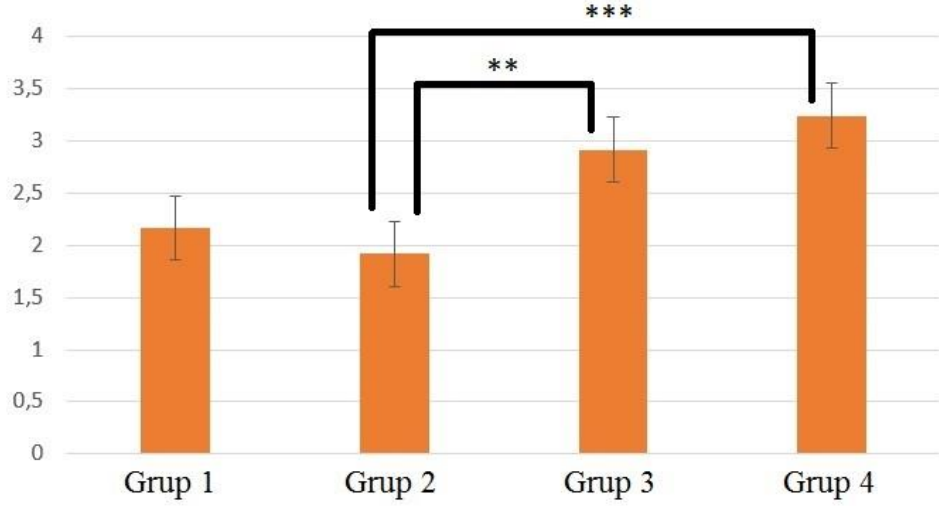
Denek Numarası	Kallus Oluşumu	Birleşme (Proksimal ve distal arası)	Yeniden Yapılanma	Skor sonucu	Kallus Kalınlığı (mm)
Grup IV- 1	3	1	0	4	2,9
Grup IV- 2	2	2	2	6	3,7
Grup IV- 3	3	1	0	4	2,9
Grup IV- 4	4	2	0	6	3,1
Grup IV- 5	2	1	2	5	3,4
Grup IV- 6	4	2	0	6	3,9
Grup IV- 7	3	1	2	6	2,6
Grup IV- 8	3	2	2	7	3
Grup IV- 9	4	2	0	6	2,7
Grup IV- 10	3	1	2	6	3,9
Grup IV- 11	3	2	0	5	3,2
Grup IV- 12	4	1	0	5	3
Grup IV- 13	2	2	2	6	3,3
Grup IV- 14	3	1	0	4	3,6
Grup IV- 15	4	1	2	7	3,8
Grup IV- 16	2	2	0	4	2,8
Ortalama	3,06	1,5	0,87	5,43	3,23
Standart Sapma	0,74	0,5	0,99	0,99	0,41



Şekil 4.4: Modifiye Lane ve Sandru skorlama sisteminin gruplar arası ortalaması

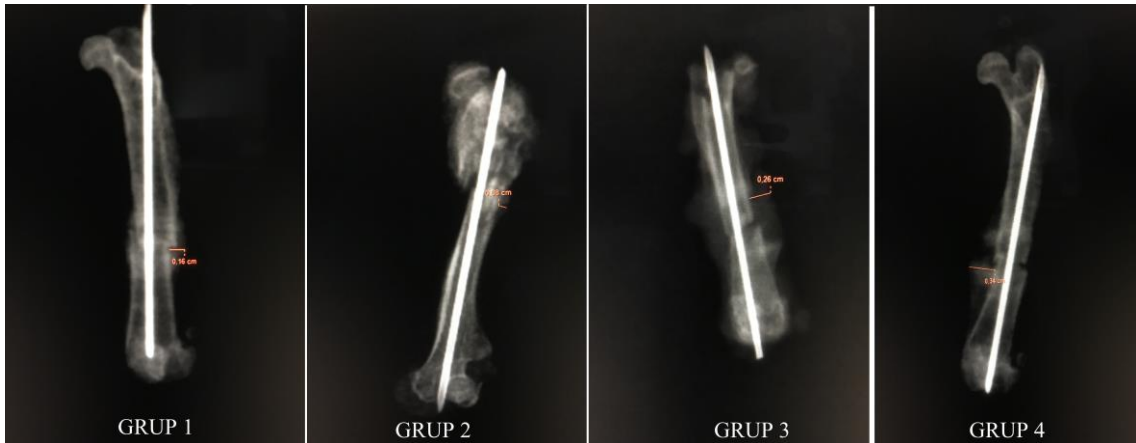
- * Grup I ile Grup II arası fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$)
- ** Grup II ile Grup III arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)
- *** Grup II ile Grup IV arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)

Kortikal kemik iyileşme bölgesinden, kallusun en dış noktasına olan kalınlıklarının ölçülmesi sonucu ortalama kallus kalınlıkları; 2.16 ±0.51 mm (Grup I), 1.75 ±0.50 mm (Grup II), 2.90 ±0.26 mm (Grup III), 3.23 ±0.41 mm (Grup IV) olarak ölçüldü (Şekil 4.5). Grup III ve IV sıçanların kallus kalınlıkları Grup II'ye göre anlamlı olarak daha kalın ölçüldü ($p<0.05$) (Şekil 4.6).



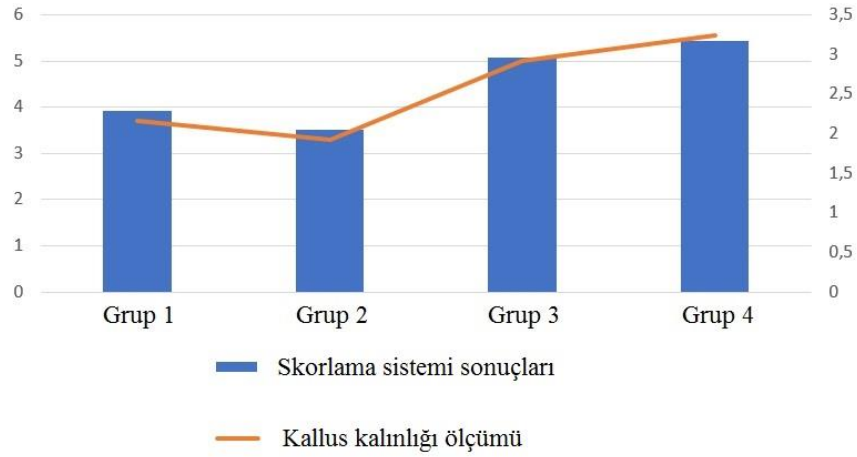
Şekil 4.5: Tüm grupların ortalama kallus kalınlıkları sonuçları (mm)

- * Grup I ile Grup II arası fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$)
- ** Grup II ile Grup III arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)
- *** Grup II ile Grup IV arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$)



Şekil 4.6: Kallus kalınlığı ölçülmesinde gruplardan örnekler

Kemik iyileşmesi skorumla sistemi sonuçları ile ölçülen kallus kalınlıklarının karşılaştırılmasında; skorumla sistemi ile kallus kalınlıkları arasında anlamlı korelasyon gözlemlendi (Şekil 4.6).



Şekil 4.7: Modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemi ile kallus kalınlığı arasındaki korelasyon

4.5 Kan örnekleri test sonuçları

Deneklerin böbrek yetmezliği için 0. gün, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan kan örneklerinde BUN, kreatinin seviyelerinde yükselme ve hemoglobin seviyelerindeki düşme anlamlı bulundu ($p < 0.05$). Normal aralık gösterilmesi amacı ile Grup I sıçanlardan (KBH olmayan) da kan alındı. Kemik iyileşmesi parametreleri için sıçanların 6. ve 12. hafta kanında PTH, D vitamini ve kalsiyum parametreleri bakıldı. TZP hazırlanması için alınan kandaki trombosit sayısı yeterli bulundu (1398 bin/mm^3).

4.5.1 Böbrek fonksiyon testlerinin sonuçları

Grup I sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası yapılan böbrek fonksiyonları testleri arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Tablo 4.7).

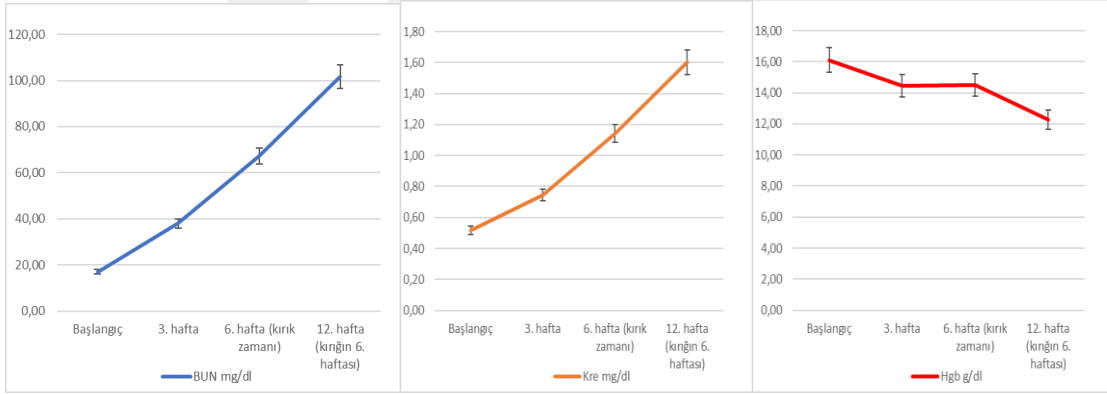
Tablo 4.7: Grup I sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası alınan böbrek fonksiyon testleri

Denek Numaraları	Kırık öncesi			Kırık sonrası 6. hafta		
	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl
Grup 1 -1	18,4	0,56	15,3	21,1	0,45	14,2
Grup 1 -2	14,8	0,51	15,6	16,1	0,49	13
Grup 1 -3	15,2	0,5	18	17,2	0,5	15,2
Grup 1 -4	14,5	0,56	16,1	16,3	0,46	14,2
Grup 1 -5	18,6	0,55	15,2	16,8	0,52	14,1
Grup 1 -6	16,1	0,5	16,2	17,1	0,5	15
Grup 1 -7	15,7	0,58	15,7	17	0,44	13,4
Grup 1 -8	18,6	0,58	16,2	17,5	0,49	14,6
Grup 1 -9	18,9	0,57	16	16,7	0,49	15,6
Grup 1 -10	17	0,52	16,7	20,7	0,47	15,4
Grup 1 -11	17,2	0,54	16,3	18,3	0,53	15,8
Grup 1 -12	16,8	0,53	15,8	17,3	0,49	15,2
Ortalama	16,82	0,54	16,09	17,68	0,49	14,64
Standart sapma	1,51	0,03	0,71	1,54	0,03	0,84

Grup II (KBH), Grup III (KBH + TZP), Grup IV (KBH + TZP +SVF) ün böbrek parametreleri açısından kan BUN, kreatinin seviyelerindeki yükselme ve hemogloblin seviyelerindeki düşüş Tablo 4.8, Tablo 4.9 ve Tablo 4.10 da gösterilmiştir.

Tablo 4.8: Grup II sıçanların deney başlangıç, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan BUN, kreatinin ve Hgb değerleri

Denek Numaraları	Başlangıç			3. hafta			6. hafta (kırık zamanı)			12. hafta (kırığın 6. haftası)		
	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl
Grup 2 -1	18,2	0,58	17	35	0,71	16,01	58,1	1,3	15	88,9	1,56	10,5
Grup 2 -2	14,6	0,48	15,8	53,9	0,82	14,1	74,1	1,02	13,3	100,3	1,49	12,4
Grup 2 -3	15,4	0,47	16	32,7	0,68	14,5	73,4	1,28	13,7	110,7	1,54	11,3
Grup 2 -4	17,5	0,52	16,4	42,3	0,79	14,58	67,9	1,25	15,2	98,7	1,62	14,5
Grup 2 -5	18,3	0,54	15,7	33,7	0,63	15	59,6	1,01	14,8	94,6	1,67	12,1
Grup 2 -6	16,4	0,51	15,8	34,3	0,67	13,2	59	0,85	14,4	99	1,64	10,7
Grup 2 -7	15,2	0,42	15,9	44,4	0,73	13,94	64,6	1,16	13,9	104,2	1,83	11,4
Grup 2 -8	17,9	0,56	16,3	38,2	0,92	14,6	59,4	1,45	15,4	95,6	1,97	13,6
Grup 2 -9	18,8	0,54	15,8	29,8	0,71	14,81	67,1	0,97	14,3	103,5	1,24	13,3
Grup 2 -10	18	0,5	16,4	35,5	0,66	14,3	70,4	1,05	15	120,7	1,59	13,8
Grup 2 -11	17,6	0,52	16,8	35,6	0,84	14	73,5	1,27	14,6	98,7	1,72	12,4
Grup 2 -12	16,6	0,57	15,4	40,1	0,78	14,4	79,5	1,09	14,2	103,9	1,36	11,2
Ortalama	17,04	0,52	16,11	37,96	0,75	14,45	67,22	1,14	14,48	101,57	1,60	12,27
Standart sapma	1,32	0,04	0,46	6,23	0,08	0,65	6,85	0,16	0,61	7,83	0,19	1,25

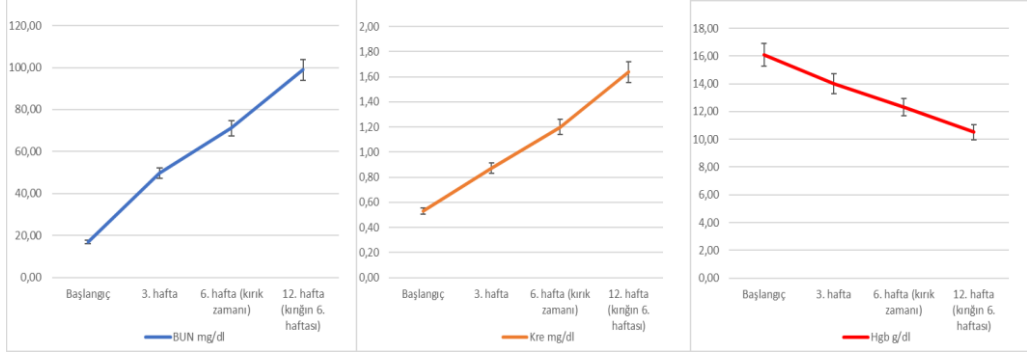


Şekil 4.8: Grup II'deki sıçanların ortalama BUN, Kreatinin ve Hgb değişimi (p<0.05)

Tablo 4.9: Grup III sıçanların deney başlangıç, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan BUN, kreatinin ve Hgb değerleri

Denek Numaraları	Başlangıç			3. hafta			6. hafta (kırık zamanı)			12. hafta (kırığın 6. haftası)		
	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl
Grup 3 -1	16,2	0,47	15,8	51,3	0,91	12,4	66,6	1,5	11,1	98,3	1,96	10,1
Grup 3 -2	16,9	0,54	16,1	48,2	0,83	14,6	59,8	1,02	12,6	95,4	1,19	11
Grup 3 -3	17,8	0,52	15,6	54,6	0,76	13,6	67,1	0,97	12,2	102,6	1,42	10,8
Grup 3 -4	17,4	0,53	16,3	32,2	0,69	14,6	60,4	1,12	12,7	110,7	1,89	10,2
Grup 3 -5	17,2	0,58	16,7	34,1	0,75	14,8	63,5	1	14,2	95,9	1,26	11,2
Grup 3 -6	16,8	0,56	15,2	52,5	1,03	13,7	74,5	1,53	12,2	86	1,82	10,6
Grup 3 -7	18	0,59	17,1	74,1	0,89	15,2	95,1	1,24	13,1	120,8	1,69	10,8
Grup 3 -8	14,7	0,46	15,6	53,7	0,99	13,4	74,1	1,25	12,5	86,2	1,79	9,5
Grup 3 -9	15,2	0,49	16,6	80	1,05	14,4	95,4	1,62	9,4	102,7	1,91	8,4
Grup 3 -10	17,9	0,56	16,7	37,8	0,71	14,8	67,9	1,06	12,2	93,1	1,88	10,7
Grup 3 -11	18,1	0,53	15,9	34,1	0,74	13,9	59,2	1,2	12,8	98,3	1,56	11,5
Grup 3 -12	16,2	0,52	15,5	45	1,12	12,7	69	0,89	12,6	97,2	1,28	11,3
Ortalama	16,87	0,53	16,09	49,80	0,87	14,01	71,05	1,20	12,30	98,93	1,64	10,51
Standart sapma	1,06	0,04	0,56	14,50	0,14	0,84	11,83	0,23	1,11	9,28	0,27	0,83

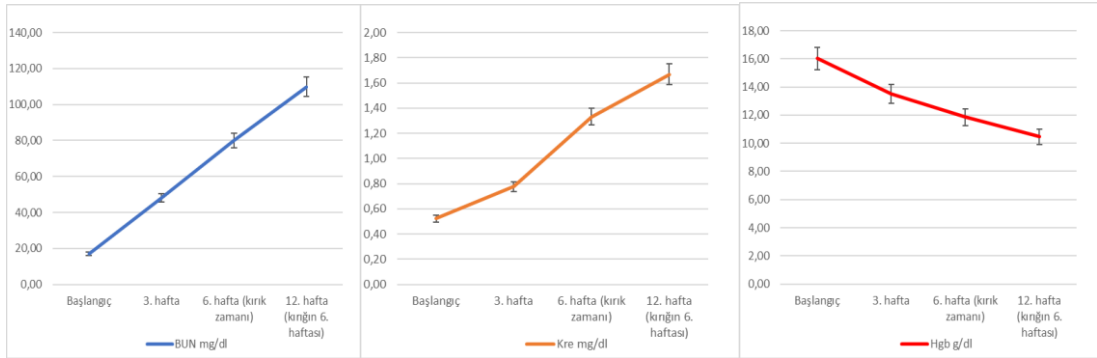
Gruplar arasındaki ortalama BUN, kreatinin ve Hgb değerlerinin zamana göre değişimi Şekil 4.8, Şekil 4.9 ve Şekil 4.10’da ifade edilmiştir.



Őekil 4.9: Grup III’deki sıčanların ortalama BUN, Kreatinin ve Hgb deęiřimi (p<0.05)

Tablo 4.10: Grup IV sıčanların deney başlangıç, 3. hafta, 6. hafta ve 12. haftada alınan BUN, kreatinin ve Hgb değerleri

Denek Numaraları	Başlangıç			3. hafta			6. hafta (kırık zamanı)			12. hafta (kırığın 6. haftası)		
	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl	BUN mg/dl	Kre mg/dl	Hgb g/dl
Grup 4 -1	16,2	0,49	16,7	38	0,8	14,3	74,5	1,53	13	112,2	1,95	10,3
Grup 4 -2	16,9	0,56	15,2	57,2	0,97	13,1	86,4	1,23	11,9	92,1	1,78	9,8
Grup 4 -3	17,8	0,53	17,1	42,6	0,71	14,8	85,3	1,45	11,8	125	1,71	10,4
Grup 4 -4	17,4	0,52	15,6	51,1	0,67	13,2	76,9	1,35	11,5	100,9	1,57	10,8
Grup 4 -5	18,3	0,54	15,8	60,1	0,96	13,8	89,2	1,57	12,3	112,7	1,64	11,7
Grup 4 -6	16,4	0,51	16,4	48,7	0,86	12,4	74,6	1,31	11,3	105,8	1,56	10,2
Grup 4 -7	15,2	0,42	16,8	53,6	0,74	12,2	83,4	1,42	10,3	119,1	1,66	9,5
Grup 4 -8	17,9	0,56	15,4	51,5	0,56	13,9	79,1	0,97	11,3	108,4	1,15	10,6
Grup 4 -9	18,9	0,57	15,3	45,1	0,8	14,3	80,6	1,5	14	105,3	1,74	11,3
Grup 4 -10	17	0,52	15,6	32,2	0,71	12,5	75,4	1,67	10,9	110,1	1,93	8,9
Grup 4 -11	17,2	0,54	16	37,5	0,62	14,8	70,1	0,94	12,4	109,6	1,4	10,7
Grup 4 -12	16,8	0,53	16,1	34,8	0,69	13,6	65,9	0,92	12,2	108,9	1,16	10,5
Grup 4 -13	17,5	0,47	15,9	39,5	0,81	14,1	77,2	1,25	12,8	105,7	1,72	11,2
Grup 4 -14	18,3	0,54	16,3	52,9	0,82	13,2	77,1	1,23	12,4	111,8	1,9	10,4
Grup 4 -15	16,4	0,52	15,8	63,9	0,74	13,8	94	1,6	11,4	109,1	1,84	10,9
Grup 4 -16	15,2	0,53	16,4	60,4	0,95	12,4	92	1,38	10,2	120,2	1,99	10,1
Ortalama	17,09	0,52	16,03	48,07	0,78	13,53	80,11	1,33	11,86	109,81	1,67	10,46
Standart sapma	1,02	0,04	0,54	9,55	0,12	0,82	7,54	0,23	0,96	7,47	0,25	0,67



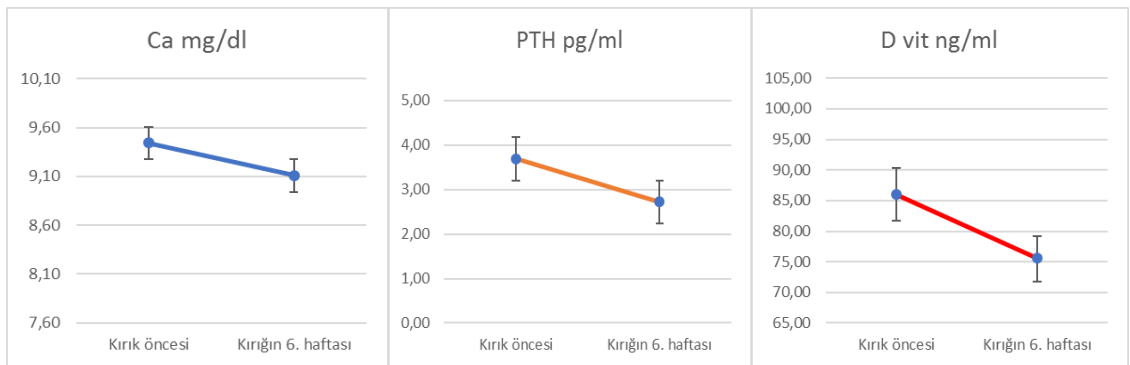
Őekil 4.10: Grup IV’deki sıčanların ortalama BUN, Kreatinin ve Hgb deęiřimi (p<0.05)

4.5.2 Kemik iyileşmesi laboratuvar testlerinin sonuçları

Tüm gruplardaki sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası ölçülen Ca, PTH, D vitamini sonuçları Tablo 4.11, Tablo 4.12, Tablo 4.13 ve Tablo 4.14’de gösterilmiştir. Gruplar arasındaki ortalama Ca, PTH ve D vitamini değerlerinin kırık öncesi ve kırık sonrası değişimi Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de ifade edilmiştir.

Tablo 4.11: Grup I sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

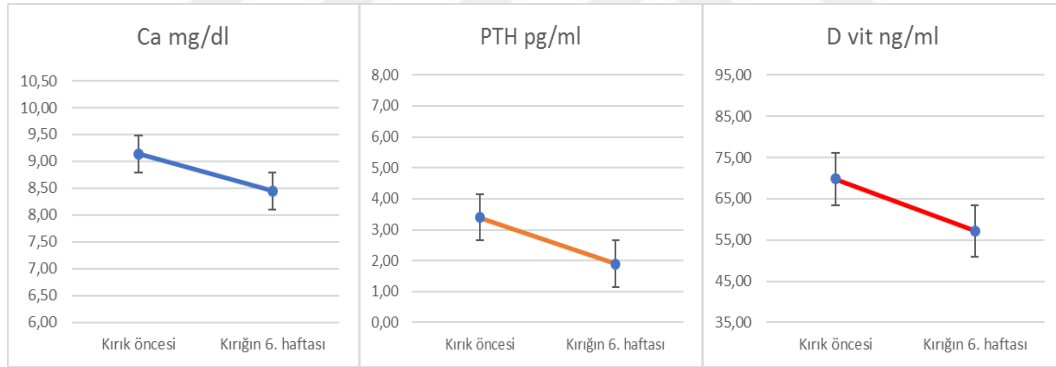
Denek Numaraları	Kırık öncesi			Kırığın 6. haftası		
	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml
Grup I -1	9,4	3,384	87,25	9,2	2,924	72,56
Grup I -2	9,1	4,362	88,69	8,7	3,015	73,45
Grup I -3	9,6	3,392	86,52	9,4	2,305	68,47
Grup I -4	9,2	3,968	85,49	8,9	2,251	71,96
Grup I -5	9,6	3,271	83,21	9,2	2,094	75,12
Grup I -6	9,7	4,181	87,44	9,3	3,335	74,07
Grup I -7	9,3	3,309	91,13	8,9	2,307	82,46
Grup I -8	9,8	4,068	88,97	9,4	3,324	84,61
Grup I -9	9,5	3,171	86,46	9,2	2,398	79,14
Grup I -10	9,4	4,042	84,63	9,1	3,44	78,85
Grup I -11	9,3	3,034	79,67	8,9	2,204	71,74
Grup I -12	9,4	4,087	82,65	9,1	3,063	73,33
Ortalama	9,44	3,69	86,01	9,11	2,72	75,48
Standart sapma	0,20	0,45	3,00	0,21	0,49	4,58



Şekil 4.11: Grup I’deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi

Tablo 4.12: Grup II sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

Denek Numaraları	Kırık öncesi			Kırığın 6. haftası		
	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml
Grup II -1	9,2	3,241	74,12	8,8	2,354	65,55
Grup II -2	9,4	3,099	72,73	9	2,71	42,03
Grup II -3	9,3	4,653	75,72	9,1	2,606	63,01
Grup II -4	9,3	3,324	69,46	9,1	1,545	61,11
Grup II -5	8,6	3,201	72,22	7,8	1,554	61,1
Grup II -6	9,9	4,027	70,51	8,2	2,624	61,59
Grup II -7	9,9	4,241	66,07	8,5	2,324	57,14
Grup II -8	9,2	3,314	64,22	8,7	1,368	53,87
Grup II -9	7,7	2,974	68,77	7,2	1,345	55,52
Grup II -10	8,9	2,384	73,54	8,4	1,305	62,81
Grup II -11	8,7	3,021	69,94	7,9	1,014	53,47
Grup II -12	9,6	3,311	60,47	8,7	1,925	49,47
Ortalama	9,14	3,40	69,81	8,45	1,89	57,22
Standart sapma	0,59	0,59	4,24	0,56	0,58	6,47



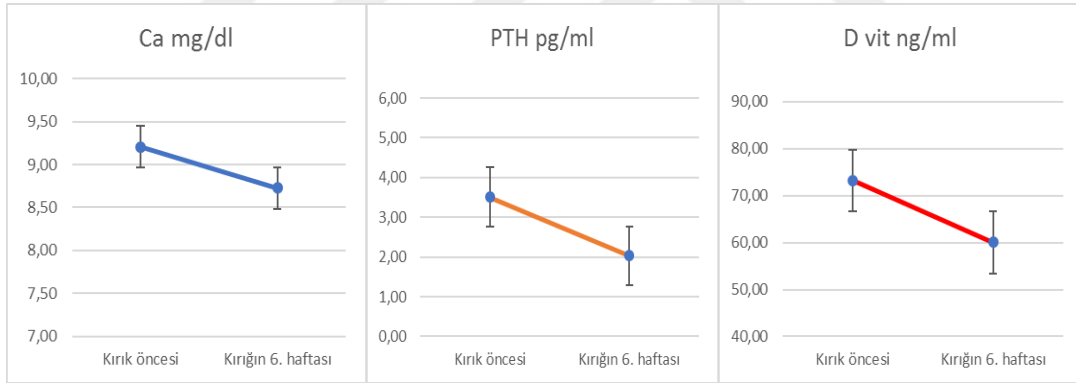
Şekil 4.12: Grup II'deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi

Grup I sıçanların kemik kırığı öncesi ortalama Ca (9.44 ± 0.20), PTH (3.69 ± 0.45) ve D vitamini (86.01 ± 3.00) değerleri kırık sonrasında sırası ile 9.11 ± 0.21 , 2.72 ± 0.49 ve 75.48 ± 4.58 olarak bulundu.

Grup II sıçanların kemik kırığı öncesi ortalama Ca (9.14 ± 0.59), PTH (3.40 ± 0.59) ve D vitamini (69.81 ± 4.24) değerleri kırık sonrasında sırası ile 8.45 ± 0.56 , 1.89 ± 0.58 ve 57.22 ± 6.47 olarak bulundu.

Tablo 4.13: Grup III sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

Denek Numaraları	Kırık öncesi			Kırığın 6. haftası		
	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml
Grup III -1	9,4	1,961	72,9	9,1	1,085	58,08
Grup III -2	9	5,624	72,9	8,4	3,035	57,51
Grup III -3	9,3	3,307	73,47	8,9	1,265	69,22
Grup III -4	9,9	3,864	72,96	9,5	2,001	51,39
Grup III -5	8,8	3,506	73,56	8,4	3,192	68,62
Grup III- 6	9,2	3,624	70,15	8,7	1,812	50,1
Grup III -7	9,3	4,625	77,66	8,8	2,901	66
Grup III -8	9,2	2,291	74,02	8,8	1,412	58,89
Grup III -9	9,1	3,92	73,07	8,7	1,825	58,24
Grup III -10	9,4	2,354	68,47	8,8	1,341	57,21
Grup III -11	8,7	3,515	73,56	7,7	2,534	60,47
Grup III -12	9,2	3,54	76,05	8,9	1,938	64,57
Ortalama	9,21	3,51	73,23	8,73	2,03	60,03
Standart sapma	0,30	0,97	2,25	0,42	0,70	5,85



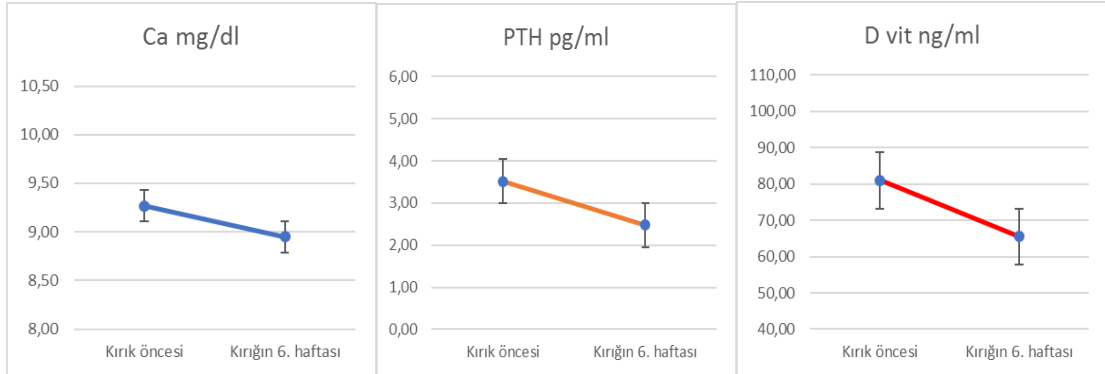
Şekil 4.13: Grup III'deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi

Grup III sıçanların kemik kırığı öncesi ortalama Ca (9.21 ± 0.30), PTH (3.51 ± 0.97) ve D vitamini (73.23 ± 2.25) değerleri kırık sonrasında sırası ile 8.73 ± 0.42 , 2.03 ± 0.70 ve 60.03 ± 5.85 olarak bulundu.

Grup IV sıçanların kemik kırığı öncesi ortalama Ca (9.27 ± 0.18), PTH (3.52 ± 0.81) ve D vitamini (81.06 ± 8.79) değerleri kırık sonrasında sırası ile 8.95 ± 0.29 , 2.47 ± 0.73 ve 65.49 ± 11.18 olarak bulundu.

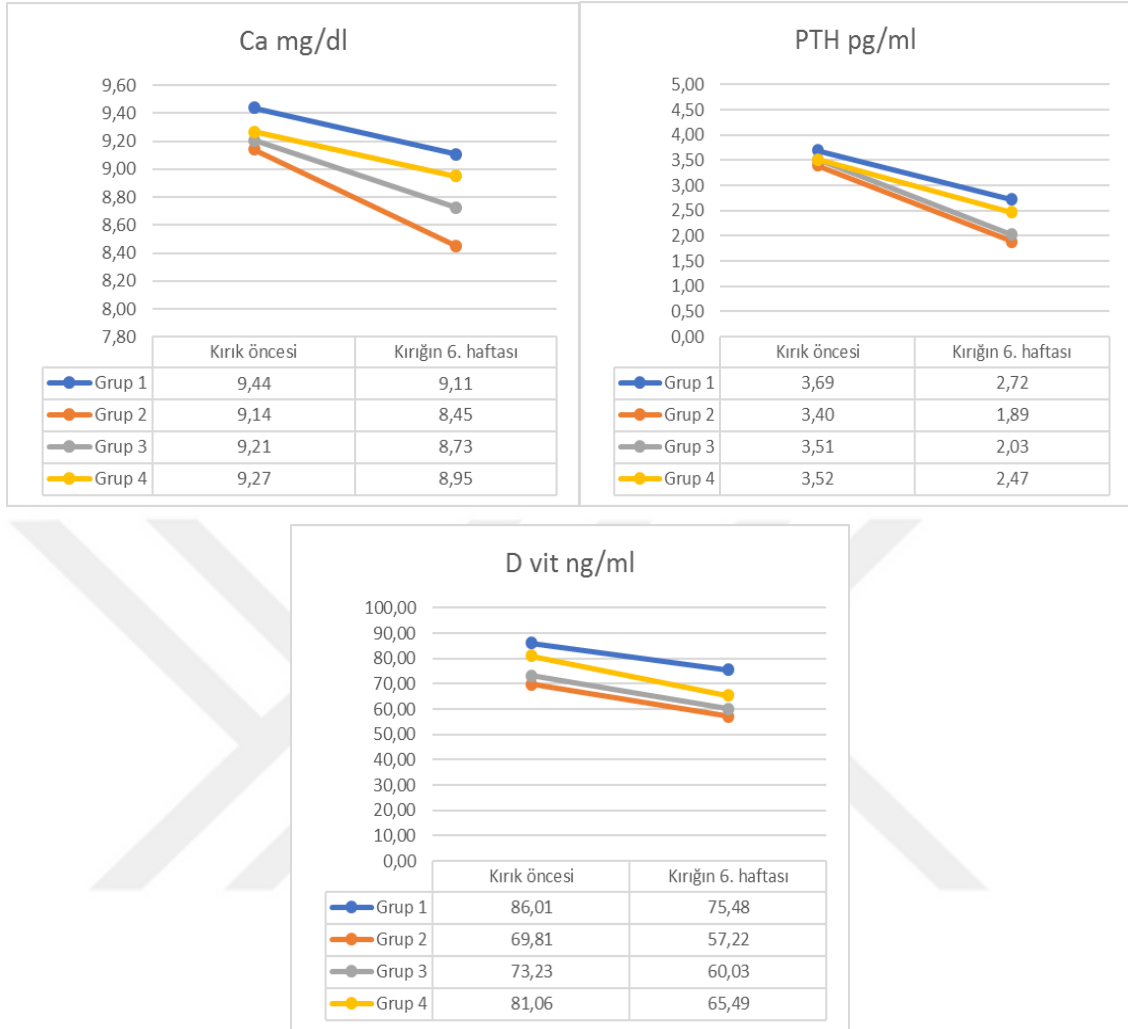
Tablo 4.14: Grup IV sıçanların kırık öncesi ve kırık sonrası Ca, PTH ve D vitamini değerleri

Denek Numaraları	Kırık öncesi			Kırığın 6. haftası		
	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml	Ca mg/dl	PTH pg/ml	D vit ng/ml
Grup IV -1	9,2	3,566	95,4	9	2,161	82,3
Grup IV -2	9,2	2,332	80,78	9,3	2,057	50,79
Grup IV -3	9,3	3,789	83,21	9,4	2,485	57,77
Grup IV -4	9,5	2,665	86,67	9,1	2,062	60,85
Grup IV -5	9,4	2,884	79,51	8,9	2,025	84,7
Grup IV -6	9,5	3,315	73,86	8,9	2,333	57,61
Grup IV -7	9,3	3,044	95,89	9	1,543	75,68
Grup IV -8	9,1	2,354	85,14	8,8	1,549	63,74
Grup IV -9	9,3	3,791	67,34	9	2,122	63,57
Grup IV -10	9,1	3,155	79,98	8,9	2,284	59,87
Grup IV -11	9,2	5,048	80,65	9	4,081	66,03
Grup IV -12	9,3	4,512	82,05	9,1	3,685	67,01
Grup IV -13	9,6	4,603	77	9,4	3,307	65,79
Grup IV -14	9,3	3,534	92,48	8,5	3,486	86,85
Grup IV -15	8,8	4,625	63,46	8,4	2,352	47,25
Grup IV -16	9,2	3,031	73,61	8,5	1,931	57,96
Ortalama	9,27	3,52	81,06	8,95	2,47	65,49
Standart sapma	0,18	0,81	8,79	0,29	0,73	11,18



Şekil 4.14: Grup IV'deki sıçanların kırık öncesi ve sonrası ortalama Ca, PTH, D vitamini değişimi

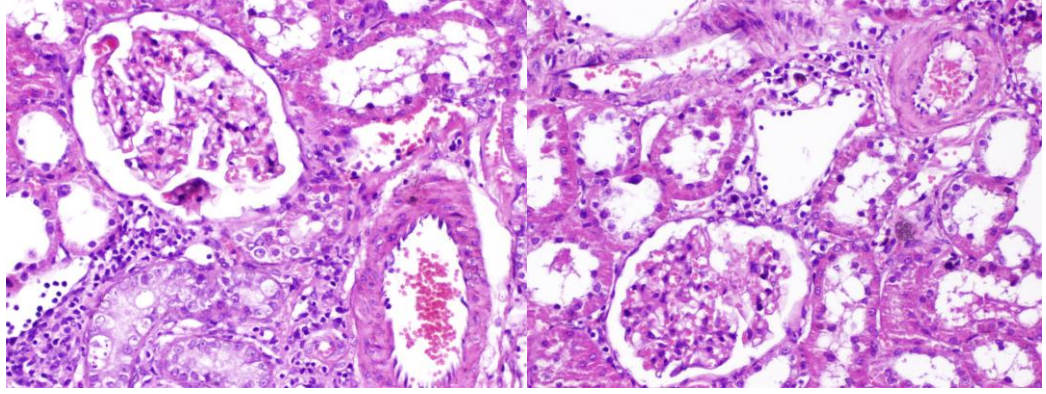
Tüm denek gruplarında kan Ca, PTH ve D vitamini sonuçlarında düşüş gözlemlendi. KBH'lı gruplardaki sıçanlarda kırık öncesi benzer kemik iyileşmesi parametreleri tespit edilmiş olup, uygulanan TZP ve SVF tedavileri sonrası vitamin ve minerallerdeki düşüş miktarı daha az oranda oldu (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Ca, PTH, D vitamini değerlerinin gruplar arası karşılaştırılması

4.6 Histopatoloji ve immunohistokimyasal değerlendirme bulguları

Mekanik stres testi uygulanmayan Grup I (n:6), Grup II (n:6), Grup III (n:6), Grup IV (n:10) sıçanların, kemik iyileşmesinin histopatolojik ve immunohistokimyasal araştırılmasında Allen skorlama sistemi, kemik mineralizasyonu, immun boya olan osteokalsin ile kemik hücreleri yoğunluğu ölçülerek skorlandı. DiI ile boyalı kök hücrelerin kemik hücrelerine dönüşümü floresan mikroskopta gösterildi. KBH'lı deneklerin 5/6 nefrektomi sonrası kalan 1/6'lık böbrekleri kemik kırığı sonrası 6. haftada sakrifiye edilmelerini takiben mikroskop altında incelendi. Böbreklerin H&E kesitlerinde irileşmiş glomerül ve hafif derecede miyointimal kalınlaşma gösteren hiperplastik arterioller gözlemlendi (Şekil 4.16).



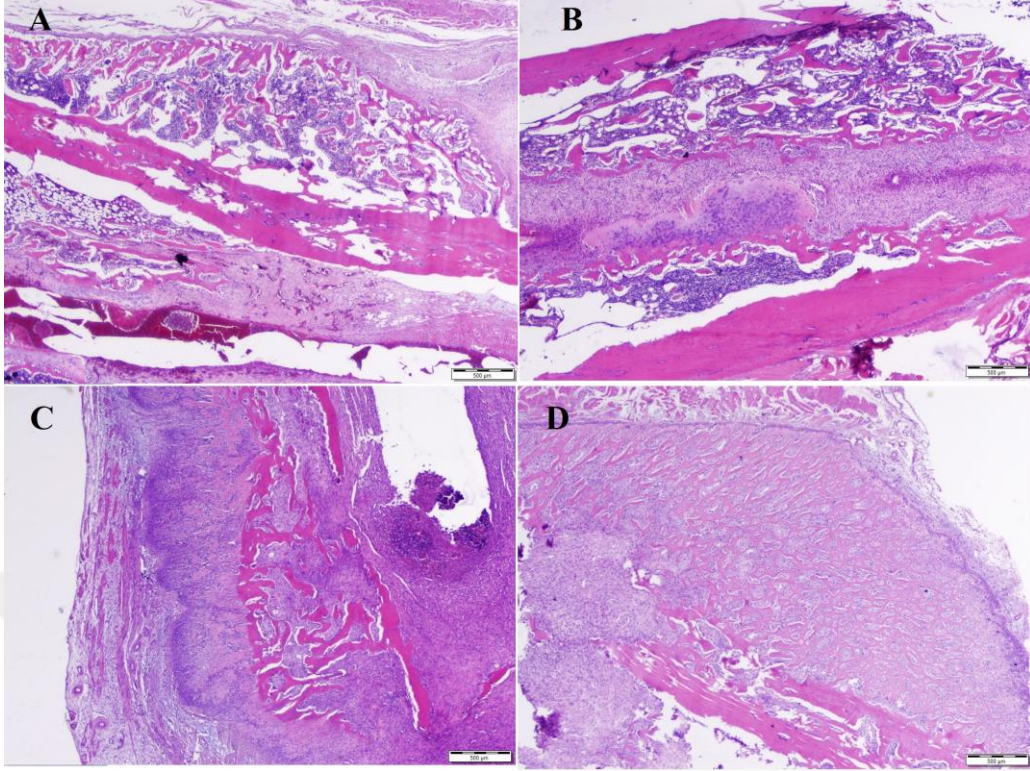
Şekil 4.16: KBH'lı böbreklerin H&E boyasında x200 büyütmede mikroskopik görünümü

4.6.1 Kemik iyileşmesinin histopatolojik değerlendirmesi

Kemik dokunun iyileşme skorlaması (Allen skorlaması) sonuçları 4.71 ± 0.99 (Grup I), 4.17 ± 0.62 (Grup II), 5.17 ± 0.90 (Grup III), 5.38 ± 0.88 (Grup IV) olarak bulundu (Tablo 4.15). Denekler kırık sonrası kallus dokusundaki kemikleşme miktarına göre değerlendirildi (Şekil 4.17).

Denek Numaraları	Allen skorlaması sonuçları			
	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
1	5,5			6
2			4	5
3	5	4		
4	3			6
5			4	4
6	4	4		
7	4	4	6	6
8			6	6
9	6	3,5	6	
10		4		
11		5,5	5	4
12				
13	-	-	-	
14	-	-	-	6
15	-	-	-	6
16	-	-	-	6
Ortalama	4,71	4,17	5,17	5,38
Standart sapma	0,99	0,62	0,90	0,88

Tablo 4.15: Kemik iyileşmesinin patolojik skorlaması olan Allen skorlaması sonuçları



Şekil 4.17: Allen skorlama sistemine göre grupların histolojik örnekleri H&E x20 büyütmede; A: Grup I, ince kallus dokusu. B: Grup II, az gelişen kemik dokusu. C: Grup III, kallus dokusunda belirgin artış. D: Grup IV, yüklü kallus dokusu

Tablo 4.16: Kemik iyileşme bölgesinde mineralizasyon şiddeti sonuçları

Denek Numaraları	Mineralizasyon şiddeti			
	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
1	1			2
2			1	1
3	1	1		
4	2			2
5			2	1
6	2	1		
7	1	2	1	2
8			2	1
9	2	1	2	
10		2		
11		1	1	2
12				
13	-	-	-	
14	-	-	-	2
15	-	-	-	2
16	-	-	-	2
Ortalama	1,43	1,33	1,50	1,63
Standart sapma	0,49	0,47	0,50	0,49

Kemik dokunun mineralizasyon miktarları 1.43 ± 0.49 (Grup I), 1.33 ± 0.47 (Grup II), 1.50 ± 0.50 (Grup III), 1.68 ± 0.49 (Grup IV) olarak bulundu (Tablo 4.16).

4.6.2 Kemik iyileşmesinin immunohistokimyasal değerlendirmesi

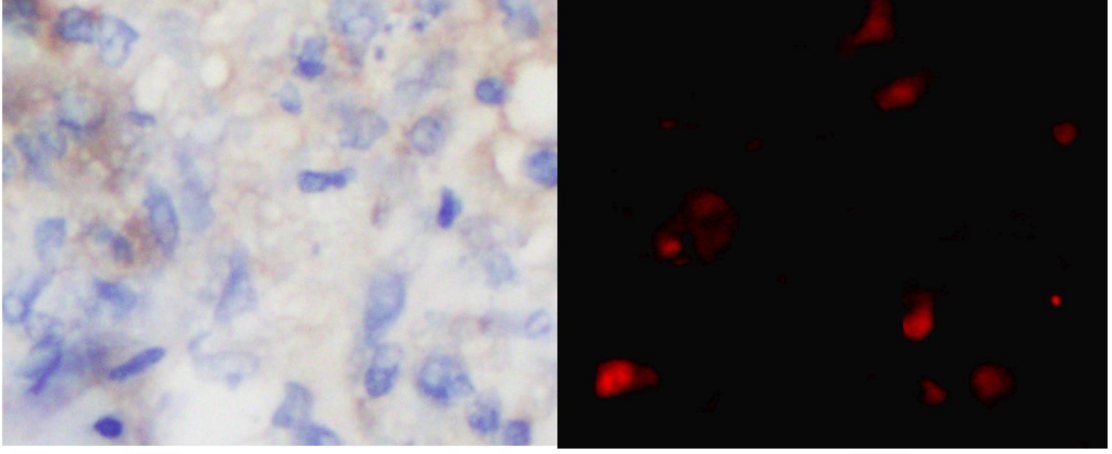
Kemik dokunun immunohistokimyasal incelenmesinde osteoklasın ile boyanma yoğunluklarına göre sırası ile: 1.43 ± 0.49 (Grup I), 1.33 ± 0.47 (Grup II), 2.17 ± 0.37 (Grup III), 2.38 ± 0.49 (Grup IV) olarak bulundu (Tablo 4.17). Grup II ile Grup IV sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı sonuç bulundu ($p < 0.05$).

Tablo 4.17: Kallus dokusunda osteokalsin ile boyanma yoğunluğu sonuçları

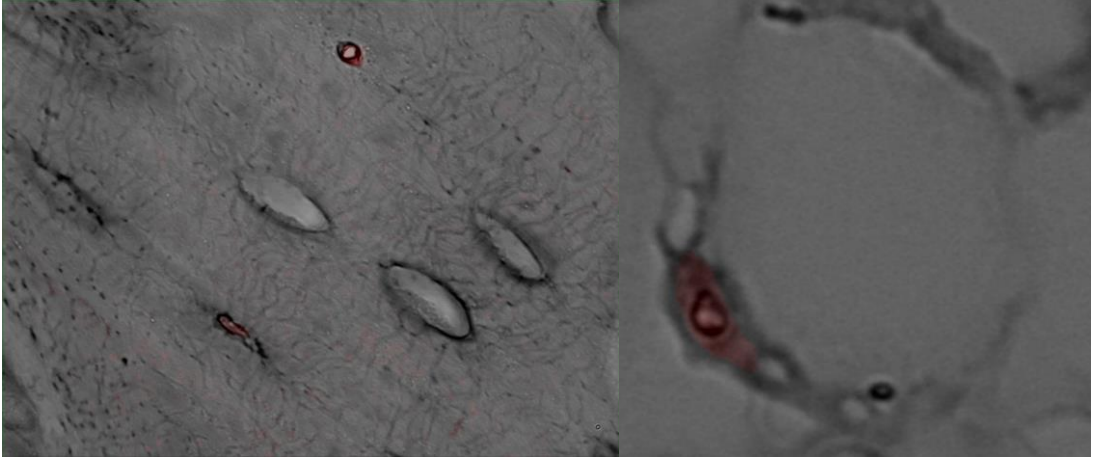
Denek Numaraları	Osteokalsin ile boyanma yoğunluğu			
	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup
1	1			2
2			2	2
3	1	2		
4	2			3
5			2	3
6	2	2		
7	2	1	2	2
8			3	3
9	1	1	2	
10		1		
11		1	2	2
12				
13	-	-	-	
14	-	-	-	2
15	-	-	-	3
16	-	-	-	2
Ortalama	1,43	1,33	2,17	2,38
Standart sapma	0,49	0,47	0,37	0,49

4.6.3 DiI boyalı kemik hücrelerinin gösterilmesi

İmmünohistokimyasal olarak; DiI ile işaretli adipöz kaynaklı kök hücrelerden transforme olan hücreler, floresan mikroskop altında 565 nm dalga boyunda incelendi. Kemik hücrelerine özel immünolojik boya olan osteokalsin ile boyalı preparatlar aynı kesitlerin DiI boyaması uygulanmış olan örnekler ile karşılaştırıldı (Şekil 4.18). Adipöz kaynaklı kök hücrelerin kemik hücresine dönüşüm gösterildi (Şekil 4.19).



Şekil 4.18: Preparatların osteokalsin ile immunohistokimyasal boyaması (x200 ışık mikroskopi) ve DiI boyalı hücrelerin gösterilmesi (x200 immunfloresan mikroskopi)



Şekil 4.19: Havers kanalları etrafında bulunan DiI boyalı hücreler ve DiI ile boyanmış (Kök hücreden dönüşüme uğramış) osteoblast hücresinin görüntüsü.

5. TARTIŞMA

Kırık iyileşmesi ve kemiğin yeniden şekillenmesi, birçok farklı hücrenin görev aldığı, kimyasal ve mekanik uyarıların etkileştiği, aktif dinamik bir süreçtir [244]. Kırık iyileşmesinin ilk basamağı kırık hematoma ile başlar, ortama göç eden inflamatuvar hücreler kemotaktik ajanlar salgılayarak hücre arası matriks oluşumunu ve hücre farklılaşmasını tetikler [245].

Kırık iyileşmesini hızlandıracak tüm gelişmelere rağmen kırıkların %5-10 kadarında gecikmiş kaynama ve kaynamama görülmektedir [246]. Yaş, sigara kullanımı, ilaçlar ve çeşitli sistemik hastalıklar gibi etkenler gecikmiş kaynama ya da kaynamama oluşumunda önemli rol oynamaktadır. Kronik böbrek hastalığı kemik iyileşmesinde olumsuz etkisi olduğu bilinen sistemik hastalıklardan birisidir. KBH'ın ABD'de erişkin nüfusun %11'ini etkilediği tahmin edilmektedir [1]. Çok sayıda bireyi etkileyen KBH, kemik kırığı iyileşmesi konusunda ciddi sorunlara yol açması nedeni ile araştırma yapılması gereken ciddi bir konudur.

Çalışmada deneysel KBH oluşturulabilecek, kemik iyileşmesi parametreleri için uygun denek modeli araştırıldı. Birçok yayına bakıldığında sıçanların travma, KBH gelişimi, TZP tedavisi ve SVF çalışmalarında kullanıldığı görüldü [84,122,242]. Ayrıca sıçanlarda kırık oluşturma modelinin ilgili çalışmalarda iyi tarif edilmiş olması denek olarak sıçan kullanılmasında etkili oldu [247].

Denek sayıları ve çalışma süresi belirlenirken literatürde daha önce yapılan kemik iyileşmesi çalışmalar örnek alınmıştır [69, 246]. Anestezi ile cerrahinin etkisi de göz önüne alınarak istatistiksel power analiz sonucunda her grup en az 12 denekten oluşturulmuştur. Herhangi bir çalışmada istatistiksel anlamlılık elde etmek için gereken denek sayısı en az 6 adettir [248]. Çalışmada gruplardan mekanik stres testi ve histopatolojik araştırma için bakılan örnek sayısı yeterli miktardadır.

Çalışma süresince toplam 62 sıçanla çalışıldığından, hayvanların barındırıldığı kafeslerin üzerine hangi grup olduğu yazılmasına rağmen, tüm deney süresince kilo değişimi takibi, kırık modeli uygulanması, kan alınması sırasında ve kafes temizliği yapılırken grupların birbirine karışmaması için her gruptaki deneklerin kuyruklarına

denek numarası verilerek denekler işaretlenmiştir. İşaretlemeler zaman içinde kaybolabilmesi nedeni ile haftalık yenilenmiştir. Hayvanlar her kafeste en fazla 4 sıçan olacak şekilde ayrı ayrı kafeslerde tutulmuşlardır.

Kemik kırığı oluşturulmasında ve kırığın sabitlenmesinde literatürde tarif edilmiş birçok yöntem mevcuttur. Sıçan deneylerinde kullanılmak üzere özel dizayn edilmiş fiksasyon cihazları olmakla beraber deney maliyetini ciddi anlamda arttırmaktadır. Holstein ve ark. kapalı kırık sabitlemesinde intramedüller olarak matkap yardımı ile uygulanan mikrovida 'MouseScrew' kullanmıştır. Femur distal kısmındaki segment yuvarlak ve kalça eklemine ulaşan kısmı yivli olan sistemin kırığın beşinci haftasında yeterli kemik iyileşmesi sağladığı belirtilmiştir [249].

Matthys ve ark. femur kırığı modelinde kırık oluşturulacak bölgeyi izole edecek bir aparat kullanarak ciltten açıkları kesi ile mikro boyutta gigli teli yardımı ile kemik kırığı oluşturmuştur. Kırık sonrası aparat üzerinde sabit kalan kırık kemik dört delikli plak ve vida ile sabitlenmiştir. Ayrıca internal fiksasyon yöntemi uygulaması ile maksimum stabilite sağlandığı iddia edilmektedir [250].

Sıçanlara özel üretilen bir başka cihaz da sıçan eksternal fiksatörüdür (Research Implant Systems, AO Foundation, Davos, Switzerland). Osteotomi sonrası kemik distraksiyonlarında ideal kullanım alanı olan eksternal fiksatörler kemik dokuda yeterli stabilizasyon sağlayabilmektedir [251].

Çalışmada maliyet düşürülmesi ve uygulama kolaylığı nedeni ile intramedüller fiksasyon yöntemi tercih edildi. Ayranıcı B.'nin çalışmasında tarif edilen yöntemle benzer şekilde intramedüller 21 gauge iğne (yeşil iğne) uygulandı [252]. Kırık kemik parçalarının rotasyonunun engellenmesine yönelik enjektörün uç kısmındaki plastik kısım korunarak kemik içerine gömüldü. İntramedüller fiksasyon yöntemleri her ne kadar dikkatli uygulansa da literatürde yüksek rotasyon oranları bulunmaktadır [250]. Majkowski ve ark. 43 hasta içeren çalışmasında 22 hastada çeşitli derecelerde kötü kaynama ve kısalık tespit etmişlerdir. 10 hastada 10°den fazla malrotasyon, 10 hastada 5°den fazla valgus, 6 hastada 5°den fazla varus, 6 hastada 2cm den fazla kısalık, 2

hastada kaynamama ve 1 hastada da derin sepsis geliştiğini belirtmişlerdir [253]. Kırık yönteminde farklı olarak üç nokta bükme kırığı prensibinin kontrolsüz kırık oluşturduğu düşünülerek kontrollü ve aynı noktadan kırık oluşturmak üzere tur motoru (Dremel 3000, Model 255) ve elmas matkap ucu kullanıldı. Kemik kırığı modeli, fiksasyon yöntemi, böbrek hastalığı oluşturulması ve diğer parametreler için 4 sıçan üzerinde pilot çalışma yapılarak yöntemde düzeltmeler yapıldı.

Kemik iyileşmesinin ve olgun kallus oluşumu için literatürde en az 6 hafta süre beklenmesi önerilmektedir [254]. KBH'lı sıçanların cerrahi 5/6 nefrektomi operasyonu geçirmesi sonrası literatürde tarif edilen maksimum yaşam süresi 13 hafta olarak belirtilmektedir [11]. Çalışmada KBH'nın gösterilmesi için 6 hafta beklendikten sonra maksimum sıçan yaşam süresi hesaplanarak kırık kallus oluşumu için 6 hafta beklendi.

Çalışmadaki 2, 3 ve 4. Gruptaki hayvanlara, ilerleyici renal kitle ve fonksiyon kaybına neden olacak tek seanslı 5/6 nefrektomi modeli uygulandı [234]. Cerrahi yöntemlerden üriner obstrüksiyon modeli hidronefroz temelli KBH çalışmalarına uygun olduğu için tercih edilmedi. Diğer bir yöntem olan kimyasal model nefrotoksik ilaçların deneklerin diyetine katılarak ilaç kullanımının uzun sürede belirsiz oranlarda etki göstermesinden dolayı çalışmada kullanılmadı. Gagnon ve ark. cerrahi modeli iki ayrı seansta olacak şekilde tarif etmiştir [118]. Bu cerrahi yöntemi Seth ve ark. tek seans olarak modifiye etmiştir [234]. Çalışmada ek cerrahi komplikasyonlardan kaçınmak amacı ile tek seanslı nefrektomi modeli tercih edildi. Seth ve ark. Tarafından sıçanların flank bölgesinde iki ayrı kesi ile nefrektomi uygulanmıştır. Çalışmada iki ayrı kesi yerine abdominal bölge orta hat kesisi tercih edilmiştir. Bu yaklaşımın dezavantajı, bağırsakların ekartasyonu sırasındaki manüplasyonların daha önceden gösterilen bağırsak anslarında ödem, distansiyon ve nekroza neden olabilmesidir [108].

Kemik kırığı oluşturulan KBH'lı sıçanlara kemik dokunun düzgün iyileşmesini sağlayacak yöntemleri tespit etmek amacı ile literatür tarandı. Doku mühendisliği çalışmaları [247], indometazin ve aspirin gibi ilaçların [241] kemik iyileşmesi üzerine olumlu etkilerinin çalışılmış olması ve cerrahi yöntemlerin daha kanıtlanabilir olması nedeni ile çalışmada doku iyileştirici potansiyeli yüksek olan SVF ve TZP tedavileri tercih edildi. TZP uygulamasının büyüme faktörleri ve iyileşme regülasyonu görevleri

dışında tercih edilmesinin diğer bir nedeni kök hücreleri barındıran SVF'nin taşınabilmesi ve iyileşme bölgesinde kalabilmesi için TZP'nin kalsiyum glukonat ile jelleştirilmiş halinin en ideal taşıma araçlarından biri olmasıdır [255]. TZP taşınmasında kalsiyum fosfat çimentosu [256] ve hidrojel yapışkanı [257] gibi taşıyıcılar yabancı cisim reaksiyonu riskini engellemek amacı ile tercih edilmedi.

Kök hücrelerin farklı hücrelere farklılaşma yeteneklerinden dolayı doku rejenerasyonunda kullanılmak üzere çok sayıda çalışma yapılmıştır. Etik sorunlardan ötürü klinik araştırmalar ve tedaviler mezenkimal dokudan kaynaklı kök hücreler üzerine yoğunlaşmıştır. Birçok dokuda bulunmasına rağmen MKH'nin en yoğun olarak bulunduğu dokular kemik iliği ve adipöz dokudur. Zuk ve ark'nın yaptığı çalışmada adipöz dokunun mezenkimal hücrelerden oldukça zengin olduğu gösterilmiş ve kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere göre fonksiyonel olarak farklı olmadığı gösterilmiştir [179]. Ayrıca AKKH'nin elde edilmesi kemik iliği kaynaklı kök hücre eldesine göre daha basit, daha az travmatik ve daha az ağrılıdır.

Adipöz kaynaklı kök hücrelerin kültüre edilerek ya da kültürde elde edilmeden SVF halinde dokuya verilmesi arasında fark gösterilememiştir [142,143]. Ferreira ve ark'ın yaptıkları çalışmada ise sıçanlarda psödoartroz yapılan alana diğer sıçanlardan alınan heterolog MKH'nin verilmesinin takiben farklı bir gruba kültüre edilip çoğaltılan kök hücre verildiğinde kültüre edilmemiş kök hücrelerin (SVF) kültüre edilmiş kök hücrelere göre tedavide daha üstün olduğu gösterilmiştir [258]. Başka bir çalışmada hem kemik iliği kökenli MKH'lerin hem de adipöz kökenli MKH kullanılmış ve doku damar sayısının, adipöz kökenli MKH grubunda, kemik iliği kökenli MKH grubuna göre anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür [243].

Çalışmada SVF inbred hayvanlardan elde edildi. Literatürde inbred hayvanlardan elde edilen adipöz kökenli kök hücrelerin immünolojik redde uğramadan farklılaşabildiği ve doku rejenerasyonu kapasitelerinin normal olduğu gösterilmiştir [4].

SVF tedavisinin osteoblastik aktiviteye ve kemik formasyonuna olumlu katkısı olduğunu gösteren birçok çalışma mevcuttur [259]. Uysal ve ark. adipöz kökenli MKH'lerin kemik dokuda iyileşmeyi hızlandıran TGF ile FGF düzeylerini arttırdığını

bulmuşlardır [132]. Ayrıca AKKH'lerin başlıca indirekt yani parakrin mekanizma üzerinden etkinlik gösterdiği savunulmaktadır [243]. Taguchi ve ark.'nın çalışmasında kemik iliği hücrelerinin göçü ve kemik tamirine olan katkısı değerlendirilmiştir. Bu çalışmada GFP-şimerik farelerin femurlarında oluşturulan kırıklardan sonra kuyruk veninden kemik iliği verilerek takip edilmiştir. Kırık bölgesindeki kallus dokusu içinde ve kemik çevresindeki hücrelerin hepsinin GFP pozitif olduğu yani MKH'nin osteoblastlara dönüştüğü kesin olarak gösterilmiştir [260]. Horwitz ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada osteogenezis imperfektalı çocuklarda MKH verilmesi sonrası osteblastik farklılaşma ve kemik mineral dansitesinde artma olduğu gösterilmiştir [261].

Başka bir çalışmada tavşanların her iki tibialarında defekt oluşturularak eksternal fiksator uygulanmış. Defekt bölgelerinden birine MKH lokal olarak verilmiş ve diğer tibia kontrol grubu olarak kullanılarak hiçbir şey verilmemiştir. Uygulamanın 15. günü ve bir ay sonra yapılan radyolojik ve histokimyasal çalışmada MKH uygulanan tarafta daha hızlı iyileşme sağlandığı ve eksternal fiksatorün tutulma süresinin kısaldığı gösterilmiştir [262]. Literatürde MKH'nin kemik kırığı bölgesine uygulamanın sistemik uygulamaya göre üstün olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [263, 264]. Her ne kadar MKH'lerin sistemik etkilerinin kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri gösterilmiş olsa da çalışmada daha iyi bir yöntem olan kırık bölgesine SVF uygulanması tercih edilmiştir.

Kemik iyileştirmesini olumlu etkileyen diğer bir yöntem TZP tedavisidir. Trombositlerin salgıladıkları büyüme faktörleri ile kemik iyileşmesi sürecini hızlandıran ve arttıran etkileri mevcuttur [265]. Literatürde TZP'nin yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı ve arttırdığına yönelik çalışmalar bulunmaktadır [266,267]. Nagata ve ark. tavşanların kalvariumlarında yaptıkları kritik boyuttaki kemik defekti sonrasında otogreft ile otogreft-TZP kombinasyonunu karşılaştırmışlar ve dördüncü haftada otogreft-TZP grubunda sadece otogreft uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı kemikleşme göstermişlerdir. Deneyin 12. hafta sonuçlarında ise birbirine yakın sonuçlar elde edilmiştir [268].

Gumieiro ve ark. yaptığı çalışmada TZP, otogreft ve TZP-kemik iliği kaynaklı stromal hücre karışımının kritik boyuttaki tavşan kalvarial defektine uygulamışlardır. Tek başına TZP grubunda tamirin en alt seviyede olmasına rağmen kemik iliği kaynaklı stromal hücre-TZP karışımında anlamlı derecede yeni kemik oluşumu tespit edilmiştir [269]. Çalışmada literatür sonuçlarına benzer şekilde SVF ve TZP verilen grupta kemik iyileşmesi sadece TZP verilen gruba göre daha iyi sonuçlanmıştır.

SVF çalışmalarında adipöz kaynaklı kök hücre eldesi için en sık kullanılan donör saha inguinal bölgedir. İnguinal bölgeden yağ doku alınması sırasında her hayvan için yaklaşık 1-2 gr adipöz doku elde edilebilmektedir. Bu miktar KBH modeli uygulanan sıçanlarda ağırlık kaybı ve sistemik nedenlere bağlı olarak azalmaktadır. Çalışmada SVF ve TZP eldesi için 10 sıçan kullanılmıştır. KBH'ın kök hücre fonksiyonlarını bozduğu bilinmektedir bu nedenle SVF tedavisi uygulanan sıçanlara verilecek kök hücrelerin KBH'lı sıçanlardan alınması, sağlıklı sıçanlardan alınan kök hücrelere göre fonksiyonel olarak daha benzer olacaktır. Donör sıçanlara 5/6 nefrektomi modeli uygulandıktan sonra 6 hafta takip edilerek böbrek hastalığı oluşturulduğu biyokimyasal ve patolojik olarak kanıtlandı. Bu sıçanlar Ogawa ve ark.'nın yayınlamış olduğu protokole uygun olarak SVF eldesi için kullanılmıştır [235].

Kemik kırığı oluşumu sonrası gecikmiş veya düzgün olmasa da kemik kırık hatlarının teması durumunda değişik seviyelerde iyileşme gerçekleşecektir [251]. Kemik iyileşmesi değerlendirilmesinde biyokimyasal ve patolojik yöntemler hücresel düzeyde kemik iyileşmesini gösterebilmektedir ancak kemik dokunun dayanıklılığının mekanik olarak gösterilmesi klinik uygulamada önem arz eder. Mekanik değerlendirmede tensil kuvvet testi, kompresyon yöntemleri, makaslama kuvveti uygulaması, bükme yöntemleri, torsiyon yöntemleri vb. bulunmaktadır [270]. Çalışmada dayanıklılık ölçülmesine en uygun yöntem olan üç nokta bükme testi (three point bending) kullanılması planlandı [239]. Mekanik stres testi için her gruptan rastgele seçilen 6 sıçana üç nokta bükme testi uygulandı. Kemiklerin mekanik dayanıklılıkları sırası ile Grup IV> Grup III> Grup I> Grup II olarak ölçüldü. Sağlıklı sıçanların kırık uygulanmayan femur dokularında dayanıklılığı aynı sıçanın kırık olan

kemiğine oranla ortalama 5 kat daha kuvvetli olduğu bulunmuştur. Kemik kırığı sonrası bekleme süresinin arttırılması aradaki farkın azalacağını düşündürmektedir.

Deneyin bitiminde (12. haftada) tüm sıçanların sakrifiye edilmelerini takiben kallus dokularının miktarı ve kemiğin şekli açısından oluşan farklar gruplar arasında karşılaştırıldı. Morfolojik olarak kallus dokusu miktarı ve kemiğin düzgün iyileşmesi sırası ile Grup IV> Grup III> Grup I> Grup II olarak gözlemlendi. Ayrıca kemik iyileşmesi ve kallus değerlendirilmesine yönelik sıçan femurlarında direkt grafi ve BT görüntülemesi yapıldı. Mikro-BT kemik değerlendirilmesinde en ideal yöntemdir [271]. Çalışmada mikro-BT cihazının hastanemizde bulunmamasından ötürü benzer verilerin elde edilebileceği standart BT cihazı kullanıldı. Elde edilen direkt grafi ve BT verileri birleştirilerek yöntemde standart sağlandıktan sonra sıçanların femurları modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemine göre değerlendirildi [240]. Modifiye Lane ve Sandru skorlama sistemine göre yapılan skorlamada test sonuçları: 3.91 ±0.64 (Grup I), 3.5 ±0.64 (Grup II), 5.08 ±1.44 (Grup III), 5.43 ±0.99 (Grup IV) olarak bulundu. Değerlendirme yöntemi sırasında belirli parametrelere bakıldığında hataların azaltılmasına yönelik her direkt grafi ve BT sonucu kör olarak ikişer defa değerlendirildi ve sonuçlar arasında farklar bulunması durumunda ortalama değerler alındı. Skorlama sırasında kortikal kemik iyileşme bölgesinden, kallusun en dış noktasına olan kalınlıklarının ölçülmesi sonucu ortalama kallus kalınlıkları; 2.16 ±0.51 (Grup I), 1.75 ±0.50 (Grup II), 2.90 ±0.26 (Grup III), 3.23 ±0.41 (Grup IV) olarak ölçüldü. Literatürde bulunun kök hücre tedavisi çalışmalarının çalışmada bulunan kök hücre etkilerine benzer şekilde kemik kitlesini arttırdığı bulundu [272].

KBH'nin biyokimyasal olarak değerlendirilmesine yönelik 0, 3 ve 6. hafta kanlarında BUN, kreatinin ve hemoglobin bakılması önerilmektedir [119]. Çalışmada sıçanların böbrek değerlerinin değişiminin daha ileri seviyedeki değişikliklerinin gösterilmesi için 0, 3, 6 hafta kanlarına ek olarak 12. hafta kanları alınarak yöntem iyileştirilmiştir. Referans değerlerin kontrolü ve kemik kırığının böbrek fonksiyonları üzerindeki değişimlerinin gösterilmesine yönelik KBH modeli uygulanmamış olan sıçanlardan (Grup I) aynı sürelerde kan alınmıştır. İnsanlarda KBH takibinde 24 saatlik idrarda GFH hesabı altın standart olarak değerlendirilse de hayvan modellerinde

metabolik kafes temininin zorluğu nedeni ile KBH tanısında ağırlık takibi, kan sonuçları takibi ve patolojik glomerüler analiz yöntemleri kullanılmıştır.

Ağırlık değişimi tespitine yönelik sıçanlar deneyin başlangıcı, deneyin 3, 6 ve 12. haftalarında tartıldı. Grup II, III ve IV de bulunan KBH'li sıçanların ağırlık değişimi literatüre benzer şekilde anlamlı olarak bulundu [273]. Shobeire ve ark.'nın yaptıkları literatür taramasında 5/6 nefrektomi sonrası serum kreatinin seviyesinin normal değerlerin 2.2 katına ulaştığı gösterilmiştir [274]. Gagnon ve ark.'nın 5/6 nefrektomi sonrasında serum BUN seviyesinin 1.5- 4.8 katına çıktığını bildirmiştir [118]. Çalışmada KBH'na yönelik yapılan laboratuvar testleri serum BUN ve kreatinin seviyelerinin yaklaşık 3- 4 katına çıkması ve hemoglobin seviyelerindeki düşüş KBH modelinin oluşturulduğunu desteklemektedir. KBH modeli sonrasında beklenen yaşam süresi ciddi miktarda azalsa da kemik iyileşmesinin geç dönem sonuçlarının araştırılması için kemik kırığı sonrası sürenin 6 haftadan daha uzun tutulması kemik iyileşmesi çalışmaları için önemli bilgi edinilmesini sağlayacaktır.

Kemik iyileşmesinin biyokimyasal değerlendirilmesine yönelik PTH, D vitamini ve kalsiyum değerlerine bakılmaktadır. Çalışmada tüm sıçanların 6 ve 12. haftada KBH değerlendirilmesi için kan alındığı sırada, kemik iyileşmesi parametreleri olan PTH, D vitamini ve kalsiyum bakılmak üzere fazladan 1 cc kan alındı. Nefrektomi uygulanmış deneklerde serumda PTH, D vitamini ve kalsiyum seviyelerinde azalma gözlenmektedir [275]. Mevcut literatür bilgileri ile benzer şekilde tüm denek gruplarında kan PTH ve D vitamini ve Ca sonuçlarında düşüş gözlenmiştir. KBH'lı gruplardaki sıçanlarda kırık öncesi benzer kemik iyileşmesi parametreleri gözlenmekte iken uygulanan TZP ve SVF tedavileri sonrası vitamin ve mineral düzeyinde daha düşük oranda azalma gerçekleşmiştir.

Kemik iyileşmesinin histopatolojik incelemesi kemik birleşmesi ve kırıkta oranın temel alındığı sınıflandırma kullanılarak yapıldı [241]. Allen ve ark.'nın tanımladığı yöntemde yedi farklı skorlama mevcuttur. Bu skorlama sisteminde skor 5 (Tamamlanmamış kemik birleşmesi/ileri seviyede kemikleşme) ile skor 6 (Tam kemikleşme) arasındaki sınır çok geniş bırakılmıştır. Allen skor 6, tanımında kemik iyileşmesi dokusunun tamamının kemik dokudan oluşması olarak belirtilmektedir.

Kemik iyileşmesi sırasında kemikleşme öncesinde kırıkta model oluşmaktadır bu neden ile az da olsa kırıkta doku bulunmak zorundadır. Çalışmada %10 ve altında kırıkta oranına sahip olan kemik iyileşmesi dokuları Allen skor 6 olarak kabul edilmiştir. Çalışmada Allen skorlaması sonuçları; 4.71 ±0.99 (Grup I), 4.17 ±0.62 (Grup II), 5.17 ±0.90 (Grup III), 5.38 ±0.88 (Grup IV) olarak bulundu. Sonuçlar kök hücre tedavisinin kemik iyileşmesini destekler nitelikte ve literatür ile uyumlu olarak bulundu [276]. Histopatolojik inceleme sırasında kallus dokusunun miktarı ile ilgili dikkat çekici noktalar gözlemlendi. Grup III teki preparatlarda Grup IV'a göre daha az kırıkta mevcuttu (Grup III'te ortalama kırıkta oranı %10) ve Grup IV teki kallus dokusunun hacmi diğer gruplardan daha büyük olarak ölçüldü. Grup III'te erken dönemde daha az organize kemik doku olmasına rağmen hızlı iyileşme gözlenmiştir. SVF tedavisi uygulanan grubun (Grup IV) kallus miktarındaki fazlalıkla birlikte remodelizasyon parametrelerinin (trabeküler formasyon, hücre dizilimi vb.) diğer gruplara göre daha iyi olduğu gözlemlendi. Kallus dokusunun yapısı, kök hücre tedavisinin kemik remodelingi düzenlemesi ve osteoklastların aktivasyonu nedeni ile erken dönemde kemik dokunun dayanıklılığını geciktirse de geç dönemde kemik iyileşmesi bulguları daha düzenli olacaktır.

Kemik iyileşmesi sırasında Grup I sıçanlarda fibröz doku ve fibrokartilaginöz doku yani iyileşme dokusunun erken ve ileri aşamaları eş zamanlı gözlenmektedir. Grup I ile Grup III ve IV karşılaştırıldığında fibrokartilaginöz alanlar Grup III ve Grup IV'te gözlenmemiştir. Bu nedenle TZP ve SVF tedavisi kemik matürasyonuna olumlu katkıda bulunmuştur. Grup I ile Grup II karşılaştırıldığında skorlama bir miktar düşük bulunmuş olup yapısal olarak anlamlı fark gözlenmemiştir. Ayrıca kemik dokunun sağlamlığının gösterilmesinde kemik doku mineralizasyonu açısından üç farklı seviye olarak skorlandı. Kemik dokunun mineralizasyon miktarları 1.43 ±0.49 (Grup I), 1.33 ±0.47 (Grup II), 1.50 ±0.50 (Grup III), 1.68 ±0.49 (Grup IV) olarak bulundu.

Kemik hücrelerinin diğer dokulardan ayrılmasında immunhistokimyasal boya olan osteokalsin boyası kullanıldı. Sitoplazmik boya olan osteokalsin; osteoblastlarda ve osteoklastlarda değişken derecelerde pozitiflik göstermesi nedeni ile değerlendirme kallus alanlarındaki aktif osteoblastlardaki boyanma şiddeti (staining intensity) ile

yapılmıştır. Ağırlıklı boyanma paterni dikkate alınarak bu değerlendirme üç kademeli olarak skorlandı. Tek bir patoloğ tarafından kör olarak değerlendirilen osteokalsin ile boyanma yoğunlukları sonucunda 1.43 ± 0.49 (Grup I), 1.33 ± 0.47 (Grup II), 2.17 ± 0.37 (Grup III), 2.38 ± 0.49 (Grup IV) olarak bulundu. Yüksek miktarda osteokalsin ile boyalı olan Grup IV preparatlarının seri kesitlerinde DiI boyası ile işaretlenmiş olan MKH'lerin yerleri belirlenerek alınan görüntülerin birleştirilmesi sağlandı. Böylece osteokalsin ile boyalı hücrelerin aynı zamanda MKH'den dönüşüm göstererek oluştuğı kanıtlandı.



6. SONUÇ

Kronik böbrek hastalığına bağlı olan kemik iyileşmesi bozukluklarına bağlı olumsuz etkilerin TZP ve SVF tedavileri ile daha düzgün hale getirilebileceği gösterildi. Kemik kırığı sonrası oluşan kallus dokusunun kalınlığı kemik dokunun iyileşme sürecini uzatsa da geç dönemde daha sağlam kemik oluşumuna öncül olacağı bulgularına rastlandı. KBH oluşumu sonrası uygulanan TZP ve SVF tedavilerinin KBH gelişimi sürecini anlamlı şekilde değiştirmemiştir. Kemik dokunun iyileşmesi sırasında uygulanan SVF tedavisinin tek başına uygulanan TZP tedavisine göre üstün olduğu gösterildi. Yine de SVF tedavisinin mümkün olmadığı durumlarda tek başına TZP tedavisi kemik iyileşmesine önemli oranda katkı sağlayacaktır.

SVF tedavilerinin kemik üzerine olan etkileri sadece kemik hücre sayısını arttırmakla sınırlı kalmamış, kemik remodeling aşamasında önemli olan kıkırdak dokusunu da arttırmıştır. SVF tedavisi kıkırdak dokusunu arttırması nedeni ile kıkırdağın kemik dokuya dönüşmesi için gereken süre artmıştır. Böylelikle SVF grubunda erken dönemde TZP grubuna göre daha uzun sürede iyileşme gerçekleşmesi beklenmelidir.

Sonuç olarak, kronik böbrek hastalığının kemik iyileşmesine olan olumsuz etkilerinin TZP ve SVF tedavileri ile mekanik, histolojik, radyolojik ve biyokimyasal olarak daha olumlu parametreler elde edilebileceği gösterildi. KBH hastalarında kemik iyileşmesinin hızlandırılması ve regüle edilmesi amacı ile mezenkimal kök hücre uygulanması sonrası hayvan çalışmalarında elde edilen olumlu sonuçların klinik uygulamada benzer etkileri gösterebileceği düşüncesindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Bello AK, Nwankwo E, El Nahas AM. Prevention of chronic kidney disease: a global challenge. *Kidney Int Suppl.* 98:11-17, 2005.
2. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *8:* 315-7, 2006.
3. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147, 1999.
4. Tobita M, Uysal CA, Guo X, Hyakusoku H, Mizuno H. Periodontal tissue regeneration by combined implantation of adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma in a canine model. *Cytotherapy* 15:1517-26, 2013.
5. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211-28, 2001.
6. Ozturk S, Karagoz H. Experimental stem cell therapies on burn wound: Do source, dose, timing and method matter? *Burns* 41:1133-9, 2015
7. Sensebe L, Gadelorge M, Fluery-Cappellesso S. Production of mesenchymal stromal/stem cell according to good manufacturing practices: a review. *Stem Cell Res Ther* 4:66-71, 2013.
8. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, Andre M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells. physiological and therapeutic perspectives. *Circulation* 109:656-63, 2004.
9. Wu W, Zhang J, Dong Q, Liu Y, MAO T, Chen F. Platelet-rich-plasma- A promising cell carrier for microinvasive articular cartilage repair. *Medical Hypotheses* 455-457, 2009.
10. Scarfi S. Use of bone morphogenetic proteins in mesenchymal stem cell stimulation of cartilage and bone repair. *World J Stem Cells* 8:1-12, 2016.
11. Newman CL, Moe SM, Chen NX, Hammond MA, Wallace JM, Nyman JS, et al. Cortical bone mechanical properties are altered in an animal model of progressive chronic kidney disease. *PLoS ONE* 9(6): e99262.doi: 10.1371/journal.pone.0099262

12. Coperhaver WM, Kelly DE, Wood RL. Bailey's Textbook of Histology. Ed. 17. Baltimore: Williams and Wilkins, pp 170-205.
13. Uysal AR. Osteoporoz. In. Koloğlu Endokrinoloji Temel ve Klinik (2.baslı), Gürbüz E (edt), MN Medikal&Nobel, Ankara 303-313, 2005.
14. Lane N, Dequeker J, Gregory RM. Bone structure and function. Rheumatology. 2029-2041, 2003.
15. Alpar EK. Kemik fizyolojisi ve mineralizasyonu. In: Ortopedi İlkeleri ve Uygulamaları. Furek SK (edt)/ Ege R (çev. Edt), Lippincot yayınevi, Ankara, 100-154, 1980.
16. Siris E. Alendronate in the treatment of osteoporosis: a review of the clinical trials. J Womens Health Gend Based Med 15:1965-1973, 2000.
17. Elçin YM. Tissue engineering and stem cells, In: Biomaterials, from molecular to engineered tissues, Kluwer-Plenum Press, AEMB. 553:301-316, 2004.
18. Capulli M, Paone R, Rucci N, "Ostoblast and osteocyte: games without frontiers," Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 561, pp 3-12, 2014
19. Grigoriadis AE, Heersche JNM, Aubin JE: Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population. Effect of dexamethasone. Journal of Cell Biology, vol. 106, no.6 pp. 2139-2151, 1988.
20. Ducky R, Zhang R, Geoffroy V, Rindall AL, Karsenty G. Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. Cell, vol. 89. No.5 pp 747-754, 1997.
21. Fakhry M, Hamade E, Badran B, Buchet R, Magne D. Molecular mechanisms of mesenchymal stem cell differentiation towards osteoblasts. World Journal of Stem Cells. Vol. 5, no. 4, pp 136-148, 2013.
22. Hu H, Hilton MJ, X. Tu, K. Yu, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. Development, vol. 132, no.1:49-60, 2005.
23. Kapinas K, Kessler C, Ricks T, Gronowicz G, Delany AM. miR-29 modulates Wnt signaling in human osteoblasts through a positive feedback loop. The Journal of Biological Chemistry, vol. 285, no.33 pp. 25221-25531, 2010.

24. Anderson HC. Matrix vesicles and calcification. *Current Rheumatology Reports*. vol. 5. no. 3:4465-4474, 2007.
25. Glimcher MJ. The nature of the mineral phase in bone. in *Metabolic Bone Disease*, Glimcher MJ, Ed. pp 23-50. Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1998.
26. Miller SC, L. De Saint-Georges, Bowman BM, Jee WSS. Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microscopy*. Vol. 3, no. 3:953-961, 1989.
27. <http://www.pathologyoutlines.com/topic/bonemarrowosteoblasts.html> Erişim tarihi: 28.03.2017
28. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive. How osteoblasts become osteocytes. *Development Dynamics*, vol. 235. no. 1:176-190,2006.
29. Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: master orchestrators of bone. *Calcified Tissue International*, vol 94. no. 1:5-24, 2014.
30. Zhang K, Barragan-Adjemian C, L. Ye et al. E11/gp38 selective expression in osteocyte: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Molecular and Cellular Biology*. vol. 26, no.12:4539-4552, 2006.
31. Wetterwald A, Hofstetter W, Cecchini MG, et al. Characterization and cloning of E11 antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*, vol.18, no.2:125-132, 1996.
32. Mikuni Y, Kakai Y, Satoyoshi M, et al. Matrix mineralization and the differentiation of osteocyte-like cells in culture. *Journal of Bone and Mineral Research*. vol.10, no.2:231-242, 1995.
33. Manolagas SC. Choreography from the tomb: an emerging role of dying osteocytes in the purposeful, and perhaps not so purposeful, targeting of the bone remodeling. *BoneKey-Osteovision*. Vol.3, no.1:5-14, 2016.
34. Bonewald LF. The Osteocyte Network as a Source and Reservoir of Signaling Factors. *Endocrinol Metab* 25:161-165, 2010.
35. Civiletti R, Lecenda F, Jorgensen NR, Steinberg TH. Intercellular junctions and cell-cell communication in bone. *Principles of Bone Biology*. J.P. Bilezikian, L. Raisz and G.A. Rodan. Eds. Academic Press, San Diego, Calif, USA. 287-302, 2002.
36. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell and more. *Endocrine Reviews*. Vol. 34. no.5:658-690, 2013.

37. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte. The unrecognized side of the bone tissue. *Osteoporosis International*. Vol.21. no.6:1457-1469, 2010.
38. Boabaid F, Cerri PS, Katchburian E. Apoptotic bone cells may be engulfed by osteoclasts during alveolar bone resorption in young rats. *Tissue and Cell*. Vol.33, no.4:318-325, 2001.
39. <http://boneresearchsociety.org/resources/gallery/39/> Erişim tarihi: 04.04.2017
40. Burger BF, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. *The FASEB Journal*. Vol.13, no.8:101-112, 1999.
41. Mulari M, Vaaraniemi J, Vaananen HK. Intracellular membrane trafficking in bone resorbing osteoclasts. *Microscopy Research and Technique*. Vol.61, no.6:496-503, 2003.
42. Saltel F, Destaing O, Bard F, Eichert D, Jurdic P. Apatite-mediated actin Dynamics in resorbing osteoclasts. *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 15, no.12:5231-5241, 2004.
43. Luxenburg C, Geblinger D, Klein E, et al. The architecture of the adhesive apparatus of cultured osteoclasts: from podosome formation to sealing zone assembly. *PLoS ONE*, vol.2, no.1, article e179, 2007.
44. Kornak U, Kasper D, Bösl MR, et al. Loss of the CIC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man. *Cell*, vol. 104, no. 2:2015-215, 2001.
45. Graves AR, Curran PK, Smith CL, Mindell JA. The Cl⁻/H⁺ antiporter CIC-7 is the primary chloride permeation pathway in lysosomes. *Nature*. Vol. 453, no 7196:788-792, 2008.
46. Aszodi A, Bateman JF, Gustafsson E, Boot-Handford R, Fassler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Structure and Function*. Vol.25, n.2:73-84, 2000.
47. Yagami K, Suh JY, Enomoto M, et.al. Matric GAL protein is a developmental regulator of chondrocyte mineralization and, when constitutively expressed, blocks endochondral and intramembranous ossification in the limb. *The Journal of Cell Biology*. vol.147, no.5:1097-1108, 1999.
48. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional Course Lectures*. Vol. 45:371-386, 1996.

49. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*. Vol. 61, no.5:577-587, 2008.
50. www.studyblue.com/notes/note/n/bone-pathology-27febunknowns Erişim tarihi: 04.05.2017
51. Blonder ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 200:165-170, 1992.
52. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and clinical implications for osteoporosis. *Physical Therapy*. vol.86, no.1:77-91, 2006.
53. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. Vol.3, no.3, pp 131-139, 2008.
54. Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. Genetic control of bone formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. vol. 25:629-648, 2009.
55. <https://opentextbc.ca/anatomyandphysiology/chapter/6-4-bone-formation-and-development/> Erişim tarihi: 05.05.2017
56. Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. vol.19, no.5:444-451. 2008.
57. Andersen TL, Sondergaard TE, Skorzynska KE et al. A physical mechanism for coupling bone resorption and formation in adult human bone. *American Journal of Pathology*. Vol.174, no.1:239-247, 2009.
58. Phan TCA, Xu J, Zheng MH. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histology and Histopathology*. Vol.19, no.4, pp 1325-1344, 2004.
59. Parfitt AM. Bone-forming cells in clinical conditions in bone. *The Osteoblast and Osteocyte*. Vol 1.pp. 351-429, 1990.
60. Buchwalter JA, Glimcher MM, Cooper RR, et al. Bone biology II. Formation, form, modeling and remodeling. *J Bone Joint Surg* 77:1276-1289, 1995.
61. Kaye W. Trauma. In: Lynn Staheli (Ed) *Peridatrik Ortopedi*. Çeviri editörü Yalçın S, Avrupa Tıp Kitapçılık, İstanbul, 203-260, 2005.
62. Court-Brown CM, Caesar B. Epidemiology of adult fracture: a review. *Injury*.vol 37:691-697, 2006.
63. Kolmert L, Wulff K. Epidemiology and treatment of distal femoral fracture in adults. *Acta Orthop Scand*. Vol. 53:957-962, 1982:

64. <http://www.alisaribiyik.com.tr> Erişim tarihi: 09.05.2017
65. Marsh JL, Slongo TF, Agel J, et al. Fracture and dislocation classification compendium-2007. Orthopaedic Trauma Association classification, database and outcomes committee. J Orthop Trauma. vol. 21:1-133, 2007.
66. Aoki Y, Yasuda K, Tohyama H, Ito H, Minami A. Magnetic resonance imaging in stress fractures and shin splints. Clin Orthop Relat Res. 421:260-267, 2004.
67. Brond AR, Rubin TC. Fracture healing. In: Surgery of Musculoskeletal System. Churchill Livingstone, Newyork 1:93-114, 1990.
68. http://www.drozguruysal.com/?attachment_id=3557 Erişim tarihi: 10.05.2017
69. Schell H, Duda GN, Peters A, Tsitsilonis S, Johnson KA, Schmidt-Bleek K. The haematoma and its role in bone healing. Journal of Experimental Orthopaedics. 4:5, 2017.
70. Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası 55:143-150, 2002.
71. Khan SN. Bone growth factors. Orthop Clin North Am. 31:375-388, 2000.
72. Ito K, Perren SM. AO Principles of Fracture Management. Second expanded edition vol. 1. Switzerland. George Thieme Verlag, 2007.
73. Goldtein C, Sprague S, Petrisor BA. Electrical stimulation for fracture healing: current evidence. J Orthop Trauma. 1:62-65, 2010.
74. Gartner LP, Hiatt JL. Cartilage and bone. Color Texbook of Histology. Saunders, Saitn Louis, 114-130, 1997.
75. Marsell R, Einhorn AT. The Biology of Fracture Healing. Injury. 42:551-555, 2011.
76. <https://www.fastbleep.com/medical-notes/surgery/8/278> Erişim Tarihi: 10.05.2017
77. Bonewald F. The amazing osteocyte. Journal of Bone and Mineral Research. Bol.26, no.2, pp 229-238, 2011.
78. Lane N, Dequeker J., Mundy G.R. Bone structure and function. Rheumatology. 2029-2041, 2003.
79. Matsuo K, Irie N. Osteoclast-osteoblast communication. Archives of Biochemistry and Biophysics. Col. 473. 2, pp. 2-1-209, 2008.
80. Nakashima T, Hayashi M, Fukunaga T, et al. Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. Nature Medicine, vol. 17, no.10. 1231-1234, 2011.

81. Linkhart TA, Mohan S, Baylink DJ. Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* vol.19, no.1, 1996.
82. Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, et al. Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nature Medicine*, vol.17, no.11, pp. 1473-1480, 2011.
83. Zhao C, Irie N, Takada Y, et al. Bidirectional ephrinB2-EphB4 signaling controls bone hemostasis. *Cell Metabolism*. Vol. 4, no.2, pp. 111-121, 2006.
84. Aydın BK. Pentoksifilin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. Uzmanlık tezi, Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, İstanbul, 2007.
85. Canbeyli İD. Platelet'den Zengin Plazma'nın (PRP) Tavşanlarda Oluşturulan Kırık İyileşmesine Etkilerinin Araştırılması, Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2013.
86. Gudzenko V, Bittner EA, Schmidt UH. Emergency airway management. *Respir Care*. 55:1026-35, 2010.
87. <https://eccguidelines.heart.org/index.php/circulation/cpr-ecc-guidelines-2/> Erişim tarihi: 17.5.2017
88. <http://www.wisegeek.com/what-are-the-different-types-of-medical-transportation.htm> Erişim tarihi: 17.5.2017
89. Wiellersen T. Mathijsen A, the inventor of plaster cast. *Tijdschr Ziekenverpl*. 21:654-5, 1968.
90. <http://www.medicospace.com/knee-circular-cast-pop-application/> Erişim tarihi: 17.5.2017
91. Başal Ö. Eksternal Fiksator Uygulamaları ve Prensipleri. *Dermal Tıbbi Yayıncılık* sayfa 155-168.
92. <https://www.slideshare.net/mamunk56/ilizarov-external-fixator> Erişim tarihi: 19.5.2017
93. Andersen RC et al. Damage control ortopaedics: an in-theater perspective. *J Surg Orthop Adv*, 19:13-17, 2010.
94. Uthoff HK, Poitras P, Backman DS. Internal plate fixation of fractures: a short history and recent developments. *J Orthop Sci*. 11:118-126, 2006

95. <http://what-when-how.com/nursing/musculoskeletal-disorders-adult-care-nursing-part-6/> Erişim tarihi:19.5.2017
96. Hogg RJ, Furth S, Lemley K, Portman R, Swartz G, Coresh J, et al. National Kidney Foundation's Kidney Disease Outcomes Quality Initiative clinical practice guidelines for chronic kidney disease in children and adolescents: evaluation, classification and stratification. *Pediatrics*. 111: 1416-1421, 2003.
97. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of chronic kidney disease and associated risk factors- United States 1999-2004 *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 56:161-16, 2006.
98. Süleymanlar G, Utaş C, Arınsoy T, Ateş K, Altyun B, Altıparmak MR et al. A population based survey of Chronic Renal Disease in Turkey- the CREDIT study. *Neprol Dial Transplant*. 26:1862-1871, 2011.
99. Harambat J, Stralen K, Kim JJ, Tizard EJ. Epidemiology of chronic kidney disease in children. *Pediatr Nephrol*. 27: 363-373, 2012.
100. Bek K, Akman S, Bilge I, Topaloğlu R, Çalışkan S, Peru H et al. Chronic kidney disease in children in Turkey. *Pediatr. Nephrol*. 24:797-806, 2009.
101. Global Burden of Disease 2013, Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013. A systematic analysis for the. *Lancet* 385:117-171, 2014.
102. U.S. Renal Data System, *USRDS 2005 Annual Data Report*, 2005.
103. Türk Nefroloji Derneği-2004 Registry Of The Nephrology, Dialysis And Transplantation In Turkey, 2004.
104. Apucu HG. Son dönem böbrek yetersizliği hastalarında hemodiyaliz öncesi ve sonrası troponin I düzeylerinin karşılaştırılması, Uzmanlık tezi, Sağlık bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Dahiliye Anabilim Dalı, İstanbul, 2007
105. KDIGO 2012, KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int* 3.1-150, 2013.
106. Delanaye P, Cohen EP. Formula-based estimates of GFR: equations variable and uncertain. *Nephron Clin Pract* 110(1):48-53, 2008.
107. Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. *Nefroloji El Kitabı*, 4.Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul. 2007.

108. Özkan B. Diyabet ve kronik böbrek hastalığı olan sıçanlarda adipöz kökenli stromal vasküler fraksiyonun deri flebi yaşayabilirliği üzerine etkisi: deneysel çalışma, Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 2015.
109. Baysal A, Aksoy M, Bozkurt N, Merdol T.K. Diyet El Kitabı. 4. Baskı, Hatipoğlu Yayınları, Ankara, 2002.
110. Cheung WW, Paik K, Mak RH, Inflammation and cachexia in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 25:711-24, 2010.
111. Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M. Association between albuminuria, kidney function and inflammatory biomarker profile. *Clin J Am Soc Nephrol* 7:1938-48, 2012.
112. Kazancı G. Nefroloji Sırları. Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, 2004.
113. Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, et al. Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 69:1945-1953, 2006.
114. Kavaz A. Kronik böbrek hastalığı, son dönem böbrek yetmezliği ve böbrek nakli olan çocukların uzun dönem komplikasyonlarının belirlenmesi (ileriye dönük izlemli çalışma). Uzmanlık tezi, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk sağlığı ve hastalıkları, Ankara, 2012.
115. National Kidney Foundation. K/DOQI Clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in children with chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 42.1-201, 2003.
116. Wessling K, Bakkaloglu S, Salusky I. Chronic kidney disease mineral and bone disorder in children. *Periatr Nephrol.* 23:195-207, 2008.
117. Chauntin A, Ferris EB. Experimental renal insufficiency produced bu partial nephrectomy. *Arch Intern Med* 49:767-787, 1932.
118. Gagnon RF, Gallimore B, Characterization of a mouse model of chronic uremia. *Urol Res* 16.119-126, 1988.
119. Seth AK, De La Garza M, Fang RC, Hong SJ, Galiano RD. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PLoS One.* 8(3): e59979, 2013.

120. Kren S, Hostetter TH. The course of the remnant kidney model in mice. *Kidney Int.*56(1):333-7.1999.
121. Vielhauer V, Anders HJ, Mack M, Cihak J, Stutz F, Stangassinger M, et al. Obstructive nephropathy in the mouse: progressive fibrosis correlates with tubulointerstitial chemokine expression and accumulation of CC chemokine receptor 2- and 5-positive leukocytes. *J Am Soc Nephrol* 12(6):1173-1187, 2001.
122. Hamada Y, Kono TN, Moriguchi Y, Higuchi M, Fukagawa M. Alteration of mRNA expression on molecules related to iron metabolism in adenine-induced renal failure rats. A possible mechanism of iron deficiency in chronic kidney disease patients on treatment. *Nephrol Dial Transplant* 23(6):1886-1891, 2008.
123. Wang Y, Wang Yp, Tay YC, Harric DC. Progressive adriamycin nephropathy in mice: sequence of histologic and immunohistochemical events. *Kidney Int* 58(4):1797-1804, 2000.
124. Qui WW, yuan J, Yang L. Effect of Wenyang Huoxue Lishul Recipe Containing Serum on Expression of Cathepsin L in Puromycin Aminonucleoside-induced Injury of Mouse Glomerular Podocytes. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 36:602-7, 2016.
125. Capasso G, Di Gennaro CI, Della Ragione F, Manna C, Ciarcia R, Florio S, et al. In vivo effect of the natural antioxidant hydroxytyrosol on cyclosporine nephrotoxicity in rats. *Nephrol Dial Transplant* 23:1186-1195, 2008.
126. Haung YC, Tsia MS, Hsieh PC, Shih JH, Wang TS, Wang YC, et al. Galagin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity by attenuating oxidative stress, inflammation and cell death in mice through inhibition of ERK and NF-kappaB signaling. *Toxicol Appl Pharmacol.* 329:128-139, 2017.
127. Salem NI, Noshay MM, Said AA. Modulatory effect of curcumin against genotoxicity and oxidative stress induced by cisplatin and methotrexate in male mice. 105:370-376. 2017.
128. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. 8:315-7
129. Svendsen CN, Ebert AD. *Encyclopedia of Stem Cell Research.* Vol 1 &2. SAGE Publications, USA. 2008.
130. Karaöz E, Ovalı E, Kök Hücreler, Trabzon: Derya Kitabevi, 2004.

131. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 121:50-8, 2008.
132. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 124:804-15, 2009.
133. Brown SA, Levi B, Lequeux C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plast Reconstr Surg.* 126:1936-46, 2010.
134. Suga H, Eto H, Aoi N, Kato H, Araki J, Doi K, Higashino T, Yoshimura K. Adipose tissue remodeling under ischemia: death of adipocytes and activation of stem/progenitor cells. *Plast Reconstr Surg.* 126:1911-23, 2010.
135. Cooper GM, Durham EL, Cray JJ Jr, Bykowski MR, DeCesare GE, Smalley MA, Mooney MP, Campbell PG, Losee JE. Direct comparison of progenitor cells derived from adipose, muscle, and bone marrow from wild-type or craniosynostotic rabbits. *Plast Reconstr Surg.* 127:88-97, 2011.
136. Sale GE, Storb R. Bilateral diffuse pulmonary ectopic ossification after marrow allograft in a dog. Evidence for allotransplantation of hemopoietic and mesenchymal stem cells. *Exp Hematol.* 11:961-6, 1983.
137. Blanton MW, Hadad I, Johnstone BH, Mund JA, Rogers PI, Eppley BL, March KL. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast Reconstr Surg.* 123:56-64, 2009.
138. http://kemikiligi.org/icerik.php?id=117&alt_id=137&tab=0 Erişim tarihi: 20.6.2017
139. Bjornson CR, Rietze RL, Reynolds BA, Magli MC, Vescovi AL. Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science.* 283:524-537, 1999.
140. Trucco M. Regeneration of the pancreatic beta cell. *J Clin Invest.* 115:5-12, 2005.
141. Can A, Karahüseyinoğlu S, Çınar Ö, Erdemli E, Özdağ H. İnsan kök hücrelerinin çoğalma ve farklılaşma aşamalarında yapısal protein dinamiğinin belirlenmesi, Tübitak SBAG Proje 3314106S036:1-39, 2008.

142. Can A. Kök hücre tanımları. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:15-23.
143. http://www.kokhucredernegei.org.tr/tur/kok_hucre/embriyo.htm Erişim tarihi: 21.06.2017
144. Embriyonel ve mezodermal kök hücreler. Prof. Dr. Ali Uğur Ural Ders notları. GATA Hematoloji A.D. Ankara
145. Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi 1:48-56, 2005.
146. Bunnell BA, Flaatt M, Gagliardi C, Patell B. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. Methods. 45:115–120, 2008.
147. Ataman MG. Adipöz kökenli kök hücre nakli ile transvers rektus abdominis kas deri flebi yaşayabilirliğinin artırılması: Deneysel çalışma, Uzmanlık tezi, Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara, 2012.
148. Çamurdanoğlu BZ, Kansu E. Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:41-51.
149. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. Nature 197:452–4, 1963.
150. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. Exp Hematol 4:267-74, 1976.
151. Çamurdanoğlu B Z, Kansu E. Erişkin ve hematopoetik kök hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:41-51.
152. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284:143-147, 1999.
153. Çetinkaya DU. Mezenkimal kök hücreler. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:53-62
154. <http://www.biyologlar.com/kok-hucrelere-bakistanimlar-kavramlar-ve-siniflandirmalar>. Erişim tarihi: 22.06.2017

155. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ et al. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol* 2003; 56:86–96
156. Friedenstein AJ. Stromal bone marrow cells and the hematopoietic microenvironment. *Arkh Pathol* 1982 44:3–11.
157. <http://www.celltherapysociety.org/> Erişim tarihi: 22.06.2017
158. Ryan JM, Barry FP, Murphy JM, Mahon BP. Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *J Inflamm (Lond)*. 26:2-8, 2005.
159. Yang T, Hu Y, Wang C, Binks BP. Fabrication of hierarchical macroporous biocompatible scaffolds by combining pickering high internal phase emulsion templates with three-dimensional printing. Doi:10.1021/acsami.7b05012. 2017
160. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7:211–228, 2001.
161. Beksaç M. Kök hücre kaynağı olarak kordon kanı. Kök Hücre Biyolojisi ve Klinik Uygulamalar. Türkiye Bilimler Akademisi Raporları Sayı 20:29-39.
162. Mc Culloch EA, Till JE. Perspectives on the properties of stem cells. *Nat Med* 11:1026-28, 2005.
163. Dexter TM. Stromal cell associated haemopoiesis. *J Cell Physiol Suppl.* 87, 1982.
164. Bossolasco P. Molecular and phenotypic characterization of human amniotic fluid cells and their differentiation potential. *Cell Res* 16:329-36, 2006.
165. In't Anker PS. Amniotic fluid as a novel source of mesenchymal stem cells for therapeutic transplantation. *Blood* 102:1548-1549, 2003.
166. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematom* 109:235-242, 2000.
167. Kogler G. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *Cell Res* 16:329-36, 2006.
168. Dani C, Casteilla L. Adipose tissue-derived cells: from physiology to regenerative medicine. *Diabetes Metab* 32:393-401, 2006.
169. Cannon B, Nedergaard J. Developmental Biology: Neither fat nor flesh. *Nature* 21:947-8, 2008.
170. Rodbell M. The metabolism of isolated fat cells. IV. Regulation of release of protein by lipolytic hormones and insulin. *J Biol Chem* 24:3909-3917, 1966.

171. Poznanski WJ, Waheed I, Van R. Human fat cell precursors. Morphologic and metabolic differentiation in culture. *Lab Invest* 29:570–6, 1973.
172. Strem BM, Hicok KC, Zhu M et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J Med* 54:132–41, 2005.
173. Aust L, Devlin B, Foster SJ et al. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. *Cytotherapy* 6:7–14, 2004.
174. Pojda Z. Adipose-derived stem cells for therapeutic applications in regenerative medicine: using non-fetal sources of stem cells, (Bhattacharya N, ed). London, Springer-Verlag, 77-91, 2015.
175. Katz AJ, Hendrick M, Llull R, Futrell JW. A novel device for simple and efficient refinement of liposuctioned tissue. *Plast Reconstr Surg* 107:595-597, 2001.
176. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugrate DA, Huang JI, Mizunu H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13:4279-4295, 2002.
177. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, Hitt DC. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng.* 7:729-741, 2001.
178. Talens-Visconti R, Bonora A, Jover R. Human mesenchymal stem cells from adipose tissue: differentiation into hepatic lineage. *Toxicol In Vitro* 21:324-329, 2007.
179. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, Zhu M et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 290:763-769, 2002.
180. Mouiseddine M, François S, Semont A, Sache A, Allenet B, Mathieu N, Frick J, Thierry D, Chapel A. Human mesenchymal stem cells home specifically to radiation-injured tissues in a non-obese diabetes/severe combined immunodeficiency mouse model. *The British Journal of Radiology*, 80:49–55, 2007.
181. Bianco P, Riminucci M. Marrow stromal cell culture: The bone marrow stroma in vivo: ontogeny, structure, cellular composition and changes in disease. *Handbooks in practical animal cell biology*, (Bresford JN, ed.) Cambridge University Press. Cambridge, UK, 1998.

182. Tomiyama K, Murase N, Stolz DB, Toyokawa H et al. Characterization of transplanted green fluorescent protein bone marrow cells into adipose tissue. *Stemcells* 26:330–338, 2008.
183. 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
184. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage *Cell Prolif.* 37:97-110, 2004.
185. Rajashekhar G. Mesenchymal stem cells: new players in retinopathy therapy. *Front. Endocrinol*, <https://doi.org/10.3389/fendo.2014.00059>, 2014.
186. Şahin F, Saydam G, Omay SB. Kök hücre plastisitesi ve klinik pratikte kök hücre tedavisi. *Türk Hematoloji Onkoloji Dergisi* 1:48-56., 2005.
187. Cairo MS, Wagner JE. Placental and/or umbilical cord blood: an alternative source of hematopoietic stem cells for transplantation. *Blood.* 90:4665–78, 1997.
188. Ichioka S, Kudo S, Shibata M, Ando J, Sekiya N, Nakatsuka T. Bone marrow cell implantation improves flap viability after ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg* 52:414–8, 2004.
189. Zheng Y, Yi C, Xia W et al. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 121:59–69, 2008.
190. Simman R, Craft C, McKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Ann Plast Surg* 54:546–52, 2005.
191. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 124:804-15, 2009.
192. Strauer BE, Schannwell CM, Brehm M. Therapeutic potentials of stem cells in cardiac diseases. *Minerva Cardioangiol* 57:249–67, 2009.
193. Graham-Rowe D. Fetal tissue graft restores lost sight. *New Sci.* 184:16–7, 2004.
194. Vastag B. Stem cells step closer to the clinic: paralysis partially reversed in rats with ALS-like disease. *JAMA* 285:1691–3, 2001.

195. Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology. *Mol Cell Endocrinol* 228:79-102, 2004.
196. Hicok KC, Su Laney TV, Zhou YS. Human adipose-derived adult stem cells procedure osteoid in vivo. *Tissue Eng* 10:371-380, 2004.
197. Conejero J, Lee J, Parrett B. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg* 117:857-863, 2006.
198. Minn KW, Min KH, Chang H. Effects of fat preparation methods on the viabilities of autologous fat grafts, *Aesthetic Plast Surg* 34:626-631, 2010.
199. Dragoo JL, Samimi B, Zhu M. Tissue-engineered cartilage and bone using stem cells from human infrapatellar fat pads. *J Bone Joint Surg Br* 85:740-747, 2003.
200. Hanson SE, Bentz ML, Hemmati P. Mesenchymal stem cell therapy for non-healing cutaneous wounds. *Plast Reconstr Surg*. 125:510-516, 2010.
201. Rehman J, Trakuev D, Li J. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* 109:1292-1298, 2004.
202. Kang SK, Putnam LA, Ylostalo J. Neurogenesis of rhesus adipose stromal cells. *J Cell Sci*. 117:4289-4299, 2004.
203. <http://slideplayer.biz.tr/slide/2923182/> Erişim tarihi: 24.6.2017
204. Rodrigues SV, Acharaya AB, Thakur SL. Platelet-rich plasma. A review. *NY State Dent J*. 78:26-30, 2012.
205. White JG, Gerraed JM. Ultrastructural features of abnormal blood platelets. *Am J Pathol* 83:590-614, 1976.
206. White JG. Platelet structure. *Platelets (Second edition)*, (Ed. Michelson AD.)'de Elsevier, 45-73, 2007.
207. Gülşen U. Alt gömülü 3. molar operasyonlarında trombosit zengin fibrin uygulamasının işlem sonrası ağrı ve ödem üzerine etkilerinin değerlendirilmesi, Uzmanlık tezi, Türkiye Cumhuriyeti Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Ankara, 2013.
208. Rendu F, Brohard-Bohn B. The platelet release reaction: granules constituents, secretion and functions. *Platelets*. 12:261-73, 2001.
209. Gawaz M. Blood platelets: physiology, pathophysiology, membrane receptors, antiplatelet principles and therapy for atherothrombotic disease. George Thieme Verlag, 2001.

210. Utku B. Trombositten zengin plazmanın tedavi edici etkisini meloksikam ve diklofenak değiştirir mi?, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Spor Hekimliği Anabilim Dalı, Ankara, 2014.
211. Andrea J, Gallini R, Bersholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 22:1276-312, 2008.
212. Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI. Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18:93-103, 2003.
213. Schmitz JP, Hollinger JO. The biology of platelet rich plasma. *J Oral Maxillofac Surg*, 59:1119-21, 2001.
214. Lütfüoğlu M. Periodontal rejenerasyon ve büyüme faktörleri. *Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg*, 17:35-43, 2007.
215. Colville-Nash PR, Willoghby DA. Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today*. 3:14-23, 1997.
216. Jang SE, Park WJ, Kweon et al. Restoration of peri-implant defekts in immediate implant installations by Choukroun platelet-rich fibrin and silk fibroin powder combination graft. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 109:831-36, 2010.
217. Ribatti D, Vacca A, Preste M. The discovery of angiogenic factors: A historical review. *Gen Pharmacol*, 35:227-231, 2002.
218. Fujita T, Shiba H, Van Dyke TE, Kurihara H. Differential effects of growth factors and cytokine on the synthesis of SPARC, DNA, fibronectin and alkaline phosphatase activity in human periodontal ligament cells. *Cell Biol Int*, 28:281-286, 2004.
219. Dereka XE, Markopoulou CE, Vrotsos IA. Role of growth factors on periodontal repair. *Growth Factors*, 24:260-267, 2006.
220. Kingsley CS. Blood coagulation; evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature*. 173:733-4, 1954.
221. Matras H. Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin. *Osterr Z Stomatol.* 67:338-359, 1970.

222. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Ann Surg.* 204:322-330, 1986.
223. Marx RE, Carlsson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 85:638-646, 1998.
224. Lacci KM, Darnik A. Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale journal of biology and medicine.* 83:1-9, 2010.
225. Raja VS, Naudi EM. Platelet-rich fibrin: evolution of second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research.* 19:42-46, 2008.
226. Dhurat R, Shukesh MS. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 7:189-197, 2014.
227. Paula N, Wolter T, Markowicz M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns.* 36:4-8, 2010.
228. Arıkan F, Özçaka Ö, Bıçakçı N. Trombosit zengin plazma ve kemik grefti ile kombinasyonun dar kemik içi defektlerde başarısının karşılaştırılması. *Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi.* 28:151-161, 2007.
229. Kathleen ML, Dardık A. Platelet rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J. of Biology and Medicine.* 1-9, 2010
230. Choukroun J, Diss A, Simopieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part IV. Clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101:56-60, 2006.
231. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan JJA, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin: a second generation platelet concentrate. Part I. Technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 101:37-44, 2006.
232. Choi BH, Zhu SJ, Kim BY, Huh JY, Lee SH, Jung JH. Effect of platelet-rich plasma concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int. J. of Oral Maxillofac Surg.* 34:420-424, 2005.

233. Hakimi M, Jungblunt P, Sager M, Betsch M, Hertten M, Becker J, et al. Combined use of platelet rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini pigs. *Injury Int J Care.* 4156.1-7, 2009.
234. Seth AK, De La Garza M, Fang RCi Hong SJ, Galiano RD. Excisional wound healing is delayed in a murine model of chronic kidney disease. *PloS One.* 8(3):e59979, 2013.
235. Ogawa R, Mizuno H, Hyakusoku H, Watanabe A, Migita M, Shimada T. Chondrogenic and osteogenic differentiation of adipose-derived stem cells isolated from GFP transgenic mice. *J Nihon Med Sch.*71:240-1, 2004.
236. Bayramiçli M. *Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri (1. Baskı).* İstanbul: Argos ,455, 1995.
237. Dhurat R, Sukesh MS. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: A review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg.* 7:189-197, 2014.
238. Kitoh H, Kitokoja T, Tsuchiya H, Mitsuyama H, Nakamura H, Katoh M, et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cell and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis: A preliminary result of three cases. *Bone* 35:892-898, 2004.
239. Gee C, Weddell JN, Swain MV. Comparison of three and four point bending evaluation of two adhesive bonding systems for glass-ceramic zirconia bi-layered ceramics. *Dent Mater.* doi: 10.1016/j.dental.2017.06.007. 2017.
240. Lane JM, Sandru HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 18. 213, 1987.
241. Allen HL, Wase A, Bear WT. Indomethacin and aspirin: effect of nonsteroidal anti-inflammatory agents on the rate of fracture repair in the rat. *Acta Orthop Scand* 51:595-600, 1980.
242. Ogawa R. The importance of adipose-derived stem cells and vascularized tissue regeneration in the field of tissue transplantation. *Curr. Stem Cell Res. Ther.* 1: 13, 2006.
243. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Ann Plast Surg.* 65:237-44, 2010.

244. Trezz OA, Handscin AE, Bestmann L, Hoerstrup SP, Trezz OL, Platz A. Influence of brain injury on early posttraumatic bone metabolism. *Neurologic Critical Care. Critical Care Medicine* 33:399-406, 2005.
245. Einhorn A. Current concepts review: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg* 77:940-956, 1995.
246. Azad V, Breitbart E, Al-Zube L, Yeh S, O'Connor JP. rhBMP-2 enhances the bone healing response in a diabetic rat segmental defect model. *Orthop Trauma*. vol.23:4, 2009.
247. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral segmental defects in rats. *J of Orthop Research* 21:44-53, 2003.
248. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J*. 46:320, 2005.
249. Holstein JH, Matthys R, Histing T, Becker SC, Fiedler M, Garcia P, et al. Development of a stable closed femoral fracture model in mice. *Journal of Surg Research* 153:71-75, 2009.
250. Matthys R, Perren SM. Internal fixator for use in the mouse. *Injury, Int J. Care* 40:103-109, 2009.
251. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Ignatius A, et al. Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *European Cells and Materials*. 26:1-14, 2013.
252. Ayrancı B. Sıçanlardaki kırık modeli üzerinde tramadol HCL + parasetamolün kırık iyileşmesi üzerine etkisi, Uzmanlık tezi, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Kahramanmaraş, 2012.
253. Majkowski RS, Baker AS. Interlocking nails for femoral fractures: an initial, *J Orthop Trauma* 3:161-168, 2001.
254. Manigrasso MB, O'Connor JP. Characterization of a closed femur fracture model in mice. *J Orthop Trauma* 18:687-695, 2004.
255. Xiao SE, Miao Y, Wang J, Jiang W, Fan ZX, Liu XM et al. As a carrier-transporter for hair follicle reconstruction, platelet-rich plasma promotes proliferation and induction of mouse dermal papilla cells. *Sci Rep*. 7:1125, 2017.

256. Qiu G, Shi Z, Xu HHK, Yang B, Wier MD, Li G, et al. Bone regeneration in minipigs via calcium phosphate cement scaffold delivering autologous bone marrow mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. *J Tissue Eng Regen Med*. Doi:10.1002/term.2416, 2017.
257. Liu X, Yang Y, Niu X, Lin Q, Zhao B, Wang Y, et al. An insitu photocrosslinkable platelet rich plasma- complexed hydrogel glue with growth factor controlled release ability to promote cartilage defect repair. *Acta Biomater*. S1742-7061, 2017.
258. Ferreira ML, Silva PC, Silba LHA, Bonfirm DC, Müller LCCM, Esposito CC, et al. Heterologous mesenchymal stem cells succesfully treat femoral pseudoarthrosis in rats. *Journal of Translational Medicine* 10:51, 2012.
259. Ozturk AM, Cila E, Kanati U, Isik I, Senkoylu A, Uzunok D, et al. Treatment of segmental bone defects in rats by the situmilation of bone marrow osteoprogenitor cells with prostoglandin E2. *International Orthopedics* 29:73-77, 2005.
260. Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 331:31-36, 2005.
261. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med* 5:309-313, 1999.
262. Ural AU, Demiralp B, Avcu F, Yurttas Y, Canpolat E, Can B, et al. Alloojenik mezenkimal kök hücrelerin tavşan tibial segmental kemik defekti tamirinde kullanımı. *Turkish Journal of Hematology*. 21:48, 2004.
263. Burder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair and skeletal regeneration therapy. *Journal of Cellular Biochem* 25:283-294, 1994.
264. Willing AE, Garbuzova-Davis S, Sanberg PR, Saporta S. Routes of stem cell administration in the adult rodent. *Methods Mol Biol*. 438:383-401, 2008.
265. Isogai N, Landis WJ, Mori R, Gotoh Y, Gerstenfeld LC, Upton J, et al. Experimental use of fibrin glue to induce site-directed osteogenesis from cultured periosteal cells. *Plat Reconstr Surg*. 105:953-963, 2000.

266. Plachokovan AS, Nikolidakis D, Mulder J, et al. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in dentistry: a systematic review. *Clin Oral Impl Res* 19:539-545, 2008.
267. Marx ER, Gang AK. Dental and craniofacial applications of platelet-rich plasma. Quintessence Publishing China. 3-65, 2005.
268. Nagata MJH, Melo LGN, Messori MR, Bomfim SRM, Fucini SE, Garcia VG, et al. Effect of platelet-rich plasma on bone healing of autogenous bone grafts in critical-size defects. *J Clin Periodontol* 36:775-783, 2009.
269. Gumieiro EH, Marcio A, Jahn RS, Sergetto R, Alves MT, Nannmart U, et al. Platelet-rich plasma in bone repair of irradiated tibiae of Wistar rats. *Acta Cirurgica Brasileira- Vol. 25:257*, 2010.
270. Cole JH, Marjolein CH. Whole bone mechanics and bone quality. *Clin Orthop Relat Res* 469:2139-2149, 2011.
271. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc.* 7:1918-1929, 2012.
272. Guan M, Yao W, Liu R, Lam KS, Nolte J, Jia J. Directing mesenchymal stem cells to bone to augment bone formation and increase bone mass. *Nature Medicine.* 18:456-462, 2012.
273. Racanicchi IA, Oliveira AB, Berbieri RL, Delle H, Duerta Ida S, Leme PL. Experimental models of renal dysfunction in female rats. Functional and histological aspects after unilateral nephrectomy or ligation of right renal vein with kidney preservation. *Acta Cir Bras.* 30:824-830, 2015.
274. Shobeiri N, Adams M, Holden RM. Vascular calcification in animal models of CKD: a review. *Am J Nephrol* 31:471-481, 2010.
275. Ferrari GO, Ferrari JC, Cacallari RT, Neves KR, Reis LM, Dominguez WV, et al. Mineral bone disorder in chronic kidney disease: head-to-head comparison of 5/6 nephrectomy and adenine models. *BMC Nephrology* 15:69-76, 2014.
276. Kumar R, Kumar S, Singh D, Goel SC. Role of bone marrow derived autologous mesenchymal stem cells in fracture healing in rabbits. *Journal of Bone and Joint Diseases.* 32:7-13, 2017.