



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

**HÜCREDEN ARINDIRILMIŞ OMENTUM BİYOÇATININ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TROMBOSİTTEN ZENGİN
PLAZMA İLE KOMBİNASYONLARININ KRİTİK KEMİK
DEFEKTİ İYİLEŞMESİNE ETKİSİ:
BİR SIÇAN MODELİ**

DR. ABDÜLSAMET EMET

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2018**



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

**HÜCRE DEN ARINDIRILMIŞ OMENTUM BİYOÇATININ
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE VE TROMBOSİTTEN ZENGİN
PLAZMA İLE KOMBİNASYONLARININ KRİTİK KEMİK
DEFEKTİ İYİLEŞMESİNE ETKİSİ:
BİR SIÇAN MODELİ**

DR. ABDÜLSAMET EMET

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. EGEMEN TURHAN**

**ANKARA
2018**

TEŞEKKÜR

Başta Anabilim Dalı başkanımız sayın Prof. Dr. A. Mazhar TOKGÖZOĞLU olmak üzere uzmanlık eğitimi boyunca emeği geçen ve desteğini esirgemeyen öğretim üyesi tüm hocalarıma,

Tez danışmanım olan ve tez hazırlanması ve yazım sürecinde emeklerini esirgemeyen, yol göstericiliği ve mentorluğu için sayın Prof. Dr. Egemen TURHAN'a,

5 yıl boyunca beraber çalıştığımız servislerimizde, polikliniğimizde ve ameliyathanedeki tüm Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim dalı ailesi çalışanlarına ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Çalışmada yoldaşım olan ve cerrahi ayağında hiçbir türlü yardımı esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Erdi ÖZDEMİR'e

Çalışmanın biyomekanik kısmının sonuçlanmasını sağlayan ve yoğun mesai içerisinde zaman ayırarak yardımcı olan TOBB Üniversitesi öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Teyfik DEMİR ve Arş. Gör. Pelin COŞKUN'a

Çalışmanın histolojik kısmının gerçekleşmesini sağlayan Doç. Dr. Sinan YÜRÜKER ve Uzm. Dr. Ramin HASHİMİ'ye

Çalışmaya verdiği desteklerinden dolayı Glo PRP firmasından sayın Serkan YEĞEN'e

Yazım aşamasında Biyoistatistik desteği sağlayan Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr. Sevilay KARAHAN'a

Ayrıca beni yetiştiren, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili annem Zeycan EMET ve babam Sami EMET'e, her türlü desteğini esirgemeyen sayın ağabeyim İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı öğretim Üyesi Dr. Samim EMET'e ve kız kardeşim Dr. Menekşe EMET'e,

İyi ve kötü günümde yanımda olan ve bugünlere gelmemde en büyük destekçim olan, hayat yoldaşım ve eşim sayın Uzm. Dr. Sadiye Dicle Canoruç EMET'e

sonsuz teşekkürü borç bilirim.

ÖZET

Emet A., Hücreden Arındırılmış Omentum Biyoçatının Mezenkimal Kök Hücre ve Trombositten Zengin Plazma ile Kombinasyonlarının Kritik Kemik Defekti İyileşmesine Etkisi: Bir sıçan Modeli. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Ankara, 2018. Kritik kemik defekt tedavisi uzun süreli ve yüksek maddi yükümlükler olması nedeni ile ortopedik cerrahi tedavide sorun olmaya devam etmektedir. Literatürde tanımlanmış bir çok tedavi yöntemi olmasına rağmen hala yeni tedavi yöntemleri araştırılmaya devam edilmektedir. Bu çalışmada kritik kemik defekti tedavisi üzerine biyoçatının ve kök hücre ve trombositin zengin plazma ile kombinasyonlarının iyileşmeye katkısı araştırıldı. Toplam 32 adet 300 gr ve üzeri Wistar Albino sıçan 5 gruba ayrıldı. 2 adet sıçan trombositin zengin plazma hazırlanması için ötenazi uygulandı. Omentum deselülerize edilerek hazırlandı. Her grup bilateral önkol Radius kemiği cisimden kritik kemik defekti yapılacak şekilde cerrahisi yapıldı. 1. Grup kontrol grubu olarak kullanılarak herhangi bir uygulama yapılmadı. 2. Grup için deselülerize omentum biyoçatısı uygulandı. 3. Grup için deselülerize omentum biyoçatısına mezenkimal kök hücre uygulandı. 4. Grup için deselülerize omentum biyoçatısına trombositin zengin plazma uygulandı. 5. Grup için deselülerize omentum biyoçatısına hem mezenkimal kök hücre hem de trombositin zengin plazma uygulandı. Post operatif dönemde 6 hafta beklenilerek 6. haftanın sonunda hayvanlara ötenazi uygulandı. Önkol diseksiyonu sonrasında bilateral önkolların direkt grafleri çekildi. Her gruptan 4 önkol randomize olarak biyomekanik çalışma için seçilirken 8 önkol histolojik inceleme için seçildi. Radyolojik olarak Cook skorlaması ve histolojik olarak ta Salkeld skorlaması kullanılarak inceleme tamamlandı. Skorlamalar istatistik analize tabi tutuldu. Sonuç olarak biyomekanik anlamda anlamlı fark saptanmadı. Radyografik olarak omentum biyoçatı ve omentum biyoçatı ile beraber trombositin zengin plazma uygulanan gruplar kontrol grubuna göre anlamlı farklılık gösterdi. Aynı zamanda omentum ve kök hücre uygulanan gruba göre de anlamlı farklılık saptandı. Histolojik skorlamaya bakıldığında kontrol grubuna ve kök hücre ve omentum beraber uygulanan gruba göre, omentum ve omentum ve trombositin zengin plazma uygulanan grup arasında

omentum ve omentum ve trombosit zengin plazma uygulan grup lehine ($p<0.001$) anlamlı farklılık saptandı.

Sonuç: Hücreden arındırılmış omentum biyoçatısı, kritik kemik defektlerinde kullanılabilecek uygun bir biyoçatıdır. Tek başına biyoçatı olarak kullanıldığı zaman hücre vitalitesini desteklediği, kemikleşmenin olduğu, defektin azaldığı ve kaybolduğu, biyoçatının rezorbe olduğu gösterilmiştir. Mezenkimal kök hücre kombinasyonu iyileşmeyi bozmuş ve azaltmıştır. Kaynamayı arttırmak için biyoçatımız ile beraber kombine edilen PRP, histolojik olarak daha iyi kaynama sağlamıştır.

Anahtar kelimeler; biyoçatı, omentum, sıçan, kritik kemik defekti, kök hücre, trombosit zengin plazma.

ABSTRACT

Emet A., Decellularized Omentum Scaffold Effect on Healing of Critical Sized Bone Defect With Combination of Mesenchymal Stem Cell and Platelet Rich Plasma; A Rat Model. Hacettepe University Faculty of Medicine Department of Orhtopaedics and Traumatology, Ankara, 2018. Critical sized bone defect treatments have high-costed and long time needing is still a major clinical concern on orthopaedic surgery. Despite there is a lot of treatment modalities on literature, we are also looking for new treatment methods. In this study, decellularized omentum scaffold effect on healing of critical sized bone defects are researched. Also there are combinations of mesenchymal stem cells and platelet rich plasma with decellularized omentum scaffold are researched. 30 Wistar-Albino rats are were categorized into 5 groups. 2 rats sacrificed for preparing the platelet rich plasma. For every group, bilateral forearm were surgically dissected and critical sized bone defect were formed on Radius bone shaft. 1. Group was the control group, so bone defect left with no scaffold be applied. 2. Group was the decellularized omentum group, 3. Group was decellularized omentum group with combination of mesenchymal stem cells. 4. Group was the decellularized omentum group with combination of platelet rich plasma. 5. Group was the decellularized omentum group with combination of both mesenchymal stem cells and platelet rich plasma. 6 weeks of healing were waited after post operative period. After healing, rats were sacrificed and forearm bone dissection were done. Both radiologic and biomechanic studies were done. Also bone histology examination were done. X-rays were examined with Cook Scoring system and histologic examination were done with Salkeld Scoring system. Parameters that constitute of this model were found and statistical analyze were performed. Biomechanically, there is no significant difference between groups. Radiographically, omentum applied and omentum with PRP combination applied groups are significantly different form the control and omentum group with combination of mesenchymal stem cells. Also histologically, omentum applied and omentum with PRP combination applied groups are significantly different ($p<0.001$) form the control and omentum group with combination of mesenchymal stem cells.

Conclusion: Decellularized omentum scaffold is a suitable scaffold for critical sized bone defects. Vitality of new cells are maintained, new bone formation is seen, defect size become smaller and vanished and also scaffold is resorbed for single use of decellularized omentum. With combination of mesenchymal stem cells, new bone formation is diminished and bone healing is damaged. Decellularized omentum with combination of PRP increased bone healing histologically.

Keywords; scaffold, omentum, rat, critical sized bone defect, mesenchymal stem cells, platelet rich plasma.



İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER.....	ix
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Kemik Yapısı	3
2.1.1.1. Makro dış yapı.....	3
2.1.1.2. Mikroskopik yapı.....	4
2.1.1.3. Hücre kompozisyonu.....	5
2.1.1.4. Kemik matriksi	6
2.1.2. Kemik Fizyolojisi.....	7
2.2. Kemik Defektleri ve Kritik Kemik Defekti Tanımı	9
2.3. Kemik Defekti Tedavisi.....	10
2.3.1. Kemik İyileşmesinin Fizyolojisi ve Histolojisi.....	10
2.3.2. Kemik Defekti Tedavisi Yönetimi	13
2.4. Kemik İyileşmesinde Kök Hücre	18
2.4.1. Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri.....	18
2.4.2. Mezenkimal Kök Hücre Özellikleri	19
2.5. Biyoçatı Tanımı ve Özellikleri	21
2.5.1. Deselülarize Omentum'un Biyoçatı Olarak Uygulanması.....	24
2.6. Trombositten Zengin Plazma (Platelet Rich Plasma, PRP).....	25
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	27
3.1. Kök Hücre Hazırlanması için Teknik.....	29
3.1.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürde Çoğaltılması	29

3.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünotiplendirilmesi (Akım Sitometri Çalışması)	29
3.1.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin Değerlendirmesi	30
3.2. Omentum Deselüderizasyonu için Teknik	33
3.3. Trombositten Zengin Plazma (PRP) Hazırlanması için Teknik	37
3.4. Sıçanda Kemik Defekti Yaratmak için Cerrahi Teknik.....	41
3.5. Radyografik Analiz.....	48
3.6. Histopatolojik Analiz.....	48
3.7. Biyomekanik Analiz	49
3.8. İstatistik Analiz.....	50
4. BULGULAR	51
4.1. Radyografik Bulgular	51
4.2. Biyomekanik Bulgular.....	58
4.3. Histopatolojik Bulgular	59
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	77
7. KAYNAKLAR	78

KISALTMALAR

cm	: Santimetre
ml	: Mililitre
PRP	: <i>Platelet Rich Plasma</i> (Trombositten Zengin Plazma)
PTH	: Parathormon
GH	: Büyüme Hormonu
IGF-1	: İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu
TGF-β	: <i>Transforming Growth Factor β</i>
BMP	: Kemik Morfogenetik Protein
RANKL	: Nükleer Kappa Faktör β
M-CSF	: Monosit- Koloni Stimüle Edici Faktör
TAK-1	: Tirozin Kinaz 1
IL	: İnterlökin
TNF-a	: Tümör Nekroze Edici Faktör a
PDGF	: Platelet Kökenli Büyüme Faktörü
RİA	: <i>Reamer Irrigator Aspirator</i>
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
Runx 2	: <i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>

ŞEKİLLER

	Sayfa No
Şekil 2.1. Kemik makroskopik ve mikroskopik yapısının şematik görünümü.....	4
Şekil 2.2. Osteoprogenitor hücre osteoblast ve osteosit dönüşümü.....	5
Şekil 2.3. Kök hücrenin osteoblast dönüşümü.....	7
Şekil 2.4. Osteoklast aktivasyonu.....	8
Şekil 2.5. Osteoindüksiyon.....	15
Şekil 2.6. İntramembranöz ve endokondral ossifikasyon.....	20
Şekil 3.1. Kültür ortamında çoğalan hücrelerin inverted mikroskoptaki görünümü.....	31
Şekil 3.2. Osteojenik vasat içerisinde uyarılan kök hücrelerin ilerleyen günler içerisinde çok sayıda ve amorf depolanmalar göstermesi ve Alzarin Red boyası ile kalsiyum depolanmasının gösterilmesi.....	32
Şekil 3.3. Adipojenik vasat içerisinde uyarılan kök hücrelerin ilerleyen günler içerisinde yuvarlak yağ damlacığı oluşturması ve Oil Red O boyası ile boyanmasının görüntüsü.....	32
Şekil 3.4. Dokuların PBS içerisinde 24 saat boyunca yıkanması.....	33
Şekil 3.5. Dokuların %1 (w/v)'lik SDS içerisinde 24 saat boyunca çalkalanması.....	34
Şekil 3.6. Dokuların izopropanol içerisinde bekletilmesi.....	34
Şekil 3.7. Dokulardan DNA ve RNA'ların uzaklaştırılması.....	35
Şekil 3.8. Dokuların PBS ile yıkanması.....	36
Şekil 3.9. Deselüler yapıların petri kaplarına dökülmesi.....	36
Şekil 3.10. Deselüler yapıların liyofilize edilmesi.....	37
Şekil 3.11. Glo PRP kiti görünümü.....	37
Şekil 3.12. Kullanılan Sodyum Sitrat'ın dışarıdan görüntüsü.....	38
Şekil 3.13. Ötenazi uygulanan sıçandan intrakardiyak olarak kan alınması.....	38
Şekil 3.14. Kit içerisinde 10 ml ye tamamlanmış kanın görüntüsü ve Eritrosit Kollektörü'nün takılmış hali.....	39
Şekil 3.15. Santrifüj aletinin ayarlanması.....	39

Şekil 3.16. Santrifüj edildikten sonra PRP kiti ve eritrosit kollektöründe eritrositlerin toplanması.....	40
Şekil 3.17. 2. Santrifüj sonrası ve kullanılacak PRP elde edilmesi	40
Şekil 3.18. Sıçan supin pozisyonu	42
Şekil 3.19. Sıçan önkol volar insizyonu ve sonrasında önkol kas gruplarının görünümü.....	42
Şekil 3.20. Sıçan önkol kas diseksiyonu sonrasında Radius kemik cismine ulaşım	43
Şekil 3.21. Radius cisminden Kerrison Rongeur yardımı ile defekt oluşturulması	43
Şekil 3.22. Radius cisminde defekt görünümü	44
Şekil 3.23. Omentum biyoçatının küp şeklide kesilerek hazırlanması.....	44
Şekil 3.24. Omentum biyoçatının osteotomi hattına yerleştirilmesi.....	45
Şekil 3.25. Omentum biyoçatının PRP enjeksiyonu ile ıslatılması ve uygulanabilir hale getirilmesi	45
Şekil 3.26. Deselülerize omentum biyoçatısı ve kök hücre uygulaması	46
Şekil 3.27. Deselülerize omentum biyoçatının PRP ve kök hücre kombinasyonu ile beraber uygulanması	46
Şekil 3.28. Diseksiyon sonrası önkol çift kemik görünümü.....	47
Şekil 3.29. Örneklerin üç nokta basıncına maruz bırakılması	50
Şekil 4.1. Kontrol grubunun radyografik görüntüsü.....	52
Şekil 4.2. Omentum grubunun radyografik görüntüsü	53
Şekil 4.3. Omentum + Kök hücre grubunun radyografik görüntüsü	54
Şekil 4.4. Omentum + PRP grubunun radyografik görüntüsü.....	55
Şekil 4.5. Omentum + PRP + Kök hücre grubunun radyografik görüntüsü.....	56
Şekil 4.6. Cook skalasına göre grupların ortanca değeri ve sonuçları.....	57
Şekil 4.7. Kontrol grubu örneği, 4x mikroskopik görüntüsü.....	60
Şekil 4.8. Kontrol grubu örneği, 10x mikroskopik görüntüsü.....	60
Şekil 4.9. Kontrol grubu örneği, 20x mikroskopik görüntüsü.....	61
Şekil 4.10. Omentum grubu örneği, 4x mikroskopik görüntüsü	62
Şekil 4.11. Omentum grubu örneği, 10x mikroskopik görüntüsü	62
Şekil 4.12. Omentum ve kök hücre grubu örneği, 10x mikroskopik görüntüsü.....	63

Şekil 4.13. Omentum ve kök hücre grubu örneği, 20x mikroskopik görüntüsü.....	64
Şekil 4.14. Omentum ve kök hücre grubu örneği, 40x mikroskopik görüntüsü.....	64
Şekil 4.15. Omentum ve PRP grubu örneği, 4x mikroskopik büyütme	65
Şekil 4.16. Omentum ve PRP grubu örneği, 10x mikroskopik büyütme	66
Şekil 4.17. Omentum ve PRP grubu örneği, 20x mikroskopik büyütme	66
Şekil 4.18. Omentum, PRP ve kök hücre grubu örneği, 4x mikroskopik büyütme	67
Şekil 4.19. Omentum, PRP ve kök hücre grubu örneği, 10x mikroskopik büyütme	68
Şekil 4.20. Salkeld Skorum Sistemi skorlarının grafisi	70
Şekil 5.1. Mezenkimal kök hücre ve osteoblastik yoldaki etkili moleküler ve genetik prekürsörler.....	73

TABLÖLAR**Sayfa No:**

Tablo 2.1.	Kemik defektlerinde tedavi algoritması	14
Tablo 2.2.	Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri	20
Tablo 2.3.	Biyoçatı Materyalleri ve alt başlıkları	23
Tablo 3.1.	Grupların belirlenmesi	28
Tablo 3.2.	İyileşmenin değerlendirilmesi için radyografik skala (Cook)	48
Tablo 3.3.	Salkeld Skorlama Sistemi	49
Tablo 4.1.	Gruplar arası skorların Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılması	58
Tablo 4.2.	Biyomekanik bulguların Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirilmesi	59
Tablo 4.3.	Histolojik bulguların Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirilmesi	68

1. GİRİŞ

Kemik defektlerinin tedavisi ortopedik cerrahide halen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Özellikle hastalarda tedavi planını belirlemede yaş, kronik hastalıklar varlığı, beslenme durumu gibi birçok faktör rol oynamaktadır. Aynı zamanda var olan yumuşak doku ve kemik kaybı da tedavide dikkate alınmalıdır. Masif osteoliz, yüksek enerjili travmalar ve açık kırıklar, kemik tümörleri, kemik enfeksiyonları, metabolik hastalıklar kemik defektlerine en sık yol açan hastalıklar olarak örneklendirilebilir. Yapılan çalışmalarda kritik kemik defekti tanımı net olarak kemik çapının %50'nden fazla kemik kaybı veya kemikte 1-2 santimetre (cm)'lik kemik defekti oluşması olarak yapılmaktadır. Kritik kemik defektinin iyileşmesini etkileyen faktörlerde;

1. Tüm kemikte çevresel kayıp
2. Diyafizde olan kemik defekti
3. Çevreleyen yumuşak dokuların zarar görmüş olması (periost ve kas dokusu)

rol almaktadır.

Tedavi için literatürde birçok yöntem tarif edilmiştir. Bu tedavi yöntemleri arasında başlıcaları otolog kemik greftleri, allogreftler, demineralize kemik matriksi gibi dışarıdan uygulanacak destek dokular ile beraber cerrahi tedaviler arasında da Masqualet tekniği, distraksiyon osteogenezisi, akut kısaltma ve sonrasında fiksator destekli uzatma tedavileri veya vaskülarize fibula grefti gibi tedavi seçenekleri de mevcuttur. Aynı zamanda tedavi edilemeyecek hastalarda literatürde önerilmese de amputasyon da bir seçenek arasındadır. Tedavi seçeneklerinin uzun süreli olması, genellikle tekrarlayan cerrahi ihtiyacı olması, maliyet-fayda olarak çok efektif olmaması ve ek morbidite yaratması nedeni ile ortopedik tedavide yeni çözümler aranmaktadır.

Literatür taramasında uygun biyoçatı tanımı doğal dokuyu taklit edebilme yeteneği olan, hücre tutunması, proliferasyonu ve diferensiyasyonuna izin veren ve yardımcı olan bir biyomateryal olarak tanımlanmaktadır.

Tedavi süreci uzun ve zahmetli ve maliyeti yüksek bu ortopedik sorun için hala günümüzde optimal bir tedavi bulunmamaktadır. Çalışmanın amacı;

1. Kritik kemik defektlerinde kaynamayı sağlayabilecek uygun bir biyoçatı üretilebilir mi?
2. Kaynama ve iyileşme daha fazla nasıl geliştirilebilir?

olarak özetlenebilir.

Çalışmada 5 farklı grup oluşturularak daha önce literatürde denenene ve tek başına kemik kaynamasına faydalı olduğu gösterilen PRP (*Platelet Rich Plasma*, Trombosit Zengin Plazma) ve kök hücre tedavileri eklenerek kaynama için en iyi tedavi kombinasyonu bulunmaya çalışılmıştır.

Bu çalışma sonucunda elde edeceğimiz bilgilere göre kritik kemik defektlerine uygulanabilecek, tedavi süresini kısaltan ve tekrarlayan cerrahi girişimlere ihtiyacı olmayan bir tedavi yöntemi bulmayı hedeflemekteyiz.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemiğin Genel Özellikleri

Kemik, vücudun destek ve koruma görevini üstlenen en sert dokusudur. Kemik durağan görüntüsüne rağmen aktif bir organdır. Kemik matrikste yer alan inorganik maddelerden özellikle kalsiyum ve fosfat metabolizması ile olan ilişkisi nedeni ile kemik yapım ve yıkımı eş zamanlı olarak devam etmektedir. Bu döngü aynı zamanda organik komponentlerden kollajen matriks, boyut, kemik yapısı, kemik iyileşmesi ile de yakından ilgilidir. Bu döngüde herhangi bir defekt kemikte bir hastalık ile ilişkilendirilebilir (1). Bu sebeple kemiğin histolojisini ve fizyolojik özelliklerini iyi bilmek gereklidir.

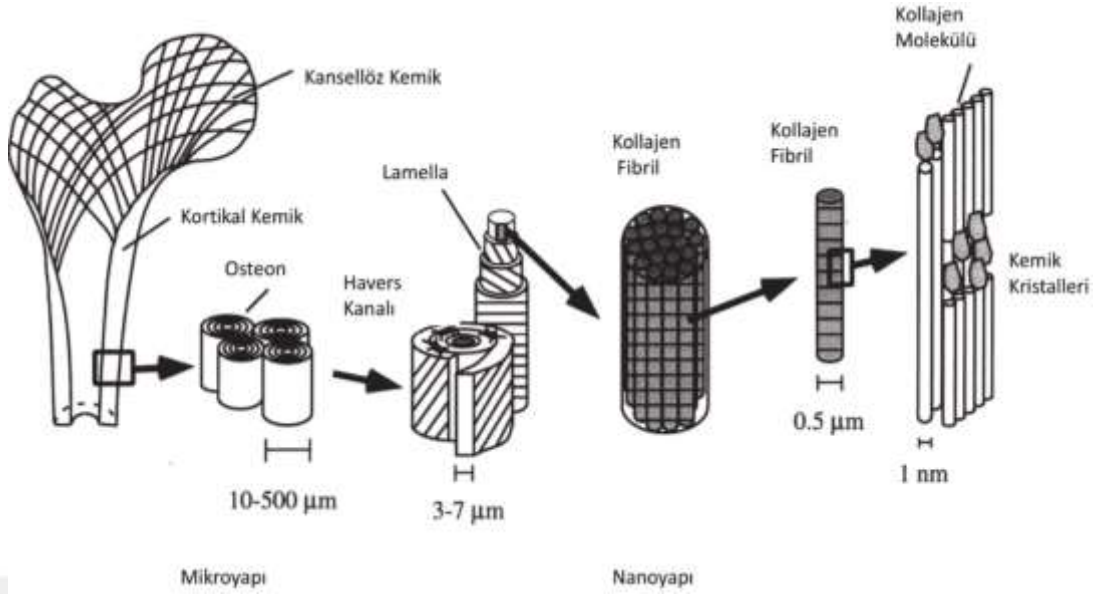
2.1.1. Kemiğin Yapısı

Kemiğin yapısına genel olarak bakıldığı zaman makro dış yapı ve mikroskopik görüntü olarak ayrılabilir.

2.1.1.1. Makro dış yapı

Kemik histolojisinde kesitsel yüzeyi incelendiği zaman dış tarafta kortikal veya kompakt kemik içte ise kansellöz veya trabeküler kemik görülür. Kortikal kemik ince barlar halinde kansellöz kemiği sararlar. Kortikal ve trabeküler kemikler benzer hücresel yapıya sahip olmasına rağmen matriks organizasyonu ve mekanik özellikleri bakımından farklılaşırlar (2).

Kortikal veya kompakt kemik daha çok uzun kemiklerin gövde kısmında ve yassı kemiklerin yüzeyinde bulunurken kansellöz veya trabeküler kemik toplamda daha az olmak üzere, genellikle uzun kemiklerin uç kısımlarında veya yassı kemiklerin içerisinde bulunurlar. Kortikal kemiklerde Havers sistemlerinin oluşturduğu lamellalar ile sert bir yapı oluştururken, kansellöz kemiklerde ise birbiri ile bağlantılı plaklar ve trabeküller ile bal peteği görüntüsü oluştururlar (1).



Şekil 2.1. Kemik makroskopik ve mikroskopik yapısının şematik görünümü*

* Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, Medical Engineering & Physics 20 (1998) 92–102

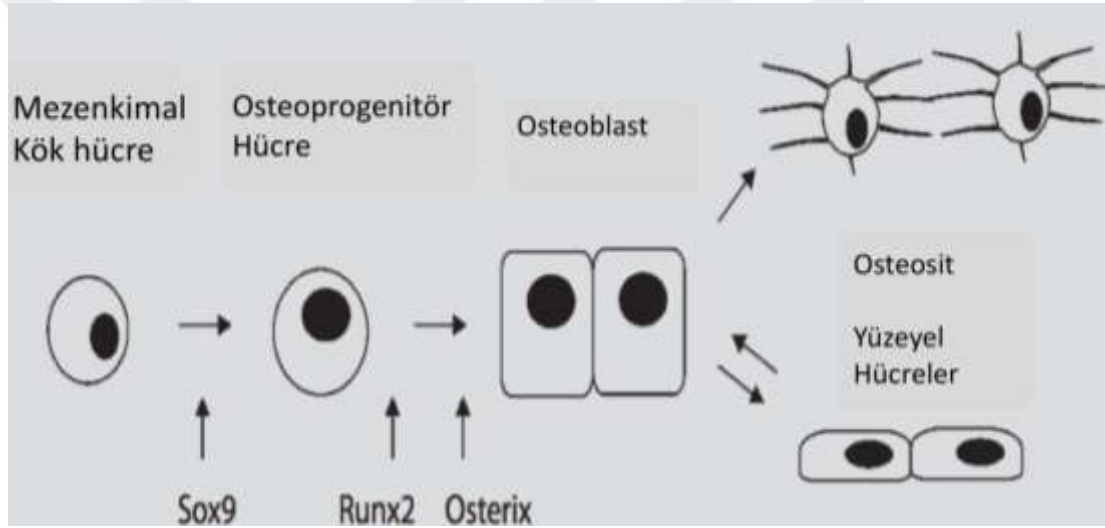
2.1.1.2. Mikroskopik yapı

Mineralize kemiğin mikroskopik yapısında 2 kemik yapısı bulunmaktadır. Bunlar örgümsü veya primer kemik ve lamellar veya olgun kemik olarak adlandırılmaktadırlar. Örgümsü kemik embriyonik dönemde, büyüme plaklarında veya iyileşme dokusunda bulunur. Olgun kemikte ise kemik, tendon yapışma yerlerinde az miktarda bulunmaktadır. Lamellar kemik ise olgun kemiğe verilen addır, örgümsü kemikten farklı olarak daha az hücre sayısına sahiptir ve bu hücreler daha yavaşlırlar. Örgümsü kemiğe bakıldığında olgun kemiğe göre 4 kat daha fazla hücre sayısı içermekte, aynı zamanda kollajen lifleri dağılımı daha düzensiz ve mineralizasyonu daha değişkenlik göstermektedir. Lamellar kemik kollajen fibrilleri çapları daha küçük, birbirlerine sıkıca tutulmuş tabakalar halindedirler ve mineral dağılımı düzenli ve eşittir (3) (Şekil 2.1). Bu nedenle örgümsü kemik lamellar kemikten daha esnektir ve immatür kemik ve iyileşen kırık kemik olgun iskelete göre daha az sertlik ve dayanıklılık gösterir.

2.1.1.3. Hücre kompozisyonu

Kemik canlı bir doku olduğundan dolayı devamlılığı için hücrelerin koordineli çalışmaları gerekmektedir. Bu sebeple birden fazla hücre gruplarına ihtiyaç bulunmaktadır. Bu hücreler ise farklılaşmamış veya osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositlerdir (4).

Osteoprogenitor hücreler farklılaşmamış ve başka dokularda da bulunabilen tek nükleuslu, küçük ve az organelli bir hücrelerdir. Farklılaşma uyarısı alana kadar latent bir pozisyonda beklerler ve uyarı ile beraber osteoblastlara dönüşürler (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Osteoprogenitor hücre osteoblast ve osteosit dönüşümü*

*Grabowski, P. (2009). Physiology of Bone. Endocrine Development, 32–48.

Osteoblastlar, mezenkimal kök hücrenin osteoprogenitor hücreye dönüşmesi sonrasında oluşan tek hücreli, ekzantrik nükleuslu, sentetik organelleri içeren küboidal hücreleridir (5). Aktifleştiklerinde iki yol izlerler. Sentetik aktivitelerini azaltarak yüzey hücresi haline gelirler veya sentezledikleri matriksle sardırarak osteosit haline dönüşürler (Şekil 2.2). Yüzeyel hücreler ise kemik yüzeyinde olup, kemik rezorpsiyonu da olmayan aynı zamanda yeni kemik formasyonunun olmadığı bölgede bulunurlar (6).

Osteositler, olgun kemiğin % 90'ından fazlasını oluşturan hücrelerdir. Laküna içerisinde yerleşimli olup, dendritik uzantıları ile beraber diğer osteositler ile bağlantı halindedirler. Beraber yuvarlak yerleşimleri ile en küçük kemik birimi olan osteonu, osteonlar ise havers sistemini oluştururlar (Şekil 2.1). Bu sistem kortikal kemiğin ana komponentidir. Kemik mineral yapısı ve ekstraselüler matriksi ile, dendritik uzantıları arasındaki bağlantısı kan ile kemik arasındaki mineral alış verişini imkanı için kritiktir. Vücut mineral balansını dengede tutmak için yardımcı olurlar (7).

Osteoklastlar, çok nükleuslu, sitoplazmasında yüksek enerji ihtiyacı için çok sayıda mitokondri içeren, kemik matriks içerisine çok sayıda kompleks sitoplazmik uzantısı bulunan kemiğin büyük bir hücreleridir. Uzantılarında bulunan hidrojen iyonları ve proteolitik enzimler sayesinde kemik rezorpsiyonu sağlarlar. Bu sayede Howship lakünaları denilen kemik üzerinde çukurlar yaratarak kemiğin yeniden şekillendirilmesinde rol oynarlar.

2.1.1.4. Kemik matriksi

Kemik matriksi organik ve inorganik olarak 2 grupta toplanabilir. İnorganik matriks kemik kuru ağırlığının yaklaşık %70 ini oluştururken organik matriks ise kalan kısımları tamamlar.

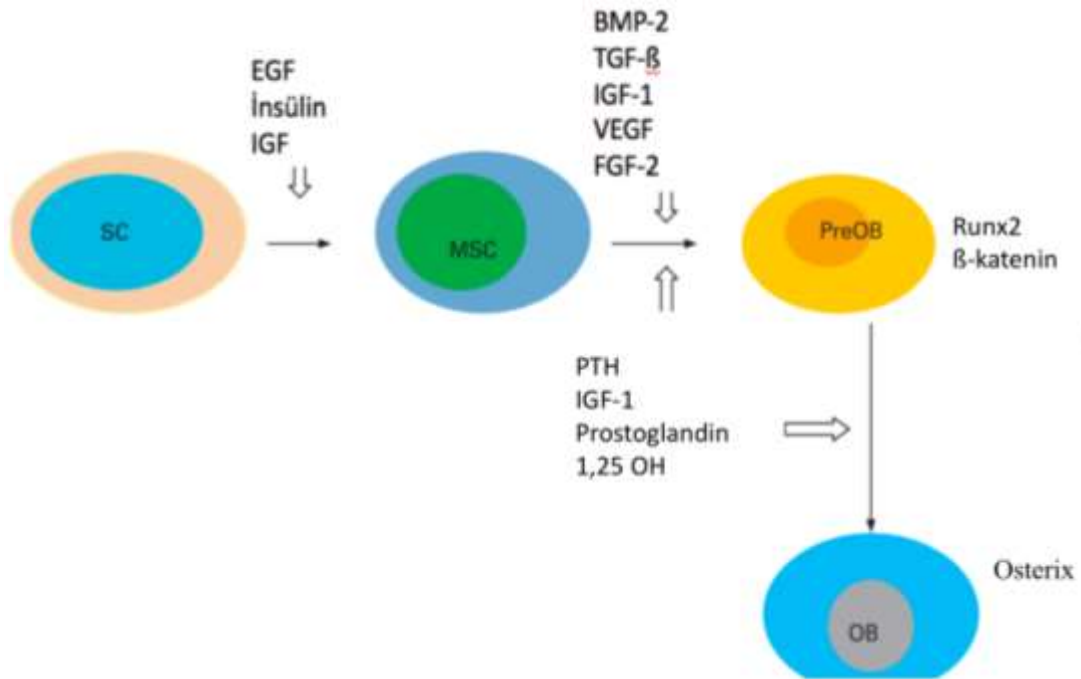
Organik matriks daha çok sıkı fibröz dokuya benzer. Tip 1 kollajen organik matriksin yaklaşık %90'ını oluşturmaktadır. Diğer %10'luk kısım ise küçük proteoglikanlar, osteonektin ve az miktarda tip 5 kollajen ve diğer kollajenlerden oluşmaktadır. Mineralizasyonun stabil olarak tutulması ile beraber kemik su tutulumunu da sağlayan yapısıdır. Mineralizasyon oluşuktan sonra rezorpsiyonuna kadar organik matriks stabil kalır.

İnorganik matriks ise komponent olarak bakıldığında daha çok kalsiyum içeriklidir. Aynı zamanda sodyum, magnezyum sitrat, florür ve eser elementler de içermektedir (8). Mineralizasyonun artması ile beraber kemik sertliği artmaktadır. Bu ise çocuklarda ve erişkinlerde kırık oluşumunun farklı olması nedenini açıklar.

2.1.2. Kemik Fizyolojisi

Kemik dinamik bir organ olması sebebi ile yeni kemik oluşumu ve rezorpsiyonu aynı anda oluşmaktadır. Dinamik olarak osteoblastlar yeni kemik sentezi yaparken, osteoklastlar ise kemik rezorpsiyonundan sorumludurlar. Bu mekanizmalar ise moleküler düzeyde sistemik ve lokal faktörler etkisi altındadır. Özellikle 20 yüzyıl itibari ile literatür osteoblast ve osteoklast hücrelerin hormonal kontrolüne odaklanmıştır (9).

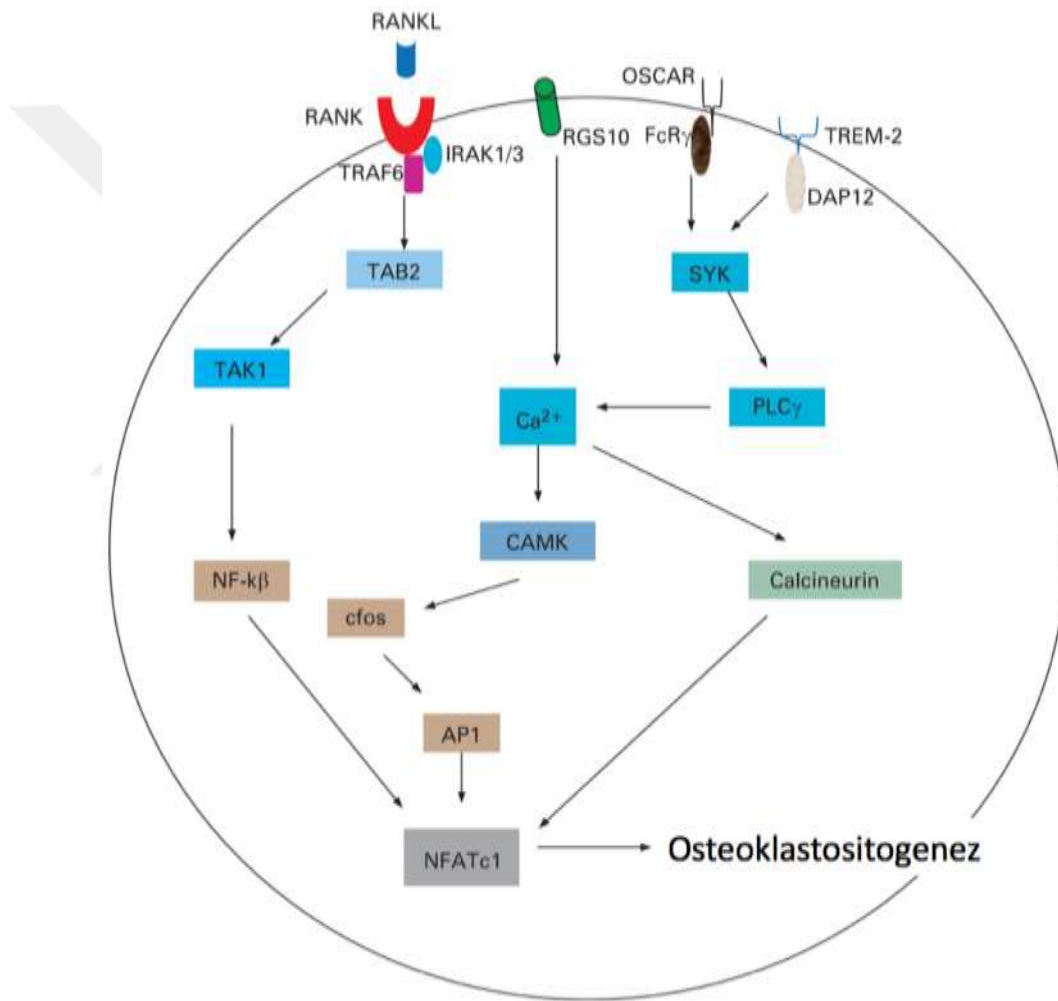
Osteoblastlar, mezenkimal kök hücre diferansiyasyonunda Parathormon (PTH) ile beraber Büyüme Hormonu (GH) ve prostoglandinleri kullanırlar. Son zamanlarda İnsülin Benzeri Büyüme Hormonu (IGF-1) da önemli etkilere sahip olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β) süper ailesine ait Kemik Morfogenetik Protein (*Bone Morphogenetic Factor*, BMP) osteoblast indüksiyonunda önemli etkilere sahiptir (10). BMP-2 ve BMP-7 RUNX ve Osterix genleri üzerinden mezenkimal kök hücrenin osteoblast dönüşümünde transkripsiyonel etkileri bulunmuştur (11) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kök hücrenin osteoblast dönüşümü*

* Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., & Varanasi, S. S. (2008). The cell Biology of Bone Metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 61 (5), 577–587.

Osteoklastlar ise bilindiği üzere kemik rezorpsiyonundan sorumlu hücrelerdir. Bu hücre aktivasyonunda özellikle 2 reseptör fizyolojik olarak rol oynar. Bu reseptörler RANKL (Nüklear Faktör Kappa Beta ligandı, NF- κ B) ve M-CSF (Monosit-koloni Stimüle edici Faktör) dir. Bu reseptörlerden RANKL osteoblast ve osteoklast etkileşiminde önemli rol oynar. RANK Ligandı aktivasyonu ile tirozin kinaz (TAK1) aktive olarak osteoklastositogenezi başlatarak kemik rezorpsiyonunu başlatırlar (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Osteoklast aktivasyonu*

* Datta, H. K., Ng, W. F., Walker, J. A., Tuck, S. P., & Varanasi, S. S. (2008). The cell biology of bone metabolism. *Journal of Clinical Pathology*, 61 (5), 577–587.

Osteositler ise makaslama kuvveti ve mekanik stres sonrasında oluşan mikro kırıklarda kemik metabolizmasında merkezi bir rol oynarlar. Dendritik uzantıları yardımı ile sadece kemik metabolizması değil aynı zamanda iskelet sistemi ve kalsiyum ve fosfat metabolizması üzerinde de büyük rolleri mevcuttur (1).

2.2. Kemik Defektları ve Kritik Kemik Defekt Tanımı

Kemik defektları ortopedik cerrahide sık karşılaşılan bir hastalıktır. Birçok sebep ile kemik defekti oluşabilir. Bunlar arasında en sık olarak yüksek enerjili travmayı takiben kemik kaybı ile beraber açık kemik kırıkları, çok parçalı kemik kırıkları, patlama yaralanmaları, enfeksiyonlar, herhangi bir sebebe bağlı kemik debridmanları, tümör rezeksiyonları, osteolize bağlı olarak gelişebilir (12).

Kemik defekt tedavisinin yönetimi hem zorlu bir süreç hem de uzun süreli olduğundan dolayı tedavi planı ve karar verilmesi ekstra önem arz etmektedir. Tedavi planı yanlış yapıldığı takdirde uzun dönem sonuçlarda daha sık komplikasyon ve kötü sonuçlar literatürde tanımlanmaya devam etmektedir. Ancak kemik defekt tedavisi ve yönetiminde literatürde hala net bir ortak karar bulunmamakta ve karar vermede kanıta dayalı tıp kullanma zorluğundan dolayı hala net bir algoritma bulunmamaktadır (12). Bu sebeplerden dolayı literatürde kritik kemik defekt tanımı yapılması gerekmiştir. Rutin kemik defekt tedavisinde planlanan tedavilerin bir kısmının kritik kemik defekt tedavisinde kullanılmaması, kullanıldığında hastalara gereksiz ko-morbiditeler yaratması ve iyileşmede zaman kaybı yarattığından dolayı bu tanımlama ihtiyacı duyulmuştur (13).

Genel olarak kritik kemik defekt tanımı yeterli cerrahi stabilizasyona rağmen kendiliğinden iyileşmeyen ve ek cerrahi tedaviye ihtiyaç duyan defekt olarak tanımlanmıştır (14). Genel klavuzlara bakıldığı zaman ise tanımında, kemik çapının %50' den fazlasında kemik kaybı ile beraber en az 1-2 cm'lik kemik defekt olarak tanımlanmıştır (15). Aynı zamanda sık olarak hayvan modellemesi kullanıldığından dolayı ayrıca bir tanımlama daha getirilmiştir. Bu tanımlamada, hayvanın tüm hayatı boyunca iyileşemeyen en küçük kemik defekt veya hayvanın hayatı boyunca beklenmesine rağmen %10'dan fazla iyileşme gösteremeyen kemik defekt olarak bahsedilmektedir (16, 17).

Yine kritik boyutu mutlak ve göreceli olarak ayrıca tanımlanabilir. Bu tanımlama içerisinde bu sefer kemiğin çevresel olarak kaybı, kemik kaybının olduğu anatomik lokasyon (metafizler, diyafizler veya artiküler), eşlik eden yumuşak doku yaralanması, periosteal yaralanma, ek hastalık varlığı veya ko-morbiditeler de bulunmaktadır (12). Genellikle kontrollü hayvan model çalışmalarında bu durumlar dahil edilmez veya devre dışı bırakılır (18, 19). Yani hayvan modellemesine göre insan hastalarda kritik boyut daha da farklı ve az boyutta olabilmektedir.

Aynı zamanda kemik defektini kaynamama ile karıştırmamak gereklidir. Kaynamamada bozulmuş bir hücresel iyileşme ile beraber moleküler düzeyde eksiklik bulunmaktadır. İyileşmede herhangi bir eksiklik kemik kaybı boyutu göz önünde bulunmaksızın kaynamama yaratabilir. Ancak kritik kemik defektlerinde ise vücudun kemik defektini kapatabilecek düzeyde yeterli kemik üretememesi durumu mevcuttur. Bu durumda hücresel ve moleküler fonksiyonlarda herhangi bir sorun bulunmamaktadır (20). Bu durum tedavi planı açısından ciddi önem arz eder. Çünkü kaynamamada uygulanacak tedavilerin hiçbirisi kritik kemik defekti tedavisinde uygulanamaz.

2.3. Kemik Defekti Tedavisi

Kemik defekti tedavisinin kararı verilmeden önce kemik iyileşmesi hakkında bilgi sahibi olunması gereklidir. Bu bilgiler ışığında tedavi planlanabilmektedir.

2.3.1. Kemik İyileşmesinin Fizyolojisi ve Histolojisi

Kemik erişkin hayatta iyileşebilme özelliği gösterebilen ender matür dokulardan bir tanesidir. Bu durum fizyolojik ve biyomekanik olarak birçok faktörün bir araya gelmesi ile oluşmaktadır (21, 22). Hayvan deneyleri ile özellikle iyileşmenin histolojisi, biyomekaniği ve biyokimyası daha iyi anlaşılabilmiştir (23).

Kemik iyileşmesinde iki temel histolojik tip tarif edilmiştir. Primer ve sekonder iyileşme olarak ta adlandırılmaktadır.

Primer kemik iyileşmesi veya diğer adı ile direkt kemik iyileşmesi, kemiğin doğal iyileşmesinde çok sık olarak rastlanmamaktadır. Özellikle tam anatomik

redüksiyon sonrası ve mutlak stabil bir fiksasyon sonrasında görülen bir iyileşme biçimidir. Primer iyileşmede kontakt iyileşme ve boşluk (gap) iyileşme şekilleri görülebilir. Kontakt iyileşme özellikle her iki kırık uç arasında 0.01 mm ve %2 den az deformasyon olduğu zaman görülür (24). Bu koşul sağlandığı zaman öncelikli olarak osteoklast aktivasyonu ile beraber kırık kısımlarda longitudinal kaviteler oluşmaya başlar ve günlük 50-100 µ arasında uzunluk olarak ilerler. Bu kaviteler daha sonra osteoblastlar tarafından doldurularak kemik kaynaması sağlanır (25). Böylece yeniden Havers sistemleri oluşur ve bu sistem ile beraber penetran kan damarları osteoblast-osteosit dönüşümü için elzem olan biyokimyasal prekürsörleri taşır. Köprüleşen osteonlar ile beraber kemik iyileşmesi periosteal kallus dokusu oluşmadan tamamlanmış olur. İkinci iyileşme olan boşluk iyileşmesinde ise bu aralık yaklaşık 800 µ ile 1 mm arasındadır (26). Önce bu aralık lamellar kemik ile aks boyunca doldurulduktan sonra sekonder osteon formasyonu oluşur. Ve osteon formasyonunu içerisindeki yeniden vaskülarizasyon, osteoprogenitör hücreleri taşır ve kırık hattı boyunca osteoblast formasyonunu tetikler. Yeni oluşturulan bu kemik daha zayıf olmak ile beraber 3-8 hafta sonra remodelizasyon ile yine kallus dokusu oluşmadan kırık iyileşmesi sağlanmış olur (24).

Sekonder (indirekt) kırık iyileşmesine bakılacak olursa, bu iyileşme şekli en sık görülen kırık iyileşme şeklidir (27). Primer kemik iyileşmesinden farklı olarak mutlak stabilizasyon ve tam anatomik redüksiyonun tam tersine mikro-hareket ve yük taşıma sonrasında görülen bir iyileşme şeklidir. Bu iyileşme şekli ortopedik tedavilerde özellikle tüm cerrahi olmayan tedavilerde ve aynı zamanda intramedüller çivi, eksternal fiksasyon ve komplike komüne kırıklarda bazı internal fiksasyon tedavilerinde görülmektedir (28). Fizyolojisinde öncelikli olarak basamaklarına bakıldığında, ilk önce akut travmayı takiben kırık hematoma oluşmaktadır. Bu hematoma içerisinde periferik ve intramedüller kan hücreleri ile beraber kemik iliği kök hücreleri de bulunmaktadır. Bu yaralanma ile erken dönemde inflamatuvar faz başlamakta ve bu faz iyileşmeyi sağlamaktadır. Bu inflamatuvar faz özellikle kırık hematoma oluşuktan sonra ilk 24 saatte başlar ve 7 güne kadar sürer ve hematoma koagülasyonunu takiben yumuşak kallus dokusu oluşumuna kadar devam eder. Kırık hematoma literatürde özellikle interlökinler (İL-1, İL-6) *Tumor Nekrosing Factor-a* (TNF-a), *Fibroblast Growth Factor* (FGF), *İnsulin-like Growth Factor-1* (IGF-1),

Platelet Derived Growth Factor (PDGF), *Vascular Endotelial Growth Factor* (VEGF), *Transforming Growth Factor* (TGF süperfamilyası, BMP-2, BMP-7) sinyal molekülleri açısından önem arz eder. Bu moleküller endotelial hücreler ile beraber makrofajlar, monositler, trombositler tarafından sentezlenmekte olup bu sentezlenmeye göç eden osteoblastlar ve osteoklastlar da katılırlar. Literatürde biyokimyasal düzeyde bu faktörler tanımlanırken kırık iyileşmesinde aynı zamanda bu faktörlerden bazılarının da özellikle BMP-2 ve BMP-7 kullanımına başlanmıştır (29-31). İyileşmede bir sonraki basamak ise mezenkimal kök hücre migrasyonu ve bu kök hücrelerin yerleşebileceği bir ekstraselüler matriks oluşumudur. Ekstraselüler matriks iyileşme dokusunda bulunan hücreler tarafınca sentezlenebileceği gibi aynı zamanda da cerrahi planlaması içerisinde bulunabilir. İyileşme için literatüre bakıldığı zaman bu konu hakkında birçok araştırma bulunduğu gibi biyoçatı tanımlaması ve kullanılan biyoçatılar içerisinde bu konuya değinilecektir. Kallus dokusunun oluşumunda gerekli olan kök hücrelerin nereden geldiği tam olarak bilinmemekle birlikte özellikle çevreleyen yumuşak dokudan, periosttan ve kemik iliğinden geldiği düşünülmektedir (32). Kök hücrelerin göçü tamamlandıktan sonra kollajen-1 ve kollajen-2 sentezi ve birçok peptid sentezi başlar. Bu da yumuşak kallus formasyonunun oluşumunu sağlar.

Sekonder kemik iyileşmesi hem encondral hem de intraosseoz ossifikasyonun beraber oluşumu ile sağlanır. Bu durum kartilojen kallus dokusunun oluşumu ve bu dokunun mineralizasyonu ve remodelizasyonu ile tamamlanır. Bahsedildiği gibi primer hematoma takiben fibrinden zengin granülasyon dokusu oluşmaktaydı (33). Bu doku içerisinde her iki kırık hattında encondral ossifikasyon oluşmaktaydı. Mekanik olarak stabilitesi az olan bu uçlarda kartilaj dokusu oluştuğundan sonra yumuşak kallus oluşumu ile kırık stabilleşir (34). Travma sonrasında 7-9 gün sonra yumuşak kallus dokusu oluşmuştur ve bu doku kollajen tip 2 ve proteoglikanlardan zengindir. Aynı zamanda intramembranöz ossifikasyon da uyarılmış olur ve subperiostal olarak mineralizasyon ile beraber sert kallus formasyonu oluşur. Sert kallus formasyonu oluşumu sırasında Koloni Stimüle Edici Faktör (CSF), RANKL, TNF-a, osteoprotegrin gibi biyokimyasal faktörlerin uyarımı ile kartilaj dokusu ekstraselüler matriksinde kalsifikasyon sağlar. Mitokondri içerisindeki granülasyonlar hipoksik zeminde kalsiyum taşımaya başlar ve ekstraselüler matrikse doğru taşındıkça fosfat ile birleşerek apatit kristallerini oluşturur (35). Kondrosit apoptozisi ile beraber

ekstraselüler matriks kollajen tip 1 dominant hali alır ve proteoglikan sentezi artar. Bu formasyon ile kırık uçları arasında kontakt ve yarı-rijit iyileşme dokusu kullanıma ve yük taşımaya uygun hale gelir (27). Eş zamanlı olarak VEGF, anjiopoetinler ile beraber vaskülarizasyonu tetikler ve neo-vaskülarizasyon sağlanmış olur. Aynı zamanda BMP tiplerinin de anjiogenezise katkı sağladığı literatürde gösterilmiştir (36). Sonunda remodelizasyon ile skar dokusu görülmeden kırık iyileşmiş olur. Bu remodelizasyonda osteoklast aktivasyonu takiben sert kallus rezorpsiyonu ve osteoblast aktivasyonu ile lamellar kemik oluşumu rol oynar. Aynı zamanda kemik polaritesi de remodelizasyonda çok önemlidir. Aksiyal yüklenme ile beraber konveks taraf elektropozitif olurken konkav taraf elektronegatifdir. Osteoklast aktivasyonu ve osteoblast aktivasyonu bu elektrik aktivitesine bağlı olarak ta kontrol edilir (23).

Sonuç olarak, uygun kanlanma, uygun nütrisyonal denge ile beraber biyokimyasal moleküler seviyede herhangi bir bozukluk olması durumunda kaynamama görülmektedir. Yine bahsedilmesi gereken diğer önemli bir nokta da mekanik olarak stabilizasyondur. Mekanik olarak instabil ve uygun kanlanma olmayan durumlarda atrofik kaynamama gerçekleşirken, mekanik olarak instabil ve uygun kanlanması olan dokularda hipertrofik kaynamama gerçekleşmektedir. Bu durum da ekstra mekanik stabilitenin iyileşmede önemli olduğunun göstergesidir (37).

2.3.2. Kemik Defekti Tedavisi Yönetimi

Ciddi kemik kaybı, kemik kırıklarında sık rastlanılan bir durum değildir ve tedavisi zordur. Cerrahi tedavisi zaman alıcı, teknik olarak zor, fiziksel ve psikolojik açıdan hasta için zorlayıcı ve başarı şansı açısından garantisi olmayan bir durumdur (14).

Hastalarda öncelikli olarak metabolik ve endokrinolojik durumlar kontrol altına alınmalıdır. Optimal iyileşmede gösterilmiş önemli olan bir çok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında tütün kullanımı ve glisemik kontrol en önemli hasta bazlı faktörlerdendir. Bu durumlar dışında beslenmenin optimalizasyonu ve hormonal balans ta çok değerlidir. Tedavi edilecek hastalarda D vitamini, tiroid ve paratiroid hormon değerlerine bakılması, hipogonadizm varlığının sorgulanması ve olası sıkıntıların giderilmesi tedavide rol oynamaktadır (38). Genel hasta

değerlendirilmesinden sonra travma bölgesi yumuşak doku durumu değerlendirilmelidir. Yumuşak doku rekonstrüksiyonu hasta bazında değerlendirilmeli ve optimal tedavisi yapılmalıdır.

Kemik defektlerinin izole tedavisinde ise cerrahi standartta seçenekler mevcuttur. Bu seçenekler literatürde algoritmik olarak tanımlanmıştır (39) (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Kemik defektlerinde tedavi algoritması

Yönetim Metodu	Defekt Büyüklüğü	Avantajlar	Dezavantajlar
Otolog Kemik Grefti	≤ 5 cm	Tek basamak tedavi, Bulamacı hastalık geçişi yok, İmmünojenik reaksiyon yok, Düşük maliyet, osteoindüktif, osteokondüktif ve osteojenik özellikler	Donör bölge sorunları, sınırlı greft hacmi, yapısal özellikleri yok
Allogreft	Belirsiz	Donör bölge komplikasyonları yok, sınırsız hacim, yapısal özellikleri mevcut	Smürü remodelizasyon, hastalık bulaşma riski, osteoindüktif ve osteojenik özellikler yok, maliyeti yüksek
Demineralize Kemik Matrisi	Segmental kemik defektleri için yetersiz kanıt	Osteoindüktif özellikler, donör bölge komplikasyonları yok	Maliyet yüksek, yapısal özellik yok, segmental kemik defektlerinde kanıt yok
Kemik Morfogenetik Protein	Segmental kemik defektleri için yetersiz kanıt	Osteoindüktif özellikler, kemik grefti artırıcı	Yapısal özellik yok, yüksek maliyet
Masqualet tekniği	≥ 10 cm (5-24 cm arası)	Eksternal fiksasyon veya internal fiksasyon kullanılabilir, ucuz maliyet, rekonstrüksiyon zamanı defekt büyüklüğü ile alakasız	İki basamaklı cerrahi, uzun zamanda iyileşme, allogreft veya otogreft kullanımı 3:1 den fazla olamaz
Distraksiyon Osteogenezisi (İlizarov Tekniği)	5-10 cm	Donör bölge komplikasyonları yok, çoklu osteotomiler ile zaman kısaltılabilir, güvenilir teknik	Uzun rekonstrüktif periyot, Eksternal fiksasyonun uzun süreli olmasına bağlı komplikasyonlar, implant kullanımının pahalılığı
Akut Kısaltma	1-3 cm	Basit ve hızlı yöntem, yumuşak doku problemleri tek seferde çözümlenebilir, donör bölge komplikasyonları yok, ucuz maliyet	Ekstremité kullanımı zorluğu, defekt ve kısaltma büyüklüğüne bağlı olarak tekrar uzatma ihtiyacı, Maliyet yüksekliği
Vaskülarize Fibula Grefti	10-20 cm	Masqualet ve İlizarov tekniğine göre daha hızlı rekonstrüksiyon, ucuz maliyet	Donör bölge sorunları, prosedürün cerrahi olarak zorluğu, limitli kullanım, tekrarlayan kırıklar
Amputasyon	Uygulanamaz	Ekstremité kurtarmaya göre daha hızlı ve ucuz maliyet, genç ve erişkinlerde iyi protez sonuçları	Kalıcı olarak ekstremité kaybı, hayat boyu protez kullanımının maliyeti

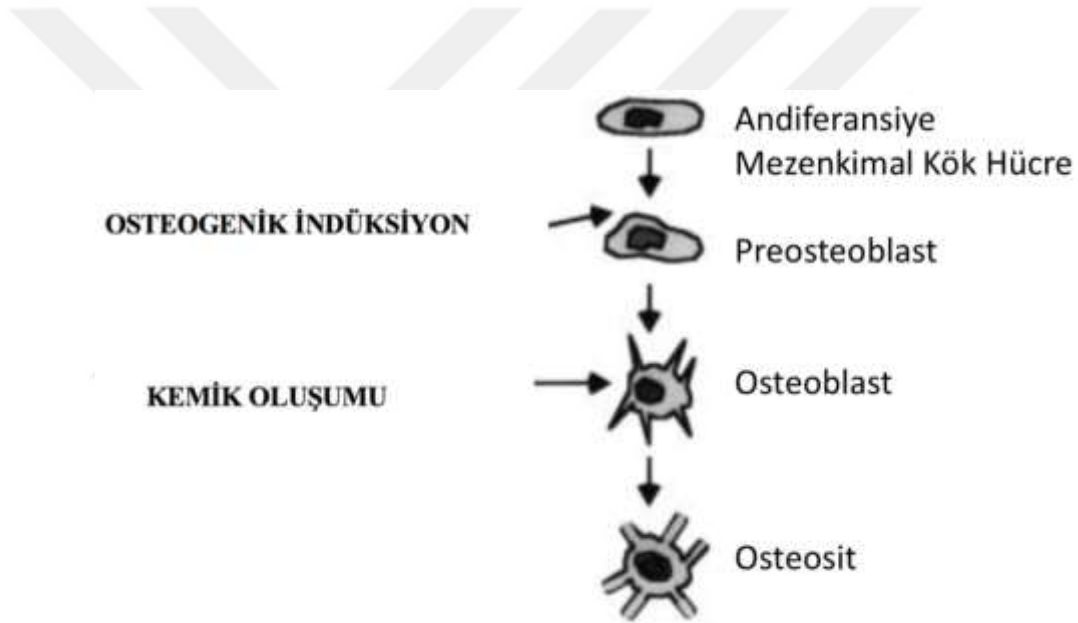
Kemik iyileşmesinde bilinmesi gereken birkaç terim için açıklama gereklidir. Bu terimler özellikle osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteointegrasyondur.

Osteoindüksiyon, andiferansiye pluripotent kök hücrelerin kemik hücrelerine dönüşümüdür. Yani kısaca osteogenesis olarak ta adlandırılabilir (Şekil 2.5).

Osteokondüksiyon ise kısaca kemiğin bir yüzey üzerine veya kanallarına, porlarına veya boşluklarına doğru büyümesidir (40).

Osteointegrasyon biraz daha farklıdır. İmplant ile kemik arasındaki direkt kontakt olarak adlandırılabilir (41). Histolojik olarak ise implant ile kemik arasında fibröz doku oluşmadan direkt olarak kemik oluşumu olarak tanımlanmıştır. Dolayısı ile osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteointegrasyon birbiri ile iç içe geçmiş tanımlardır ve kemik iyileşmesinde önemlidirler.

Tedavide defektif kemik yerine konulabilecek implant veya greft üç özellik içermelidir; osteokondüktif matriks, osteoindüktif proteinler ve osteojenik hücreler. Bu komponentlerin hepsini içeren implant veya greft tedavide altın standart olmalıdır.



Şekil 2.5. Osteoindüksiyon*

* T., A., & C., J. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal*, 10 (0), S96–S101.

Bu bilgiler ışığında defekt tedavisine dönüldüğü zaman ilk olarak otolog kemik greftleri 5 cm den küçük defektlerde kullanılabilir. Özellikle osteokondüktif özellikleri ağır basmakla beraber aynı zamanda küçük te olsa osteoindüktif özellikleri de mevcuttur. İliak kanattan alınan greftler hala günümüzde altın standart tedavi yöntemi olarak geçmektedir. Yine literatürde vurgulanan artık *Reamer-Irrigator-Aspirator* (RIA) da otolog greft alınma yöntemi olarak öne çıkmaktadır (42). 5 cm’den büyük defektlerde ise greft rezopsiyonu görülmekte ve nekrotik kemik dokusu temizlendiği

görülmektedir (43). Bu sebeple büyük defektlerde kullanılamamaktadır. Aynı zamanda donör bölge sorunları da yine bu tedavi şekli komplikasyonlarındandır (44).

Bir diğer tanımlanmış tedavi yöntemi ise allogreftler veya kemik grefti yerine konulabilecek materyallerdir. Öncelikli olarak allogreftler, kansellöz ve kortikal olarak ayrılabilir. Burada kansellöz allogreftler osteokondüktif bir materyal olarak görev almakta olan devital greft şeklindedir. Kortikal allogreftlerde ise yapısal olarak katkıda bulunurlar. Kemik yer değiştirme ‘ (*Creeping Substitution*) ’ ile vitalize dokuya dönebilirler. Demineralize kemik matriksi ise hidroklorik asit ile mineralizasyonu azaltılmış kemik matriksi olarak tarif edilebilir. Bu durumda kemik allogreftinde osteokondüktif matriks ile beraber osteoindüktif büyüme faktörleri bulunmaktadır. Donör kemik ve alınma şekli ile kalitesi değişmektedir (45). Bu tedavi yöntemleri ise maliyeti yüksek, aynı zamanda kemik defektlerinde kullanımı sınırlıdır. Özellikle demineralize kemik matriksi için yeterli kanıt ta yoktur.

Otolog kemik greftleri 5 cm den büyük kemik defektlerinde rezorpsiyonu ile beraber kullanımı uygun değildir. Bu durumda Masqualet alternatif olarak indüklenmiş membran tekniğini öne sürmüştür. Bu teknikte büyüme faktörlerinden özellikle VEGF, TGF-a, BMP-2 gibi zengin, ayrıştırılmış bir kompartman yaratılmak istenmiştir (46). Bu kompartman ile greft rezorpsiyonu azaltılarak aynı zamanda bu faktörler yardımı ile ve membranın vaskülarizasyonu ile konsolidasyon arttırılmak istenmiştir. Dolayısı ile defekt büyüklüğünden bağımsız olarak kemik kaynaması sağlanabilmesi hedeflenmiştir (47). İki basamaklı bir tedavi şeklidir. Öncelikli olarak Polimetil metakrilat ile defekt boşluğu korunarak membran oluşumu sağlanır ve 2. basamak cerrahi tedavide ise bu boşluk greftlenir. Uzun süreli bir tedavi yöntemi oluşu, kullanılan implantların maliyeti ve tekrarlayan cerrahi ihtiyacı her ne kadar güvenilir bir tedavi olsa da bu tekniğin olumsuz yönlerindendir.

Distraksiyon osteogenezisinde, segmental bir kemik kaybı başka bir seviyeden mobilize olmuş kemik segmenti ile kapatılmaya çalışılır. Bu segment mobilize hale getirildikten sonra, eksternal fiksator veya intramedüller çivi yardımı ile kontrollü bir şekilde kaydırılması ana prensibidir. İlizarov tarafından popülerize edilmiş olup kendisinin ürettiği sirküler fiksatorların daha sonra monolateral ile de uygulanabildiği gösterildikten sonra daha fazla çalışma ve cerrahi uygulama içerisine girmiştir. Pre-

operatif planlama sonrasında kurulacak olan ‘frame’ teller ve pinler yardımı ile fiksasyonu yapılır. Takibinde metafizyal olarak kortikotomi yapılarak mobilize bir segment oluşturulur. Genellikle 1 hafta süren bir latent periyod sonrasında ise günlük 1 mm olacak şekilde segmentin kaydırma işlemi gerçekleştirilir (48).

Bu yöntemin avantajlarına bakıldığında zaman güvenilir olması, defekt büyüklüğünden bağımsız olarak tedavi edilebilirliği, ek olarak yumuşak dokulara zarar vermemesi olarak gösterilebilir. Ancak uzun süren tedavi olması, hastaya psikolojik olarak ciddi yük bindirmesi, uzamış eksternal fiksasyonda pin dibi enfeksiyonları ve tekrarlayan hastanede kalış süreleri göz önünde bulundurulmalıdır. Maliyeti yüksek bir tedavi olması ve aynı zamanda eksternal fiksasyon çıkarıldıktan sonra yeniden kırık oluşabilmesi veya deformasyon gelişme ihtimali de bu tedavinin olumsuz yönlerindendir (49).

Akut kısaltma da en basit ve en hızlı tedavi yöntemlerinden bir tanesidir. Aynı zamanda bu tedavi erken dönemde yumuşak doku rejenerasyonuna izin verebilen, primer yara onarımı sağlayabilen bir tedavi yöntemidir. Sıklıkla ekstremité uzunluk farkının önemi daha az olan üst ekstremité segmenter kemik kayıplarında kullanılabilir. Daha sonrasında uzatma veya distraksiyon osteogenezi kullanımı ihtiyacı olması, kısaltma sırasında damar katlantısı sebebi ile perfüzyonun bozulması, kısalığa bağlı olarak ekstremité kullanım zorluğu bu tedavi yönteminin komplikasyonlarından (50).

1970’ de mikrocerrahi tekniklerinin gelişmesi ile popülerize olan vaskülarize fibula grefti uygulaması segmenter kemik defektlerinde sık kullanılan bir tedavi yöntemi idi. Ancak ciddi mikrocerrahi uzmanlığı gerektirmesi, hem donör bölge sorunlarının oluşması hem de limitli kullanımının olması nedeni ile günümüzde indüklenmiş membran tekniği ve distraksiyon osteogenezi tekniklerinin de gelişmesi ile popüleritesini kaybetmiştir. Aynı zaman da yük verme konusunda fibula hipertrofisinin beklenmesi nedeni ile zamana ihtiyaç duyulması, hem de bu zaman içerisinde greftte kırık olma ihtimali nedeni ile komplikasyonları fazla olan bir tekniktir (51). Çok sık uygulanmamaktadır. Literatürde 4-17 cm arası defektlerde kullanılabilecek bir tedavi yöntemidir (52).

Hasta üzerinden değerlendirilmesi yapıldığında ve günümüz tedavi yöntemlerinden fayda görülmeyeceği düşünülen hastalarda amputasyon da bir seçenektir. Ekstremitte kurtarmaya yönelik girişimlere göre daha hızlı iyileşme ve özellikle genç ve erişkinlerde protez kullanımına adaptasyonun hızlı olduğu göz önünde bulundurulduğunda, ek morbiditeler varlığında kullanılabilecek bir tedavi metodudur. Ancak ekstremitenin kalıcı olarak kaybı ve hayat sonuna kadar protez kullanımının vermiş olduğu maliyet yüksekliği ve psikososyal problemler de bu tedavinin sorunlarındandır.

Özetle bakıldığı zaman tedavide kullanılan yöntemler hala günümüzde tam olarak çözüm sağlayamamış ve hala hem ortopedik cerrahi hem de hasta açısından bir başa çıkılması gereken bir mesele olmaktadır. Bu durum hala günümüzde yeni tedavi yöntemlerinin araştırılmasına sebebiyet vermektedir.

2.4. Kemik İyileşmesinde Kök Hücre

Günümüzde gelişen kök hücre teknolojisi ile beraber hastalıkların tedavisinde literatürde yapılan çalışmaların sayısı ve kullanımı artmıştır.

2.4.1. Kök Hücre Tanımı ve Özellikleri

Kök hücreler tanım olarak kendi kendini yenileyebilen, bir kısım yavru ve kendisine benzeyen hücre oluşturabilen ve aynı zamanda özel hücre grubuna dönüşebilme yeteneği olan hücrelere verilen genel isimdir. Kök hücreler kendi içerisinde belirli gruplara ayrılırlar; bunlar totipotent kök hücreler, pluripotent kök hücreler, multipotent kök hücreler ve unipotent kök hücreler. Kısaca totipotent hücreler plasenta da dahil olmak üzere ekstra-embriyonik ve embriyonik her hücreye dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerken, pluripotent hücreler ise embriyonik herhangi bir hücreye dönüşebilme yeteneğine sahip hücrelerdir (53).

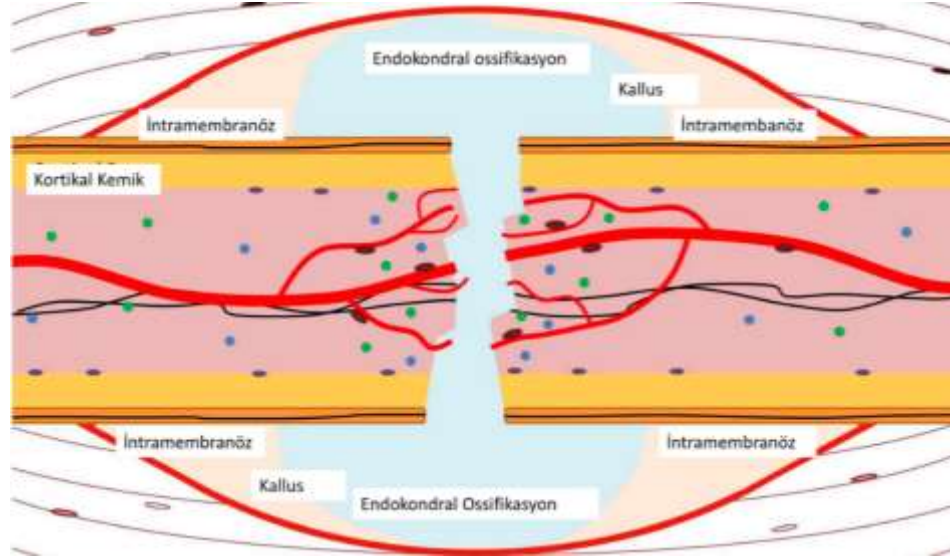
Bir kök hücre bütün hücrelere dönüşebilme yeteneğini kaybederse bu hücreye multipotent kök hücre adı verilmektedir. Bu hücreler genellikle bağlı bulunduğu embriyonik germ yaprağına ait hücre topluluğu üretebilirler. Genellikle doku veya organ spesifik olarak adlandırılırlar. Kas-iskelet sistemi içerisinde örnek verilecek

olursa en sık bilinen hematopoetik kök hücrelerdir. Bütün kan dokusu hücrelerini ve sadece bu hücreleri üretebilme yeteneğine sahip hücrelerdir. Aynı zamanda çalışma ve ortopedik cerrahi tedavi açısından önemli olan kemik iliğinde bulunan mezenkimal kök hücreler de bulunmaktadır. Mezenkimal kök hücrelerin özelliklerine ayrıntılı olarak değerlendirilecektir.

Son olarak ise unipotent kök hücreler sadece tek bir gruba dönüşebilme yeteneği olan hücrelerdir. Literatürde bazen kök hücre olarak adlandırılmayabilirler. Bu hücre grubuna örnek olarak kas dokusu içerisindeki satellit hücreler örnek verilebilir. Sadece kas hücresine dönüşebilme yeteneğine sahiptirler.

2.4.2. Mezenkimal Kök Hücre Özellikleri

Anlatıldığı üzere kırık iyileşmesi kemik kırıldığı andan itibaren başlamaktaydı. Kırık hematoma oluşumu takiben pro-inflamatuar faz ile beraber inflammatuar hücreler ve inflammatuar sitokinler hızla artmaktaydı. Aynı zaman içerisinde progenitör hücreler de endosteal ve periosteal olarak aynı zamanda kırık sonrasında kemik iliğinden göç ederek iyileşmeyi başlatmaktaydılar. İyileşme sırasında sayısız sitokinler ve kemokinler mekanik faktörlerin de yardımı ile genetik proliferasyonu arttırmakta ve osteojenik ve kondrojenik diferensiyasyonu sağlamaktaydılar. Endosteal ve periosteal bölgelerde kırık stabilizasyonu daha fazla iken intraosseoz ossifikasyon ve mobilitenin daha fazla olduğu kırık hattında ise endokondral ossifikasyon oluşmaktaydı (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. İntramembranöz ve endokondral ossifikasyon*

* Bragdon B., Bahney C. Origin of Reparative Stem Cells in Fracture Healing, Current Osteoporosis Reports August 2018, Volume 16, Issue 4, pp 490–503

Bu bilgiler ile hücre gruplarından osteojenik etki açısından dönüşüm için önemli olan bir takım yüzey belirteçleri (*Marker*) literatürde belirtilmiştir. Burada önemli olan Mezenkimal Kök Hücreler’in yüzey belirteçlerinden bahsedilmelidir. Bu belirteçler mezenkimal kök hücre dönüşümleri açısından prediktif önem arz eder (53). (Tablo 2)

Tablo 2.2. Mezenkimal kök hücre yüzey belirteçleri

İşaretleyici	Özellikleri
CD29	Travmatize Bölge Substance P işaretleyicisi
CD31	Endotelial Anjiyogenik progenitör yüzey işaretleyicisi
CD34	Hematopoetik Endotelial progenitör yüzey işaretleyicisi
CD44	Erken mezenkimal kök hücre işaretleyicisi
CD45	Genel hematopoetik kök hücre işaretleyicisi
CD73	İn vitro osteojenik kapasitesi gösterilmiş kök hücre işaretleyicisi
CD105	İn vitro osteojenik kapasitesi gösterilmiş kök hücre işaretleyicisi
CD146	Hematopoetik osteojenik özellikleri olan kök hücre işaretleyicisi
CD271	İn vitro osteojenik kapasitesi gösterilmiş kök hücre işaretleyicisi
STRO-1	İn vitro osteojenik kapasitesi gösterilmiş kök hücre işaretleyicisi
Sca-1	İn vitro osteojenik kapasitesi gösterilmiş kök hücre işaretleyicisi
C-kit	Yenilenebilir endotelial progenitör kök hücre işaretleyicisi
CXCR4	SDF-1a reseptörü

Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücrelerin daha az olarak kallus dokusuna katıldıkları gösterilmiştir (54). Ancak kallus dokusuna direkt katkısı olmasa bile inflamatuvar yanıtta ve aynı zamanda stimulator sitokinlerin salınımında özellikle TGF- β , IGF, EGF, GM-CSF gibi büyüme faktörlerinin salınımında da özellikli ve önemli rolleri olduğu belirtilmiştir (55).

Burada kemik iyileşmesinde başlık açılması gereken özellikli hücre grubu periosteal progenitor hücre grubudur. Periost en iç hücre tabakasında bulunan bu hücreler kallus dokusu oluşmasında özellikli rol oynar. Yapılan çalışmalarda literatüre sıklıkla periost zedelenmesi ile kemik dokusu iyileşmesinin gecikmesi arasında bağlantılar gösterilmiştir (56). Literatürde bu hücre topluluğunun en ciddi osteoprogenitor hücre topluluğu olduğu aynı zamanda mezenkimal kök hücre yüzey belirteçlerinden de CD73, CD90 ve CD105 taşıdıkları belirtilmiştir (57, 58).

Modern genetik bilimi sayesinde daha fazla kök hücre çalışmaları yapılmaya başlanmıştır. Günümüz datasına bakıldığında zaman kemik iyileşmesinde birden fazla progenitor hücre bulunurken, bu hücre topluluklarının fonksiyonel rolleri de hala araştırılmaya devam etmektedir. Literatürde yüzey belirteç sayısı gittikçe artarken, bu grupların bazılarının fonksiyonları hala tam olarak bilinmemektedir. Ancak daha önemli olan ve akıllardan çıkarılmaması gereken nokta, hala bu hücre topluluklarının beraber olarak etkileşimlerinin nasıl olduğunu ve birbirlerini nasıl tam olarak etkileyeceklerinin bilinmemesidir (53).

2.5. Biyoçatı Tanımı ve Özellikleri

Anlatıldığı üzere kemik defektlerinde optimal tedavi günümüzde hala otolog kemik greftleri idi. Ancak yeterli düzeyde greft alınamaması, cerrahi sürenin uzaması, ek cerrahi girişimlere ihtiyaç duyulması ve ko-morbiditelerin artması, maliyetin artması gibi sebepler nedeniyle ortopedik cerrahlar tarafından hala yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktaydı (59). Araştırmacılar tarafından hastanın kendi kansellöz kemiği yerine geçebilecek, üretilebilecek ve saklanabilecek çeşitli biyoçatı konseptleri üzerinde çalışmalar yapmaktadırlar.

Biyoçatı tanımına bakıldığı zaman literatürde, kemik büyümesi ve doku gelişmesi açısından spesifik çevre ve mimari yaratan geçici kalıplardır (60). Uygun bir biyoçatı ise doğal dokuyu taklit edebilen bir ekstraselüler matriksi olan, hücre tutunması, proliferasyonu ve diferensiyasyonuna izin veren yardımcı bir biyomateryaldir.

Kemik dokusuna bakıldığında osteoprogenitör hücreler, büyüme faktörleri ve vaskülarizasyon bu dokunun mikroçevresini oluşturmaktaydı. Burada iyileşmede temel fabrikasyon ürünü biyoçatıdır. Burada iyileşmede biyoçatının temel şartı hücre yapışmasını, proliferasyonunu ve diferensiyasyonunu sağlayabilmektir. Bu şartları sağlayabilecek bir biyoçatı temel özelliklere sahip olabilmelidir. Bu özellikler; biyo uyum, porozite, mikro ve nano yapı, degradasyon hızı, mekanik gücü, büyüme faktörlerini çekebilmesi olarak sıralanabilir (61). Biyo uyum, kullanılan biyoçatının lokal veya sistemik olarak bir yanıt uyandırmaması olarak açıklanabilir. Biyoçatı mikro ve nano yapısı hücre tutunması ve proliferasyonunu etkilediği gibi aynı zamanda vaskülarizasyon ve dolayısı ile beslenme ve oksijenasyonu etkilemektedir. Aynı zamanda bu yapıdaki porozite, yani por oluşumları da osteogeneziste yani osteoprogenitör hücrelerin cevaplarında önemlidir (62). Büyük porlar ile beraber hücre migrasyonu ve yayılımı artarken, küçük porlarda kemik içe büyümesi olmaktadır. Aynı zamanda bu porların birbiri ile bağlantılı olması büyüyecek doku ve vaskülarizasyon açısından önem arz eder. Ama por sayısı dengede tutulmalıdır çünkü sayı arttıkça biyoçatının mekanik gücü azalmaktadır ve kemik defektlerinde mekanik güç te önemlidir. Kullanılacak optimal biyoçatının degradasyon hızı da düzenli olmalıdır çünkü degradasyon olmadan önce yeterli mekanik gücü sağlarken eş zamanlı olarak yeni gelişecek kemik dokusuna da yer bırakmalıdır (63).

Literatürde varolan biyoçatılara bakıldığı zaman çeşitli materyaller denenmiştir. Bunlar gruplandırıldığı zaman bu gruplar doğal ve sentetik polimerler, seramik bazlı biyoçatılar, metalik biyoçatılar ve kompozit biyoçatılar olarak gruplandırılabilir (64) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3. Biyoçatı materyalleri ve alt başlıkları

Doğal Polimer	Sentetik Polimer	Seramik	Metalik	Kompozit
Kollajen	Poliester (Polilaktik asit, Polikaprolakton)	Biyocam	Titanyum	Polimer/Seramik
Kitosan	Kopolimer (PLGA)	Kalsiyum Fosfat	Paslanmaz Çelik	Metal/Seramik
İpek		Kömür		Metal /Polimer
Aljinat				
Hyalüronik asit				
Peptid Hidrojel				

Yaklaşık 100 yıldır otolog kemik grefti yerine kullanılabilecek materyaller aranmaktadır. Aynı zamanda 20 yıldan fazla olmak üzere doku mühendisliği ve genetik mühendislikler ile biyoçatı üretimi araştırılmaktadır. Literatürde tariflenmiş birçok biyoçatı ve biyoçatı malzemesi bulunmaktadır. Bunlar arasında önceden beri kullanılan metal ve seramik biyoçatıların degradasyon hızının az olması veya olmaması ve çıkarılması için ek cerrahi girişim gerektirmesi nedeni kemik doku mühendisliğinden ziyade artroplasti teknolojisine üzerinde çalışmasının artmasına neden olmuştur (65-67). Biyoseramik kompozitlerde ise literatürde en fazla çalışması yapılan biyoçatı türlerindendir. Hidroksiapatit kristaller, dikalsiyum fosfat ve trikalsiyum fosfat en fazla denenilen ve başarılı olan türlerdendir. Özellikle hidroksiapatit kristaller kontrollü degradasyon ve sitotoksikite azlığı nedeni ile ortopedik cerrahide kullanılan biyoçatı türüdür. Osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri mevcuttur. Diğer bir tür olan trikalsiyum fosfat, özellikle kollajen kombinasyonu ile in vivo çalışmalarda başarılı sonuçları olduğu gösterilmiştir (68). Ancak kırılmaya yatkınlık ve degradasyon hızının az olması ve bu hızın tahmin edilememesi nedeni ile özellikle biyoçatı olarak kullanımı yaygın değildir.

Bir diğer önemli ve günümüzde popülerize olmuş biyoçatı türü ise polimerlerdir. Esneklik, biyoyum ve biyodegradasyon temel özelliklerindendir. Doğal polimerlerden örnekler arasında kollajen bazlı biyoçatılar, ipek, aljinat, kitosan ve hyalüronik asit denenmiş ve sonuçlar kıyaslanmıştır. Aynı zamanda benzer mekanizma ile sentetik polimerler üretilmeye çalışılmış ve bu üretim sırasında bir

biyoçatının önemli özellikleri sentetik polimerler üzerinde ayarlanmaya çalışılmıştır. Porların çapları, porozite derecesi, degradasyon hızı ve mekanik gücü ayarlanarak uygun biyoçatı üretilmeye çalışılmıştır. Bunlar arasında en sık denenen sentetik polimerlerde polilaktik asit, polikaprolakton, poliglikolik asit ve polietilen glikol bulunmaktadır (69). Ancak genellikle bu sentetik polimerlerin hidrofobik yapısı ve hücre adezyonuna izin vermeyişi, biyoaktivite açısından ikincil modifikasyonlara ihtiyaç doğurmuştur (70). Aynı zamanda polimer biyoçatıların mekanik özelliklerinin de yeterli olmayışının düzenlenmesi için yapılan araştırmalarda, kombine polimer-biyoseramik ve polimer-biyoaktif cam kullanımı araştırılmaya başlanmıştır. Bu sayede hem biyoçatı adeziv yüzünde biyokatif materyal kullanılabilirken eş zamanlı olarak mekanik özelliklerinin de artırılması sağlanmıştır. Kollajen bazlı kompozit biyoçatılara baktığımız zaman, özellikle hidroksiapatit kristalleri ile beraber kullanılan biyoçatılara literatürde daha sık rastlanmaktadır. İzole hidroksiapatit kristallere göre degradasyonu daha iyi ve eş zamanlı olarak hücre vitalitesinin arttığı ve kemikleşmenin sağlandığı gösterilmiştir (71). Ancak mekanik fiksasyon gerekmesine vurgu yapılmıştır. Aynı zamanda bir başka çalışmada hidroksiapatit kristallerinin artırılması ile beraber anjiogenezis ve matriks depolanmasının arttığı, osteojenik aktivitenin arttığı ve mineralizasyonun arttığı gösterilmiştir (72).

Literatürde varolan tanımlanmış biyoçatılara bakıldığında optimal bir sonuç elde edilemediği görülmektedir. Çoğu biyomateryal in vitro olarak test edilmiş ve gerçek ekstraselüler sıvılarda, inflamasyon ve mekanik stimülasyon varlığında denenmemiştir. Dolayısı ile optimal bir biyoçatı varlığı hala net değildir ve araştırılmaya devam edilmektedir (59).

2.5.1. Deselülarize Omentum'un Biyoçatı Olarak Uygulanması

Omentum özellikle zengin vasküler yapısı, hipoksik ve iskemik dokularda anjiyojenik aktivitesinin olması, lokal yapılara adezyon kabiliyeti ve büyüme faktörlerinden zengin olması sebebi ile özellikle rekonstrüktif cerrahide sık kullanılabilen bir dokudur (73, 74). Aynı zamanda literatürde serbest flepler olarak veya pediküllü olarak bir çok amaç doğrultusunda kullanılabilmektedirler. Kardiyovasküler cerrahide, genel cerrahide özellikle bir çok dokunun üzerini

örtmekte, yara enfeksiyonlarını kapatmakta ve skalp yaralanmalarında yara yeri rekonstrüksiyonunda kullanılabilecek bir dokudur (75). Bu adezyon ve ekstraselüler matriks kompozisyonundan ötürü yumuşak doku augmentasyonunda kullanılabileceği in vitro olarak gösterilebilmiştir (76).

Bu bilgiler omentumun bir biyoçatı olarak kullanılabilmesi için cesaret yaratmıştır. Ancak öncelikli olarak deselülarizasyonun iyi olarak bilinmesi gereklidir. Deselülarizasyon doğal yapıyı ve ekstraselüler matriks kompozisyonunu korurken eş zamanlı olarak bütün rezidüel hücresel fragmanların temizlenmesi olarak tarif edilebilir. Böylelikle korunmuş olan ekstraselüler matriks hücre kemotaksisini, mitozunu ve diferensiyasyonunu sağlayabilir (77). Deselülarizasyon protokolü fiziksel kimyasal ve biyolojik ajanlar ile beraber yapılabilir. Özellikle omentum bazı biyoçatının deselülarizasyon süreci literatürde standardize edilerek tariflenmiştir (78).

Benzer şekilde biyolojik biyoçatı olarak cilt, fasya lata ve kardiyovasküler cerrahide perikardiyum olarak denenmiş ve başarılı sonuçları alınarak aynı şekilde piyasada yer edinmiş ve kullanıma girmiştir. Yine plasenta da biyolojik biyoçatı olarak araştırılmaya devam edilmektedir.

Literatüre bakıldığı zaman ortopedik cerrahi içerisinde deselülarize omentumun kullanımı yoktur, daha önce denenmemiştir.

2.6. Trombositten Zengin Plazma (Platelet Rich Plasma, PRP)

Yaklaşık 20 yıldır otolog trombosit konsantrasyonları ortopedi, spor hekimliği, plastik cerrahi gibi tıbbın birçok bölümünde kullanılmaktadır ve bu konsantrasyonlar arasında en sık kullanılan konsantrasyon ise Trombositten Zengin Plazma (PRP) dır (79). Temel anlamı esas olarak tam kanın trombositten suprafizyolojik konsantrasyonda otolog derivasyonudur (80). Temelde ortopedik tedavide kullanım amacı sert ve yumuşak doku iyileşmesinde aktive trombositlerden salınan büyüme faktörleri ve biyoaktif molekülleri kullanabilmektir. İçerisindeki büyüme faktörlerine bakıldığı zaman, FGF, osteoblast proliferasyonu ve diferensiyasyonu, IGF-1, Alkalın Fosfataz (ALP), osteopontin ve osteokalsin gibi protein ve enzimlerin sekresyonunu arttırmada, PDGF ve TGF- β 1 ise mitojenik aktiviteyi ve kemik rejenerasyonunu arttırmaktadır. PDGF, preosteoblast aktivitesi ve fibroblast aktivitesini arttıran en

önemli faktörlerdendir. Aynı zamanda vaskülarizasyonu arttırma açısından aktive trombositlerden VEGF salınımı da olmaktadır (81).

Normalde kan trombosit sayımı 150.000 ile 350.000 arasında değişmektedir. Burada Trombositten Zengin Plazma, yani PRP sayılabilmesi için normal konsantrasyondan 3 ila 5 kat daha fazla olması gerekmektedir (82). PRP hazırlanmasında etkili olduğu bilinen birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler arasında kanın antikoagülasyonunu sağlayan maddeler ile beraber santrifüj protokolü ve hızı, toplam PRP volümü, trombosit sayımı, içerdiği eritrosit ve lökosit sayısı da önemlidir (83, 84). Hazırlanmadaki ve uygulanacak volümdeki değişiklikler ise biyoaktivitesini ve yararlılığını değiştirebilmektedir. Literatüre bakıldığında özellikle çift santrifüj ile beraber trombosit aktivasyonunun ve konsantrasyonunun daha iyi olduğunu gösterilmiştir (85).

PRP ile ilgili yapılan çalışmaların büyük çoğunluğu in vitro çalışmalardır. Bu çalışmalarda etkinliği iyi olarak bulunmuştur. Özellikle kemik iliği kök hücreleri üzerinde yapılan çalışmalarda osteojenik diferansiyasyonunda artmış proliferasyon gösterilmiştir (86). Aynı zamanda in vitro diferansiye olmayan kök hücre ile beraber kullanımında yine hücre proliferasyonu ve matürasyonunda artış bulunmuştur (87, 88). Hayvan deneylerinde ise PRP tek başına kullanımı ve otolog kemik greftleri, allogreftler ve greft yerine kullanılabilecek diğer materyaller ile beraber denemiş ve yine artmış kemik iyileşmesi sonuçları bulunmuştur (89).

Sonuç olarak her ne kadar günümüzde yapılan çalışmalarda PRP sonuçlarının etkili olduğu bulunmuş olsa da standardize bir uygulama hacminin olmayışı, hazırlanma biçiminde çeşitli antikoagülanların kullanılabilirliği ve santrifüj uygulamalarının farklı olması ile yine ileri dönem araştırılması gerekmektedir (89).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Etik Kurulunun 25.07.2017 tarihli ve 2017/49-08 kararı uyarınca onay alınarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada 32 adet 300 gr üzeri erkek Wistar-Albino sıçan (*Rat*) kullanılmıştır. Denekler işlem öncesi ve sonrası dönemde Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda takip edilmiştir. Cerrahi girişimler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

Deneyin başlangıç kısmında kullanılan deselülarize omentum üretimi DOKU firması tarafınca ve kullanılan Mezenkimal Kök Hücreler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Kök Hücre Bölümü'nce üretilmiştir.

Deneyde kullanılan PRP Glo PRP firmasının kiti ile hazırlanmıştır.

Deneyin sonlandırılmasını takiben hayvanların önkollarının direkt radyografilerinin çekilmesi ve incelenmesi Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda, histopatolojik incelemeleri Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Önkol biyomekanik gücü ise TOBB Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir.

Denekler 5 gruba ayrılmışlardır (Tablo 3.1);

Birinci grupta, 6 adet sıçana bilateral izole Radius kritik kemik defekti yaratılmıştır. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defekt oluşturulduktan sonra 6 hafta iyileşme süresi beklenmiş, sonrasında ötenaziye takiben bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda Radius ve ulna kemikleri diseksiyonu sağlanmıştır. Bu izole edilen kemikler gruplandırılarak histopatolojik ve biyomekanik çalışmalara tabi tutulmuştur.

İkinci grupta, 6 adet sıçana bilateral izole Radius kritik kemik defekti yaratılmıştır. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defekt oluşturulduktan sonra hazırlanan insan kaynaklı deselülarize omentum yerleştirilmiş ve 6 hafta iyileşme süresi beklenmiş, sonrasında ötenaziye takiben bilateral üst ekstremitte amputasyonu

yapılarak önkolda Radius ve ulna kemikleri diseksiyonu sağlanmıştır. Bu izole edilen kemikler gruplandırılarak histopatolojik ve biyomekanik çalışmalara tabi tutulmuştur.

Üçüncü grupta, 6 adet sıçana bilateral izole Radius kritik kemik defekti yaratılmıştır. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defekt oluşturulduktan sonra insan kaynaklı deselülarize omentum ile beraber hazırlanan kök hücreler beraber uygulanmış ve 6 hafta iyileşme süresi beklenmiş, sonrasında ötenaziyi takiben bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda Radius ve ulna kemikleri diseksiyonu sağlanmıştır. Bu izole edilen kemikler gruplandırılarak histopatolojik ve biyomekanik çalışmalara tabi tutulmuştur.

Dördüncü grupta, 6 adet sıçana bilateral izole Radius kritik kemik defekti yaratılmıştır. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defekt oluşturulduktan sonra insan kaynaklı deselülarize omentum ile beraber hazırlanan PRP beraber uygulanmış ve 6 hafta iyileşme süresi beklenmiş, sonrasında ötenaziyi takiben bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda Radius ve ulna kemikleri diseksiyonu sağlanmıştır. Bu izole edilen kemikler gruplandırılarak histopatolojik ve biyomekanik çalışmalara tabi tutulmuştur.

Beşinci grupta, 6 adet sıçana bilateral izole Radius kritik kemik defekti yaratılmıştır. Cerrahi teknik aşağıda özetlenmiştir. Defekt oluşturulduktan sonra insan kaynaklı deselülarize omentum ile beraber PRP ve kök hücreler beraber uygulanmış ve 6 hafta iyileşme süresi beklenmiş, sonrasında ötenaziyi takiben bilateral üst ekstremitte amputasyonu yapılarak önkolda Radius ve ulna kemikleri diseksiyonu sağlanmıştır. Bu izole edilen kemikler gruplandırılarak histopatolojik ve biyomekanik çalışmalara tabi tutulmuştur.

Tablo 3.1. Grupların belirlenmesi

	1. Grup	2. Grup	3. Grup	4. Grup	5. Grup
Uygulanan İşlem	-	Deselülarize Omentum	Deselülarize omentum + Mezenkimal Kök hücre	Deselülarize omentum + PRP	Deselülarize omentum + PRP + Mezenkimal kök hücre
Sayı	6	6	6	6	6

3.1. Kök Hücre Hazırlanması için Teknik

3.1.1. Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu ve Kültürde Çoğaltılması

Çalışma kapsamında 2016/03 toplantı ve 01 Karar No'lu etik kurul kararı ile araştırmalarda kullanılmak üzere sağlıklı kemik iliği nakli donörlerden elde edilen ve arşivimiz kriyostoklarında izole edilerek mononükleer hücreler kullanıldı. Sekiz yaşında, kadın, sağlıklı kemik iliği vericisinden elde edilen -196 °C de saklanan mononükleer hücreler 37 °C deki su içerisinde çözülerek T-75 doku kültür kabına 20×10^6 hücre olacak şekilde ekildi ve 10 ml büyüme besi yeri (DMEM-LG, %10 fetal bovine serum, %1 antibiyotik (Penisilin-Streptomisin) içerisinde 37 °C, %5 CO₂'li inkübatöre yerleştirildi. Hücreler 4. pasaja gelene kadar hücre kültürüne devam edilerek adezyon gösteren fibroblastoid hücreler elde edildi. Mononükleer hücrelerin izolasyonunu takiben hücreler 25 cm² flasklarda 4×10^5 hücre/cm² olacak şekilde %10 FBS (*Gibco*, ABD), %1 Penisillin-streptomisin ve %1 L-Glutamin içeren DMEM-LG (*Biological Industries*, İsrail) içeren 5 ml medyum ile 37 °C, %5 CO₂ ve nemli ortamında kültüre konuldu. Kültürler 24–48 saat sonrasında taze medyumla değiştirilerek flask tabanına yapışmayan hücreler uzaklaştırıldı. Her gün düzenli olarak inverted mikroskopla kontrol edilerek 3–4 günde bir kültür ortamı değiştirilerek kültüre devam edildi (Şekil 3.1). Hücreler 7–12 gün içerisinde flasksın yüzeyini % 70–80 kapladığı zaman % 0.25 oranında hazırlanan Tripsin-EDTA ile yüzeyden kaldırıldı. Sonraki pasajlarda 4×10^3 hücre/cm² olacak şekilde 75 cm² lik flasklara ekim yapılarak hücreler geliştirildi. Bu şekilde 3. pasaja kadar çoğalma işlemi gerçekleştirildi.

3.1.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotiplendirilmesi (Akım Sitometri Çalışması)

İnsan kemik iliğinden izole edilen hücreler akım sitometri cihazında antikorlar ile tanımlandı. Antikor paneli olarak; CD29 (*e-Biosciences*, ABD), CD34 (*BD Biosciences*, ABD), CD44 (*e-Biosciences*, ABD), CD45 (*BD Biosciences*, ABD), CD73 (*BD Biosciences*, ABD), CD90 (*BD Biosciences*, ABD), CD105 (*e-Biosciences*, ABD), CD146 (*BD Biosciences*, ABD) kullanılarak Navios (*Beckman Coulter*, ABD) akım sitometri cihazı ile analizler yapıldı.

3.1.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Potansiyellerinin Değerlendirmesi

Mezenkimal kök hücrenin adipojenik ve osteojenik hücre serilerine farklılaşma potansiyelini değerlendirmek için hücre kültür ortamına gerekli olan uyarılar eklendi.

Farklılaşmaya yönlendirilmiş olan hücreler morfolojik olarak ve histokimyasal boyamalarla değerlendirildi.

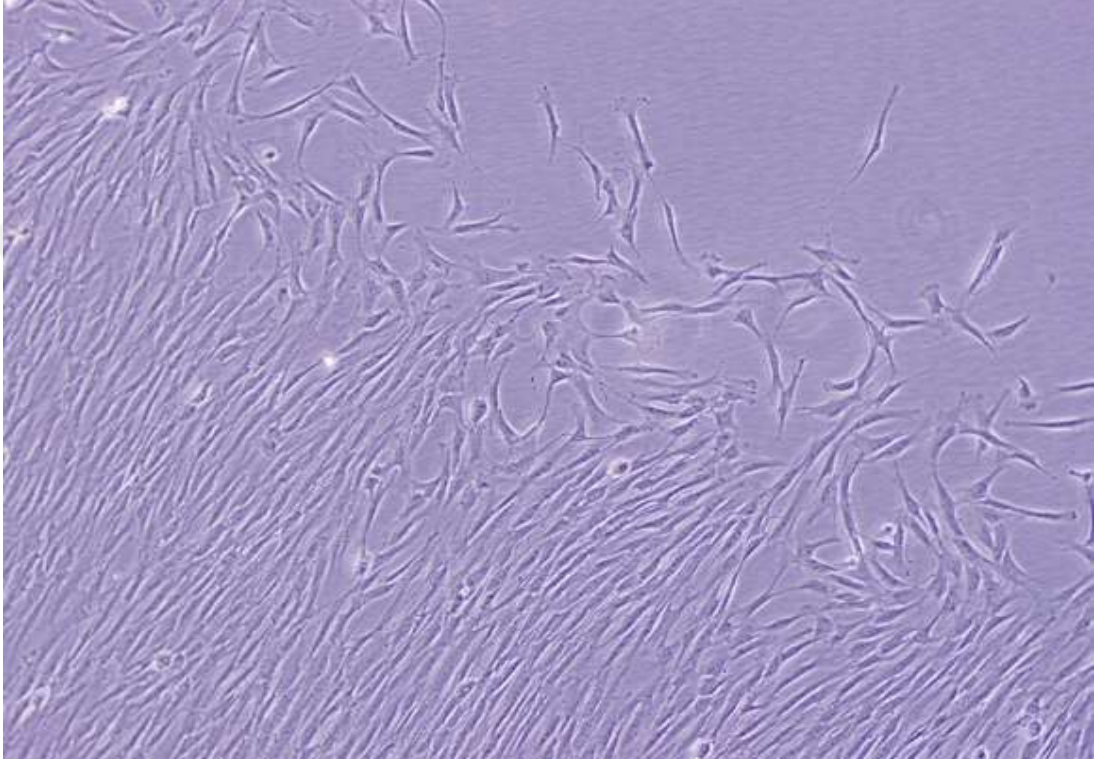
Osteoblast Hücre Farklılaşması: Tripsinize edilmiş olan mezenkimal kök hücreler 9,6 cm² lik propilen petri kaplarına 2x10³ hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler, petri kapları içini %60–70 oranında kapladığı zaman, DMEM-LG (*Biological Industries*, İsrail) içerisine %10 FBS (*Gibco*, ABD), 100 nM *dexamethasone* (*Sigma*, ABD), 10 µM *beta-glycerophosphate* (*Sigma*, ABD) ve 0,2 µM *ascorbic acid* (*Sigma*, ABD) ilave edilerek hazırlanmış olan osteoblast farklılaşma medyumunu petrilere hücrelere 2'şer ml ilave edildi ve 30 gün süresince 3-4 gün aralıklarla kültür ortamı değiştirilerek takip edildi. Süre bitiminde farklılaşması beklenen hücreler Alizarin Kırmızısı S (*Sigma*, ABD) boyası ile boyanarak farklılaşma potansiyeli analiz edildi (Şekil 3.2).

Adiposit Hücre Farklılaşması: Tripsinize edilmiş olan mezenkimal kök hücreler 9,6 cm²'lik propilen petri kaplarına 2x10³ hücre/cm² olacak şekilde ekim yapıldı. Hücreler, petri kapları içini % 90–100 oranında kapladığı zaman, DMEM-LG (*Biological Industries*, İsrail) içerisine %10 FBS (*Gibco*, ABD), 1µM *dexamethasone* (*Sigma*, ABD), 60 µM *indomethacine* (*Sigma*, ABD), 500 µM IBMX (*Sigma*, ABD) ve 5 µg/ml insulin (*Sigma*, ABD) ile hazırlanmış olan farklılaşma ortamı konularak farklılaşma yapıldı. Otuz gün süresince 3–4 gün aralıklarla medyumunu değiştirilerek takip edildi. Bu süre sonunda farklılaşan hücreler Oil Red O (*Sigma*, ABD) boyası ile boyanarak tespit edildi (Şekil 3.3).

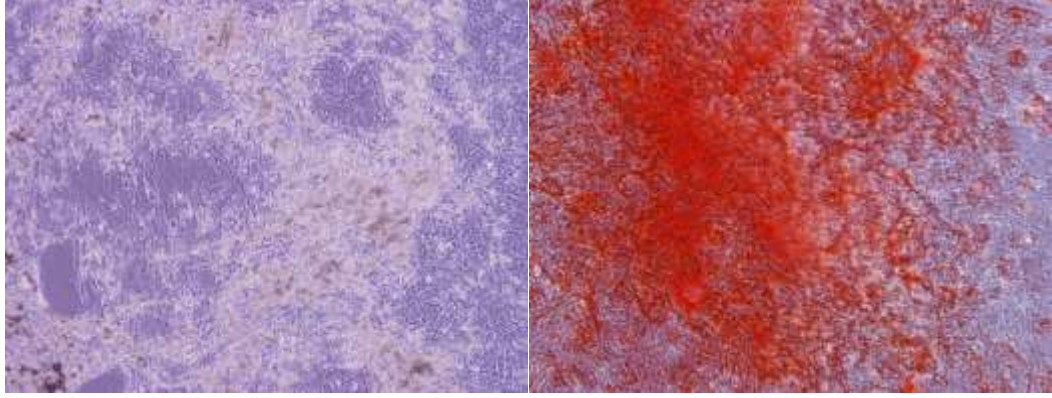
MKH kültürlerinin Fe ile işaretlenmesi: Flask içerisindeki hücreler konfluent hale getirildikten sonra 50 ug/ ml endorem (Endorem: *ferumoxide* ile işaretli manyetik işaretli) ve 0,375 ug/ml *poly-L-Lysine* ile 24 saat inkübe edildi. Daha sonra hücreler PBS ile 3 kez yıkanacak ve %0,25 Tripsin/EDTA ile yapışan hücreler

kaldırıldı ve tripan mavisi ile canlılık/hücre sayısı bakıldı. Her bir sıçan için 1×10^6 hücre olacak şekilde PBS içerisinde uygulama için hazırlandı.

Mezenkimal kök hücre morfolojisi ve çoğalma özellikleri: Mononükleer hücreler 25 cm^2 'lik flasklarda (T25) kültür ortamına konulduktan 48 saat sonra adezyon gösteren iğsi yapıda hücreler gözlemlendi.



Şekil 3.1. Kültür ortamında çoğalan hücrelerin inverted mikroskoptaki görünümü

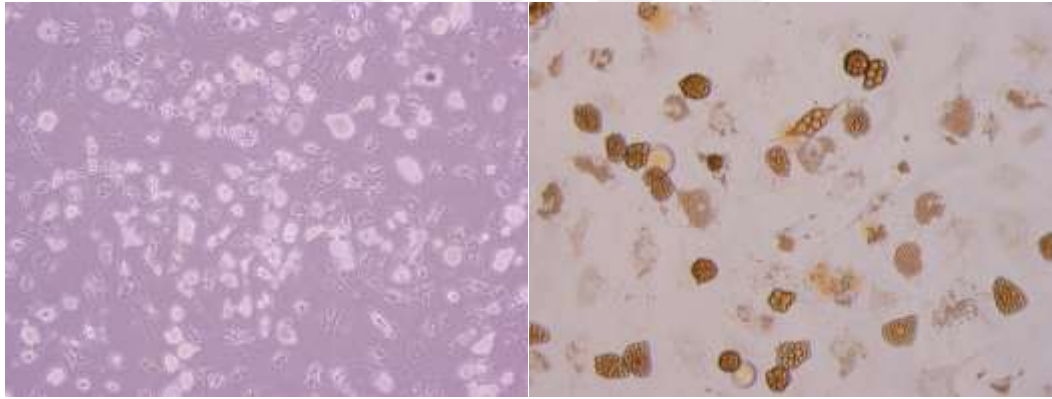


A

B

Şekil 3.2. Osteojenik vasat içerisinde uyarılan kök hücrelerin ilerleyen günler içerisinde çok sayıda ve amorf depolanmalar göstermesi ve Alzarin Red boyası ile kalsiyum depolanmasının gösterilmesi

(A:Alizari Red boyası ile boyanmış osteojenik hücreler 10x, B: Alizari Red boyası ile boyanmamış osteojenik hücreler, 10x)



A

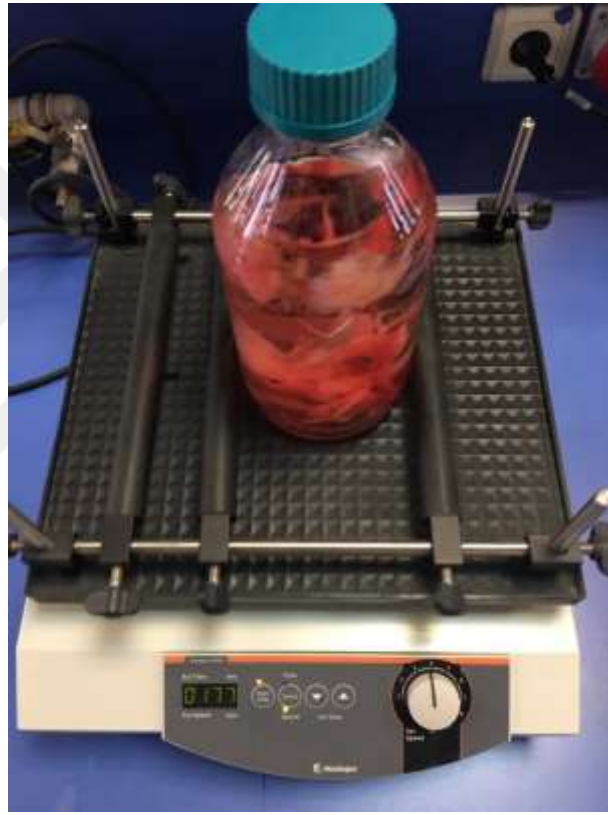
B

Şekil 3.3. Adipojenik vasat içerisinde uyarılan kök hücrelerin ilerleyen günler içerisinde yuvarlak yağ damlacığı oluşturması ve Oil Red O boyası ile boyanmasının görüntüsü

(A: Oil Red O boyası ile boyanmış olan adipojenik hücreler 10x, B: Oil Red O boyası ile boyanmamış olan adipojenik hücreler, 10x)

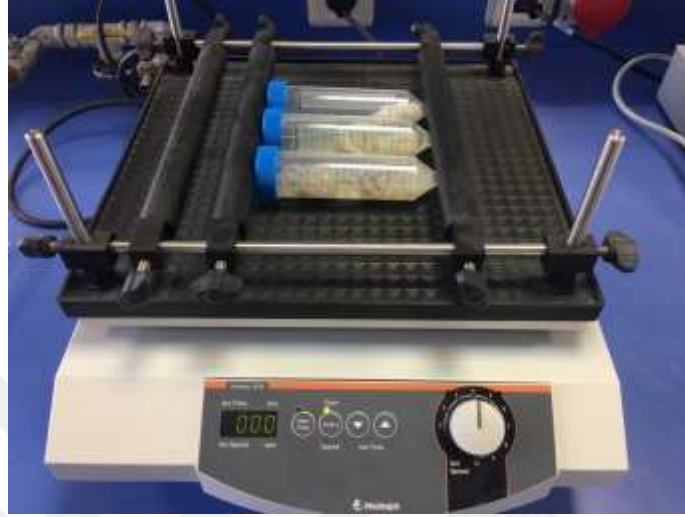
3.2. Omentum Deselülerizasyonu için Teknik

Daha önce etik kurul onayı almış olan çalışmalarda kullanılmak üzere ayrılan ve fazla olan insan kaynaklı omentum kullanıldı. -80 °C'den alınan doku parçaları ilk olarak derin dondurucuya (-20 °C) daha sonra da buzdolabına (+4 °C) konularak dereceli olarak çözündürüldü. Daha sonra çözündürülen dokular 1 lt'lik şişe içerisinde hazırlanan PBS içersine alınarak 24 saat boyunca çalkalamalı karıştırıcıda çalkalandı. (24 saat boyunca PBS 3 kez değiştirilmiştir) (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Dokuların PBS içerisinde 24 saat boyunca yıkanması

Bu aşamadan sonra dokular %1 (w/v)'lük sodyum dodesil sülfat (SDS) içerisinde alınarak sabit çalkalama hızında 24 saat boyunca çalkalamaya bırakıldı. (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Dokuların %1 (w/v)'lik SDS içerisinde 24 saat boyunca çalkalanması

Daha sonra SDS çözeltisinden çıkarılan dokular PBS çözeltisi ile en az 3 kez yıkanarak dokuların içerisinde kalan fazla SDS ortamdan uzaklaştırıldı. Bundan sonra doku içerisindeki lipidlerin uzaklaştırılması için PBS içerisindeki dokular ayrı tüplere alınarak 48 saat boyunca izopropanol içerisinde bekletildi. (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Dokuların izopropanol içerisinde bekletilmesi

Dokular izopropanol çözeltisinden alındıktan sonra en az 3 kez PBS ile yıkandı ve son aşamaya geçildi. Son aşamada dokularda kalan DNA ve RNA'lar uzaklaştırıldı. Bunun için dokular tek bir tüpe alınarak DNase ve RNase enzim karışımında 37°C 'de 1 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 3.7).



Şekil 3.7. Dokulardan DNA ve RNA'ların uzaklaştırılması

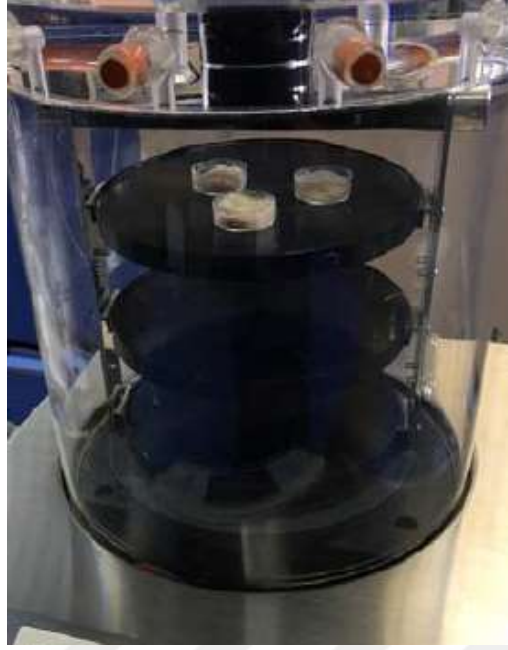
Son olarak dokular PBS içerisinde yıkanarak petri kaplarına döküldü ve 48 saat boyunca liyofilize edildi (Şekil 3.8, 3.9 ve 3.10).



Şekil 3.8. Dokuların PBS ile yıkanması



Şekil 3.9. Deselüler yapıların petri kaplarına dökülmesi



Şekil 3.10. Deselüler yapıların liyofilize edilmesi

3.3. Trombositten Zengin Plazma (PRP) Hazırlanması için Teknik

Öncelikli olarak Glo PRP kiti (Şekil 3.11) kullanılarak PRP hazırlanmıştır. İki adet sıçan PRP hazırlanması için intrakardiyak kan alınarak ötenazi uygulandı. Bu kitte var olan sodyum sitrat antikoagülan olarak (Şekil 3.12) ayrıca kitin içerisine 1 ml olarak alındı ve ötenazi uygulanan sıçanlardan alınan 9 ml kan ile birleştirilerek 10 ml ye tamamlandı (Şekil 3.13 ve Şekil 3.14).



Şekil 3.11. Glo PRP kiti görünümü



Şekil 3.12. Kullanılan Sodyum Sitrat'ın dışarıdan görüntüsü



Şekil 3.13. Ötenazi uygulanan sıçandan intrakardiyak olarak kan alınması



Şekil 3.14. Kit içerisinde 10 ml ye tamamlanmış kanın görüntüsü ve Eritrosit Kollektörü'nün takılmış hali

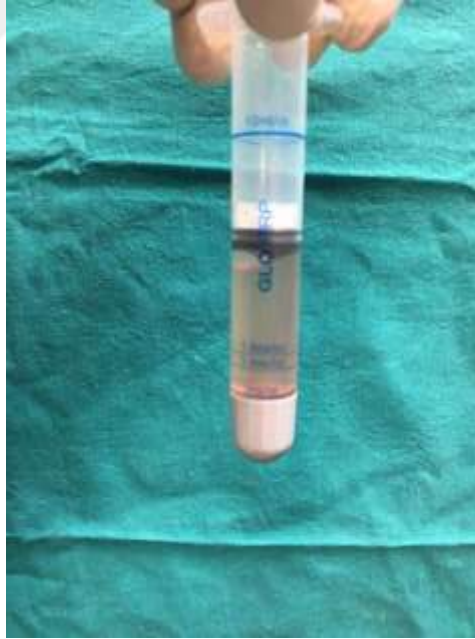
Daha sonrasında tüp santrifüj aletine konularak 1200 RPM de 5 dakika boyunca santrifüj edildi. (Şekil 3.15) Eritrosit kollektörü santrifüj sonrasında 1 ml çekilerek ayrıldı. (Şekil 3.16) 2. Santrifüj 1200 RPM 10 dakika boyunca uygulanarak son kalan kısım plazma kısmı ayrıştırıldı ve kullanılacak PRP elde edilmiş oldu (Şekil 3.17).



Şekil 3.15. Santrifüj aletinin ayarlanması



Şekil 3.16. Santrifüj edildikten sonra PRP kiti ve eritrosit kollektöründe eritrositlerin toplanması



Şekil 3.17. 2. Santrifüj sonrası ve kullanılacak PRP elde edilmesi

PRP trombosit sayım ölçümü Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalında yapıldı. Normal sıçan trombosit sayımının 650.000 hücre/ ml olduğu, PRP eldesinde bu sayım yapıldığında 2.100.000 hücre/ ml olduğu bulundu.

3.4. Sıçanda Kemik Defekti Yaratmak için Cerrahi Teknik

0.25 ml/kg Ketamin %10 ve 3 mg/kg Ksilazin kombinasyonunun intraperitoneal enjeksiyonu ile anestezi uygulandı. Sıçan supin pozisyona alındı. (Şekil 3.18) Bilateral önkol volar bölge traşlandı. Volar bölge Radius kemiği üzerinden yapılan 1 cm'lik insizyonu takiben cilt ve cilt altı geçilerek volar bölge kas gruplarına ulaşıldı. (Şekil 3.19) Kas diseksiyonunu takiben Radius kemiğinin cisim kısmına ulaşıldı. (Şekil 3.20) 1 adet Kerrison Rongeur 5 mm ile Radius kemik cisminde 1 cm'lik tam kat kemik defekti yaratıldı. (Şekil 3.21 ve Şekil 3.22) Kontrol grubu için ek başka işlem yapılmayarak osteotomi hattı %0.9 luk salin çözeltisi ile irriga edilerek katlar anatomik olarak kapatıldı.

İkinci grup olan omentum grubunda, kemik defektine uygun olarak deselülerize omentum biyoçatısı küp şeklinde kesilerek (Şekil 3.23) osteotomi hattına yerleştirildi (Şekil 3.24). Daha sonra katlar anatomik olarak kapatıldı.

Üçüncü grup olan deselülerize omentum ve PRP kombinasyonunun uygulandığı grupta, omentum dışarıdan PRP 0.1 ml ile uygulanarak ıslatıldı ve osteotomize hatta yerleştirildi (Şekil 3.25). Daha sonra katlar anatomik olarak kapatıldı.

Dördüncü grup olan deselülerize omentum ve kök hücre kombinasyonunun uygulandığı grupta, omentum dışarıdan 0.5 mm³ lük kök hücre içeren solüsyon uygulanılarak ıslatıldı (Şekil 3.26) ve osteotomize hatta yerleştirildi. Daha sonra katlar anatomik olarak kapatıldı.

Beşinci grup olan deselülerize omentum, PRP ve kök hücre kombinasyonunun uygulandığı grupta, omentum dışarıdan 0.5 mm³ lük kök hücre ve PRP 0.1 ml ile uygulanarak ıslatıldı ve osteotomize hatta yerleştirildi (Şekil 3.27). Daha sonra katlar anatomik olarak kapatıldı.



Şekil 3.18. Sıçan supin pozisyonu



Şekil 3.19. Sıçan önkol volar insizyonu ve sırasında önkol kas gruplarının görünümü



Şekil 3.20. Sıçan önkol kas diseksiyonu sonrasında Radius kemik cismine ulaşım



Şekil 3.21. Radius cisminden Kerrison Rongeur yardımı ile defekt oluşturulması



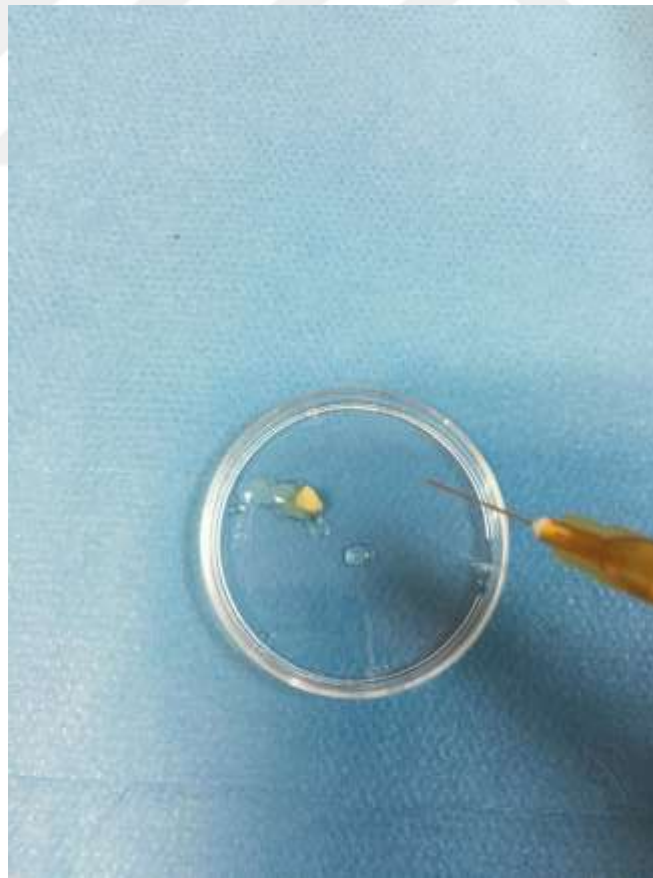
Şekil 3.22. Radius cisminde defekt görünümü



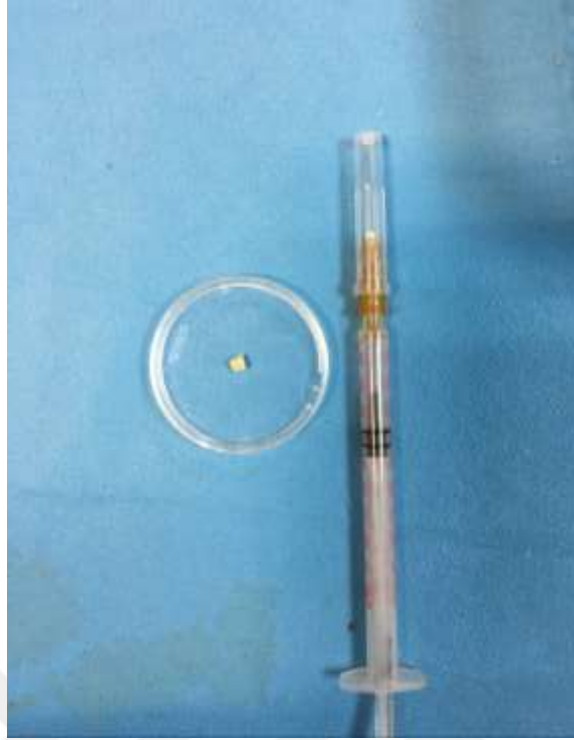
Şekil 3.23. Omentum biyoçatının küp şeklide kesilerek hazırlanması



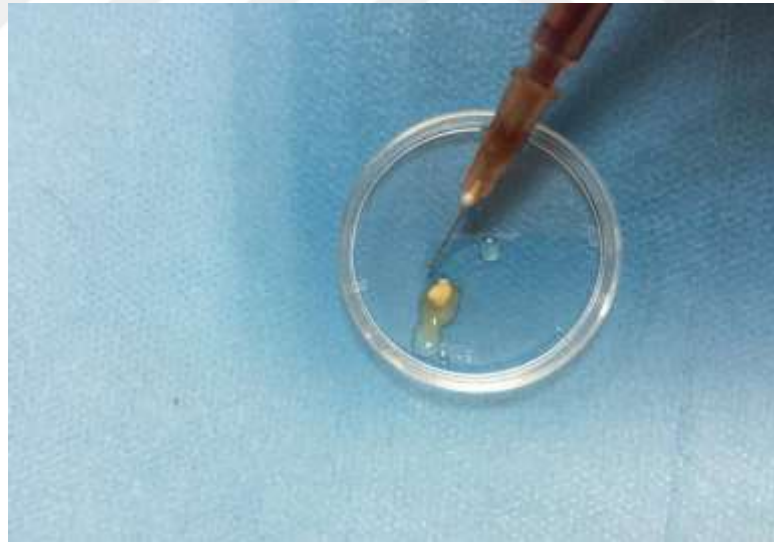
Şekil 3.24. Omentum biyoçatının osteotomi hattına yerleştirilmesi



Şekil 3.25. Omentum biyoçatının PRP enjeksiyonu ile ıslatılması ve uygulanabilir hale getirilmesi



Şekil 3.26. Deselülerize omentum biyoçatısı ve kök hücre uygulaması



Şekil 3.27. Deselülerize omentum biyoçatının PRP ve kök hücre kombinasyonu ile beraber uygulanması

Daha sonrasında hayvanlar gruplara uygun olarak toplamda 5 kafeste post-operatif dönemde bakımları açısından yerleştirildi. Cilt insizyon bölgelerine herhangi bir pansuman uygulanmadı. Anesteziden uyanamayan hayvan olmadı. Post-operatif

dönemde kafeslerinde normal beslenmelerine izin verildi ve aktivitelerinde herhangi bir kısıtlama gerçekleştirilmedi.

Post-operatif dönemde 6 hafta boyunca sıçanlar takip edildi. Herhangi bir enfeksiyon bulgusuna veya ek komplikasyona rastlanmadı. Hayvanlar 6. haftada yüksek doz anestezi ile ötenaziyi takiben her iki önkolu omuz ekleminde dezartiküle edildi. Daha sonra dezartiküle halde üst ekstremitelerin %10 formaldehitte fiksasyonu yapıldı. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda her grup sağ ve sol üst ekstremiteler olmak üzere işaretlenerek portatif röntgenografileri çekildi. Daha sonrasında önkol çift kemik olarak diseksiyonu gerçekleştirildi (Şekil 3.28) ve dekalsifikasyon açısından %10 luk EDTA solüsyonuna konuldu. Dekalsifikasyon sonrasında kemikler parafin bloklara gömülerek, kemik uzun aksına dik olacak şekilde 5 µm kalınlıkta kesitler alındı. Her bir kemik numune için birden fazla kesitlerde standart olarak Hematoksilen ve Eozin boyanma ile birlikte Trikrom boyama da gerçekleştirildi.

Her gruptan 4 önkol randomize olarak biyomekanik çalışma için ayrıldı ve toplam 16 önkola biyomekanik deney uygulandı. Histopatolojik incelemeler için ise her gruptan 8 adet önkol numunesi deney içerisinde ayrılarak toplam 40 adet önkol çalışmaya tabi tutuldu.



Şekil 3.28. Diseksiyon sonrası önkol çift kemik görünümü

3.5. Radyografik Analiz

6 haftalık iyileşme süresini takiben ötenazi uygulanan hayvanların üst ekstremiteleri omuz ekleminde dezartiküle edildikten sonra Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda portatif röntgenografileri çekilmiş ve bu grafler Cook tarafından yapılan bir skala ile değerlendirilmiştir (90) (Tablo 3.2).

Tablo 3.2. İyileşmenin değerlendirilmesi için radyografik skala (Cook) (90)

Tanım	Skor
Post-operatif görüntüsüne göre değişiklik yok	0
Greftten ayırt edilebilecek düzeyde ufak radyodansite artışı	1
Greft ile beraber tek korteks köprüleşmesi, radyodansitede belirgin artış	2
Greft kenarları silüet halinde görülebiliyor, en az bir korteks oluşmaya başlamış	3
Kesik uçlar hala görülebilecek şekilde en az iki korteks birbiri ile radyodens olacak şekilde birleşmiş, greft ve yeni kemik arasında fark ayırt edilemiyor	4
Greft ve yeni kemik arasında fark ayırt edilemiyor, kesik uçlardan en az bir tanesi fark edilemeyecek şekilde kortikal olarak birleşmiş	5
Greft görülemiyor, kesik uçlar artık seçilemiyor, defekt yeni kemik ile dolmuş	6

3.6. Histopatolojik Analiz

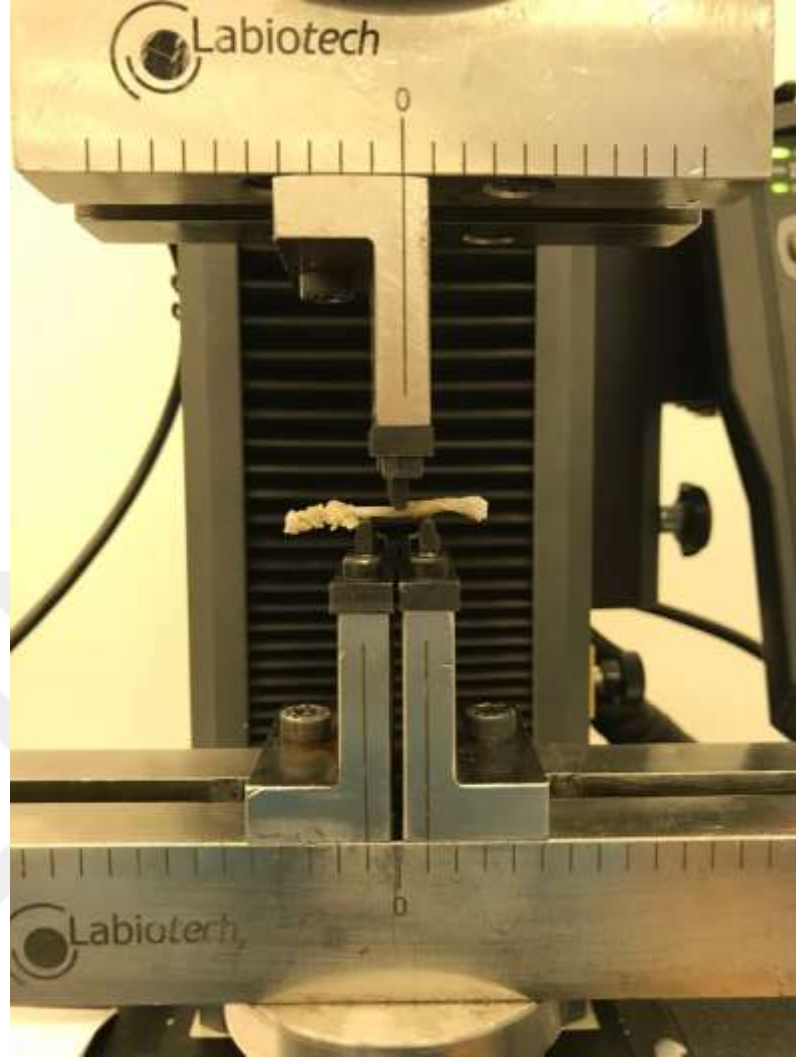
Histopatolojik analiz için Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı kullanılarak Trikrom ve Hematoksilen & Eozin boyanma sonrasında kesitler her bir kemik için değerlendirildi. Her bir kesit 5 µm kesit kalınlığında alınarak en iyi kesitler her bir kol için seçildi ve değerlendirme sırasında Salkeld Skorlama Sistemi kullanıldı (91) (Tablo 3.3).

Tablo 3.3. Salkeld Skorlama Sistemi (91)

Kriter	Tanımlama	Skor
Kaynama Kalitesi	Fibröz veya başka kaynama yok	0
	Fibröz kaynama	1
	Fibrökartilajen veya kıkırdak kaynama	2
	Mineralize kıkırdak veya kemik kaynama	3
	Kemik kaynama	4
Korteks Oluşumu ve Remodelizasyon	Korteks oluşumu yok	0
	Dış kenarlarda yeni kemik oluşumu	1
	Her iki dış kortekste ve medullada belirgin kemik oluşumu	2
	Korteks oluşmuş ancak birleşim yok	3
	Defektin tamamını kapsayacak şekilde korteks oluşumu	4
Kemik-Greft Karışımı ve Yeni Kemik Oluşumu	Greft materyali görülebiliyor, yeni kemik oluşumu ve inkorporasyon yok	0
	Yeni kemik yok, greftin tamamı veya tamamını görülebiliyor	1
	Greft görülebiliyor, küçük miktarda yeni kemik oluşumu ve inkorporasyon var	2
Greft azalırken yeni kemik oluşumu artıyor	Greft görülebiliyor, orta miktarda yeni kemik oluşumu ve inkorporasyon var	3
	Greft mevcut, yeni kemik oluşumu doğal kemik ile beraber, inkorporasyon var, kemik remodelizasyonu başlamış	4
	Önceki seviyeye göre azalmış greft, iyi greft	5
	İnkorporasyonu, bolca gözlenen yeni kemik oluşumu	6
	Çok az da olsa gözlenen greft, bolca gözlenen yeni kemik oluşumu ve doğal kemik ile birleşmiş	7
Görünen greft yok ve tamamen yeni kemik	Grefti doğal kemikten ayırt edememe, mükemmel inkorporasyon, ilerlemiş doğal kemik ve yeni kemik remodelizasyonu	8
		9

3.7. Biyomekanik Analiz

Önkol diseksiyonunu takiben her grup için geçerli olmak üzere 4 adet örnek %10 formaldehit içerisinde 2 hafta bekletildikten sonra TOBB Üniversitesi Biyomekanik Laboratuvarı'nda testler gerçekleştirilmiştir. Örnekler randomize olarak seçilmiş ve sağ ve sol ayrımı yapılmamıştır. Örnekler biyomekanik analiz açısından üç nokta basınç yöntemine tabi tutulmuşlardır. (Şekil 3.29) Her grup için tek tek her önkol Radius ve Ulna birbirinden ayrılmadan konulmuş ve saniyede 0.1 N basınç arttırılacak şekilde basınca maruz bırakılmışlardır. Kemik kırılana kadar basınç arttırılmış ve kırıldıktan sonra test sonlandırılmıştır.



Şekil 3.29. Örneklerin üç nokta basıncına maruz bırakılması

3.8. İstatistik Analiz

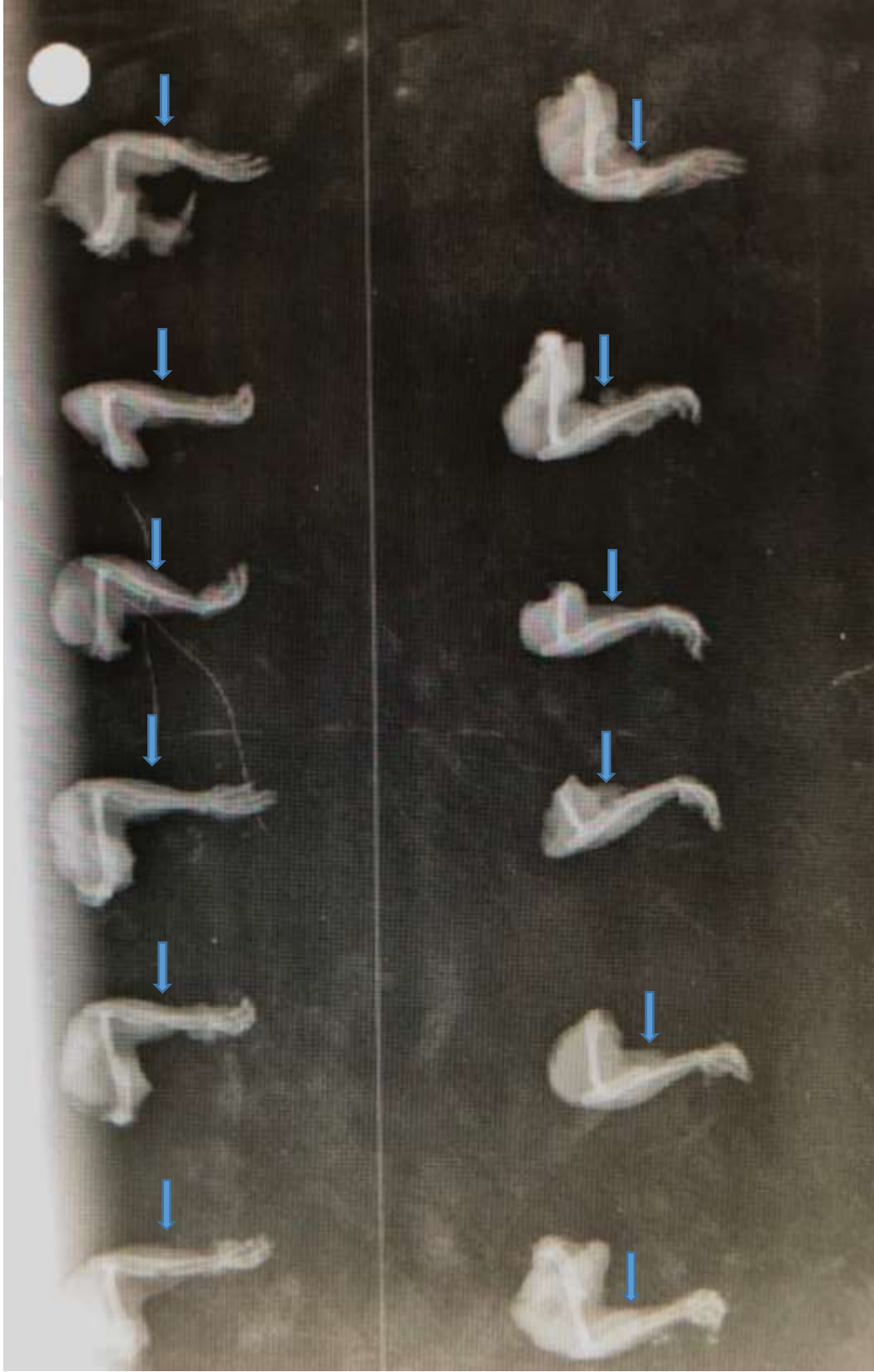
İstatistiksel analizler SPSS versiyon 21 yazılımı kullanılarak yapıldı. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Saphiro-Wilk testleri) kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için ortanca, minimum ve maksimum değerleri kullanılarak verildi. Radyografik skorlar ve Histolojik skorlar normal dağılım göstermediği belirlendiğinden bu parametreler gruplar arasında Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldı. İkişerli karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi kullanılarak yapıldı ve Bonferroni düzeltmesi kullanılarak değerlendirildi. İstatistiksel anlamlılık için toplam tip-1 hata düzeyi %5 olarak kullanıldı.

4. BULGULAR

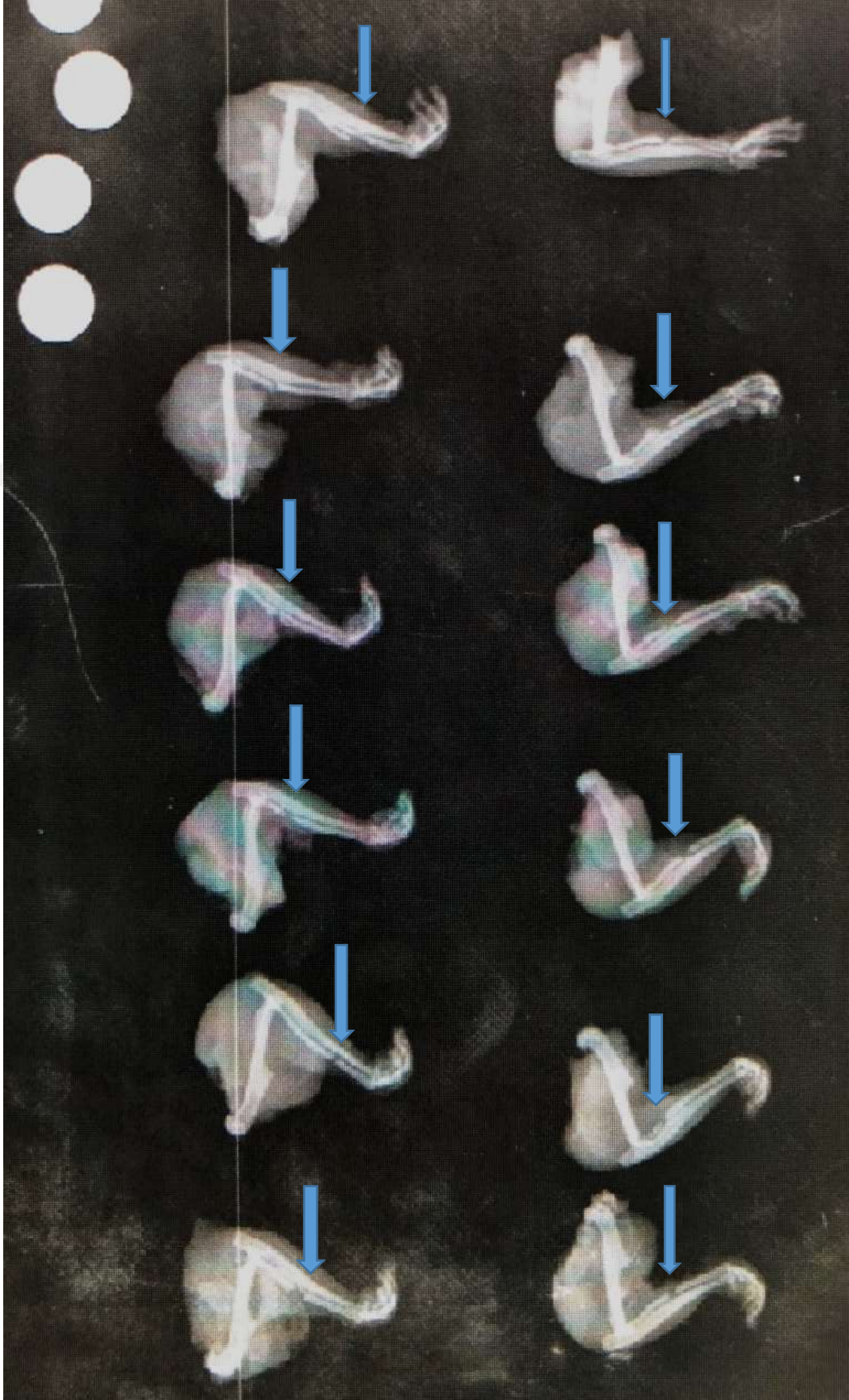
4.1. Radyografik Bulgular

6 haftalık iyileşme süresinin bitiminde ötenazi uygulanan hayvanların önkolları humerus bölgesinden dezartiküle edildi ve röntgenografileri çekildi. Her bir grubun sağ ve sol olmak üzere kolları gruplandırıldı ve sırası ile dizilerek portatif röntgen kasedi üzerine yerleştirildi. Grafler Şekil 4.1, Şekil 4.2, Şekil 4.3, Şekil 4.4 ve Şekil 4.5'te verilmiştir. Kemik defekti yapılan yerler grafler üzerinde ok ile işaretlenmiştir.

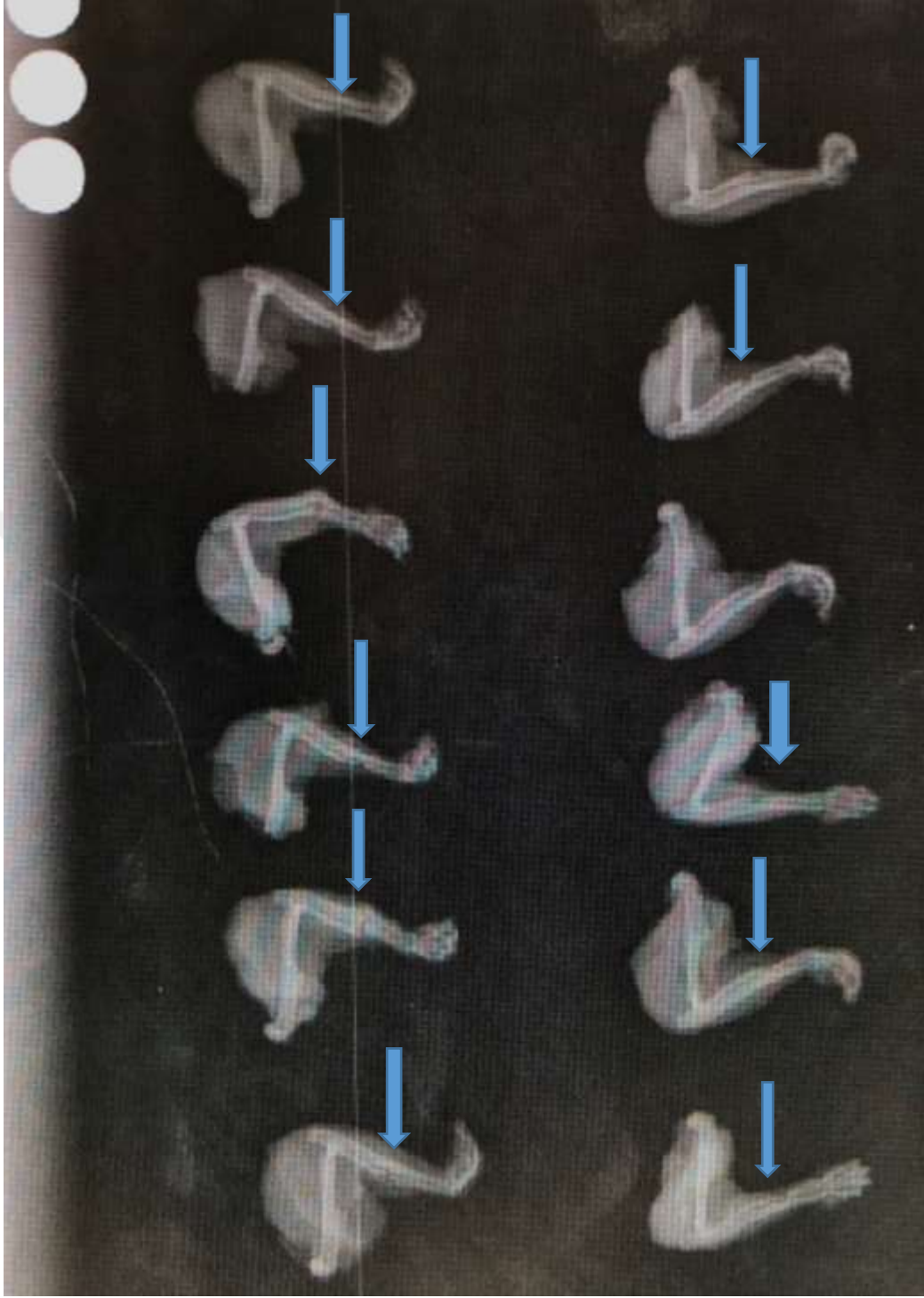




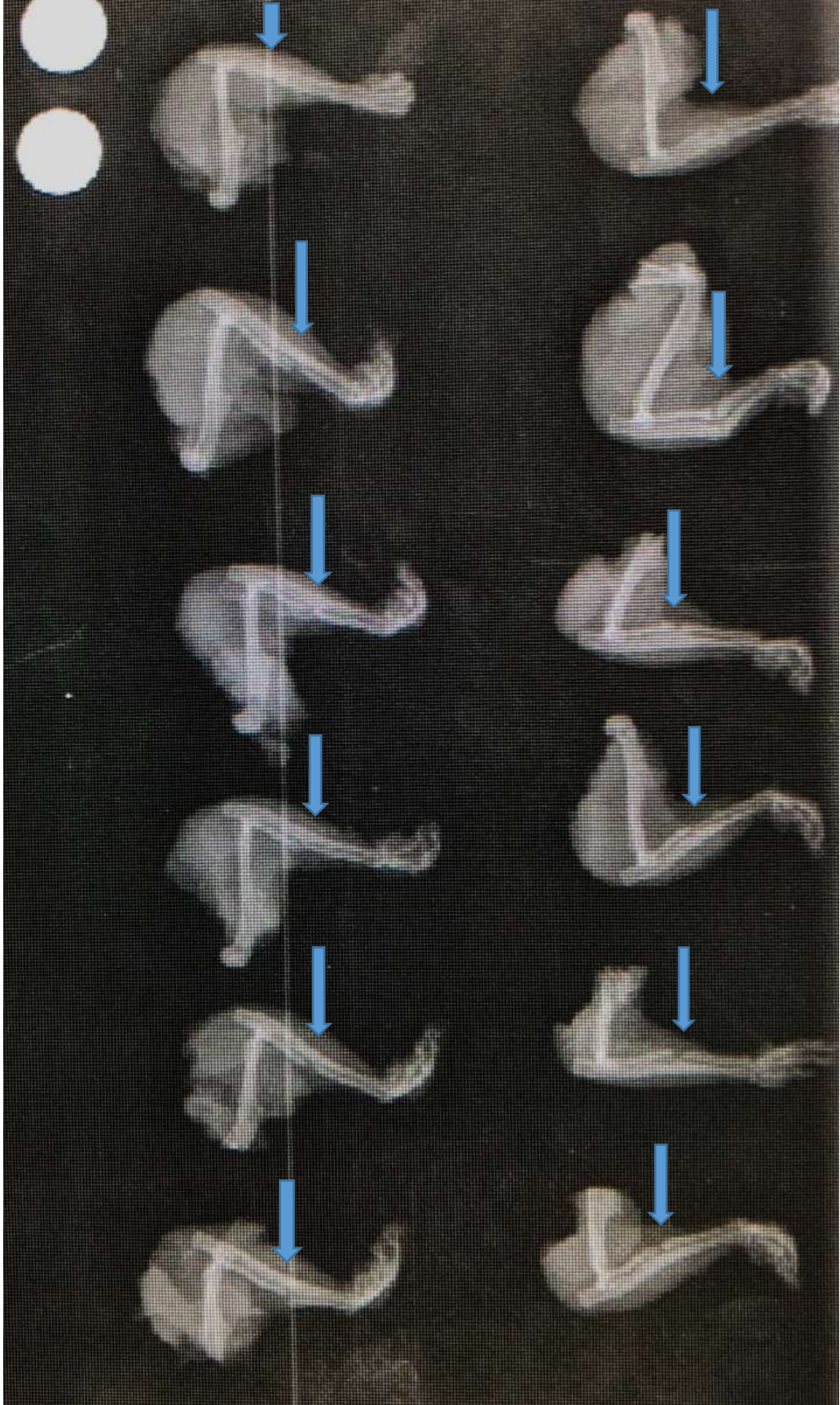
Şekil 4.1. Kontrol grubunun radyografik görüntüsü



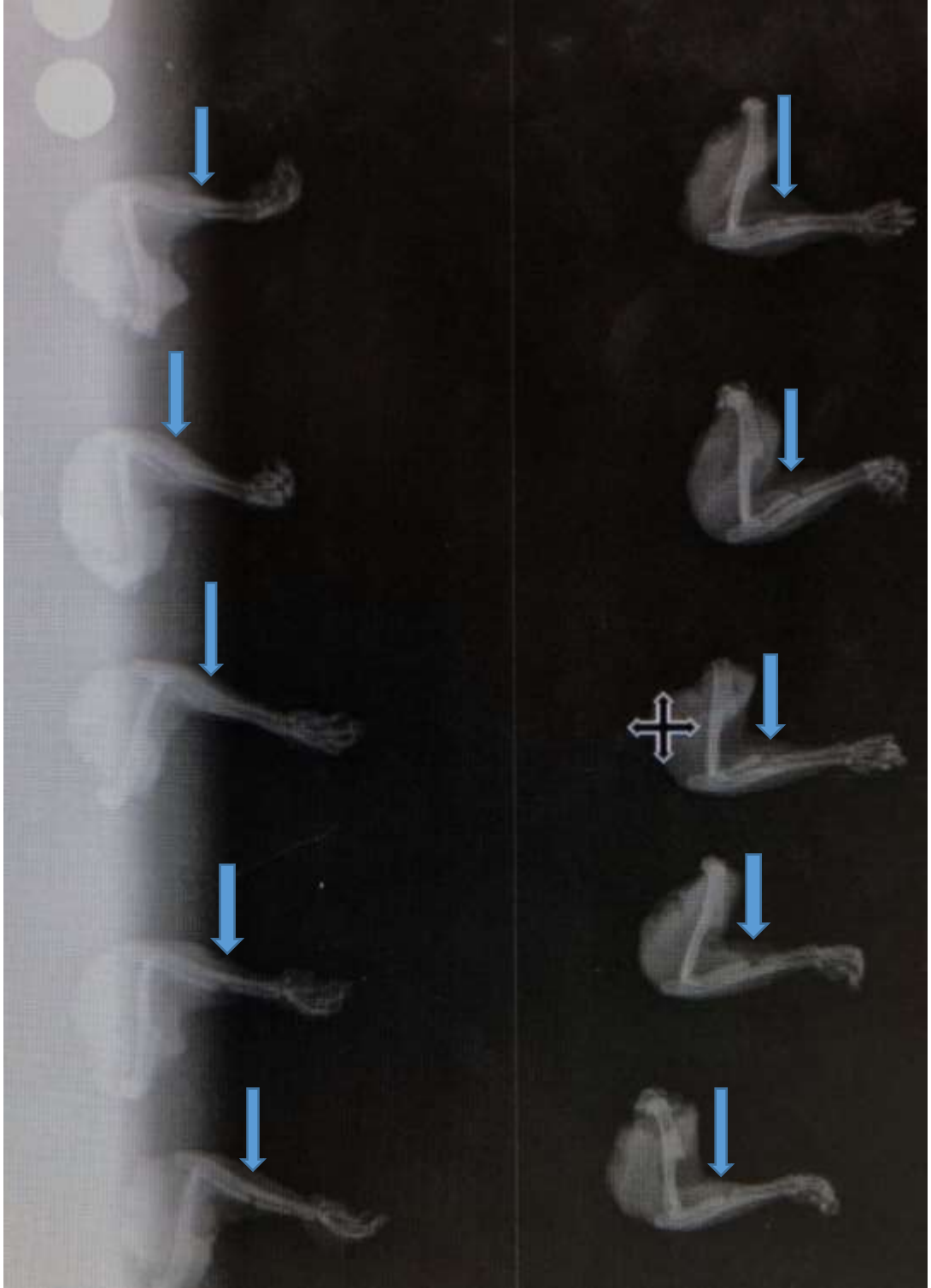
Şekil 4.2. Omentum grubunun radyografik görüntüsü



Şekil 4.3. Omentum + Kök hücre grubunun radyografik görüntüsü

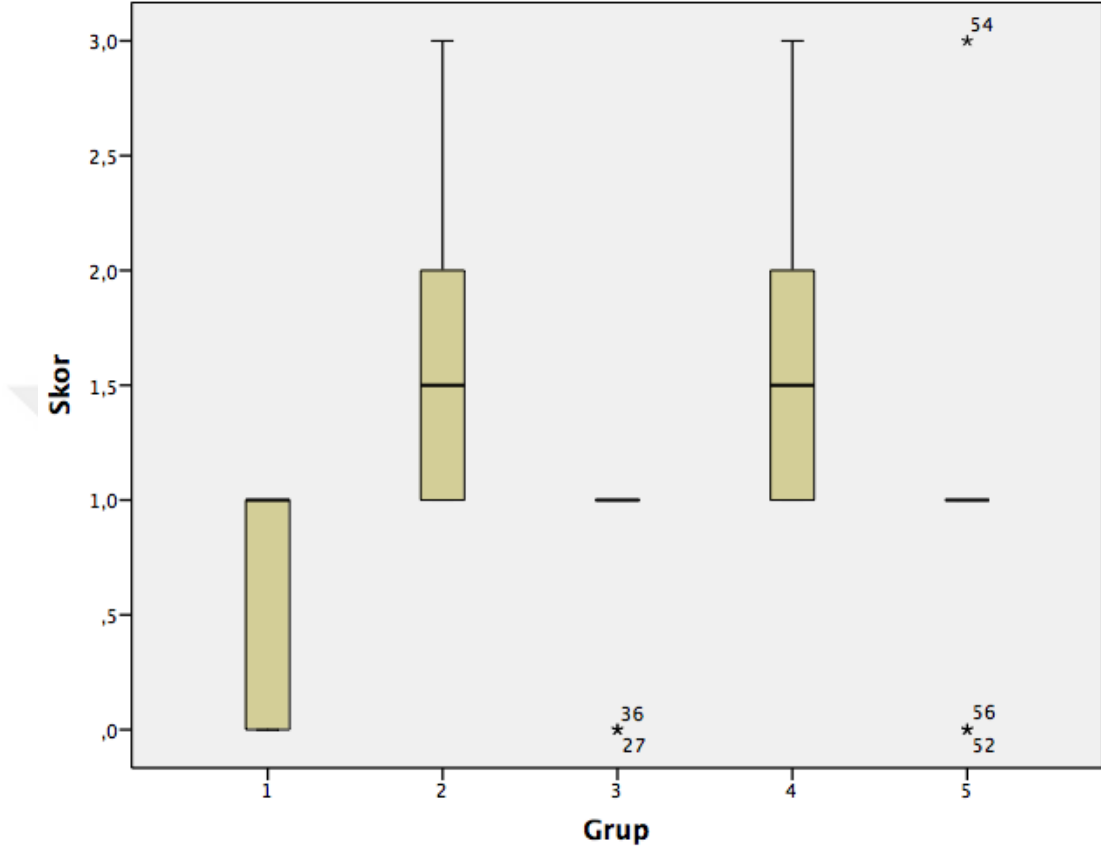


Şekil 4.4. Omentum + PRP grubunun radyografik görüntüsü



Şekil 4.5. Omentum + PRP + Kök hücre grubunun radyografik görüntüsü

Grafler Tablo 4, Cook tarafından yapılan skalaya göre değerlendirildiğinde sonuçlar aşağıda değerlendirilmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Cook skalasına göre grupların ortanca değeri ve sonuçları

Bulgulara bakıldığında her grup için sağ ve sol olmak üzere toplam 12 kol radyografik olarak değerlendirildi. Skala 0 ile 6 arasında radyografik olarak kemikleşmeye bakılarak değerlendirilmekteydi. Kontrol grubuna bakıldığında, skorlamasında en yüksek puan olarak ufak radyodansite artışı saptanmış ve 1 puan almış ve diğer örneklerin büyük bir kısmı post-operatif dönem ile aynı olarak bulundu. Ortanca değeri 1 puan olarak bulunmuştur. 2. grup olan izole omentum grubuna bakıldığında ufak greftin radyodansite artışı ile tek korteks kemikleşme arasında değişkenlik gösterecek şekilde puan almıştır. Ortancası 1.5 puan olarak bulunmuştur. 3. grup olan omentum + kök hücre grubu içerisinde post operatif dönem ile aynı olan 0 puan ile radyografide ufak dansite artışı olan 1 puan arasında değişkenlik göstermiş ve ortancası 1.0 puan almıştır. 4. Grup olan omentum + PRP grubunda greftte ufak

radyodansite artışı olan 1 puan ile tek korteks kemikleşme olan 3 puan arasında puan almıştır. Ortanca puanı 1.5 olarak bulunmuştur. Son olarak 5. grup olan omentum + kök hücre + PRP grubuna bakıldığı zaman greftte ufak radyodansite artışı olan 1 puan ile beraber belirgin radyodansite artışı olan 2 puan arasında puanlama almıştır. Ortanca puanı 1 olarak bulunmuştur (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Gruplar arası skorların Kruskal-Wallis testi ile karşılaştırılması

Grup	N	Ortanca	Minimum	Maksimum	<i>p değeri</i>
Kontrol	12	1,0	0	1	0.001
Omentum	12	1,5	1	3	
Om +Kök hc.	12	1,0	0	1	
Om+ PRP	12	1.5	1	3	
Om+Kök hc+PRP	12	1,0	0	3	

Beş grup arasında radyolojik skora açısından anlamlı fark bulundu. Bu farkın nedenini ortaya koymak üzere gruplar ikili karşılaştırıldığında, omentum grubunun radyolojik skoru kontrol grubu ve omentum ve kök hücre uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı yüksek saptandı (sırası ile kontrol grubu $p=0,047$, omentum ve kök hücre grubu $p=0,047$). Aynı zamanda omentum ve kök hücre beraber uygulanan grup ile omentum grubu arasındaki farkın p değeri 0.047 omentum lehine ve omentum ve kök hücre uygulanan grup ile omentum ve PRP uygulanan grup arasındaki farkın p değeri 0.047 omentum ve PRP uygulanan grup lehine anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

4.2. Biyomekanik Bulgular

Biyomekanik bulgulara bakıldığında, gruplar arası çökme yükü, eğilme dayanıklılığı, maksimum yük taşıma ve eğilme momenti değerlendirilmiştir. Ortanca değerleri üzerinde herhangi bir anlamlı farklılık bulunmamıştır. Sonuçlar Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Biyomekanik bulguların Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirilmesi

	Kontrol Grubu	Omentum Grubu	Omentum+Kök Hücre Grubu	Omentum+ PRP Grubu	Omentum+ Kök Hücre + PRP Grubu	p Değeri
Çökme yükü	66,34 (68,45-42,74)	45,99 (55,99-42,28)	48,64 (89,26-26,18)	50,76 (68,58-40,44)	47,15 (59,12-29,42)	0,864
Eğilme Dayanıklılığı	180,74 (194,71-99,78)	185,40 (260,53-124,22)	149,19 (218,80-47,83)	183,76 (253,74-93,63)	184,94 (197,03-43,15)	0,864
Maksimum Yük	99,65 (102,16-55,93)	88,53 (131,05-68,54)	88,87 (111,15-38,07)	68,30 (82,28-52,14)	77,74 (86,43-68,98)	0,258
Eğilme Momenti	249,14 (257,17-139,83)	221,32 (327,64-171,37)	222,19 (277,88-95,19)	170,75 (205,70-130,16)	194,37 (216,09-172,45)	0,258

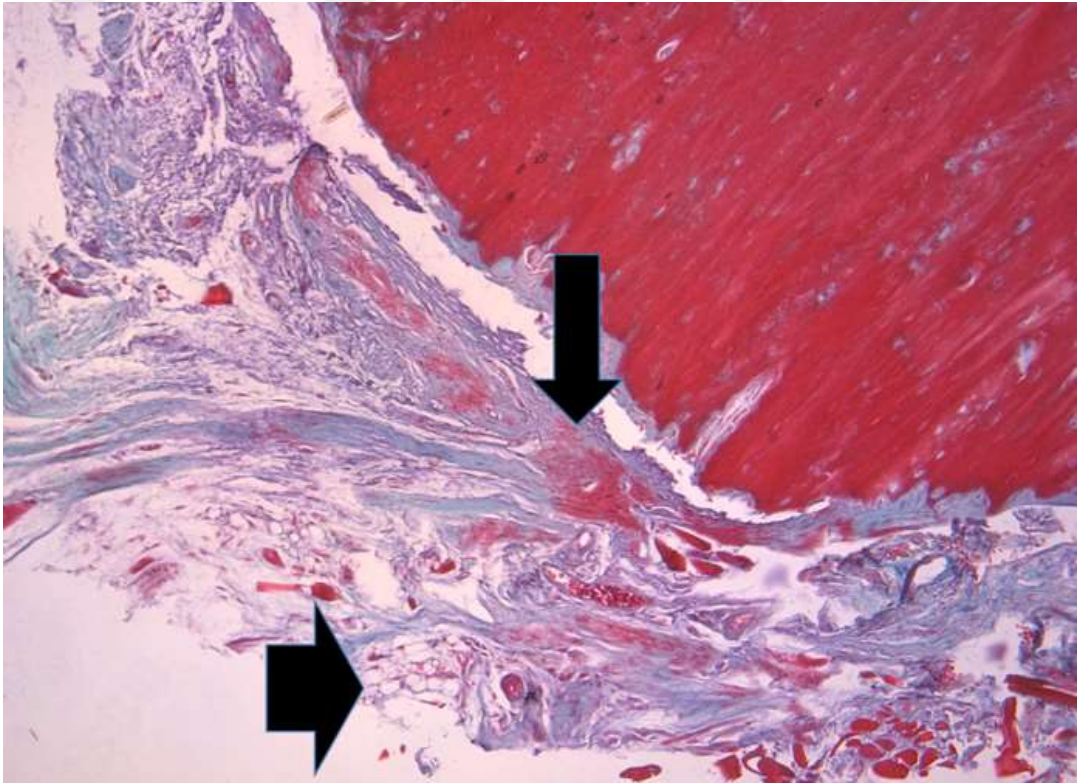
* Veriler ortanca (maksimum-minimum) şeklinde verilmiştir.

4.3. Histopatolojik Bulgular

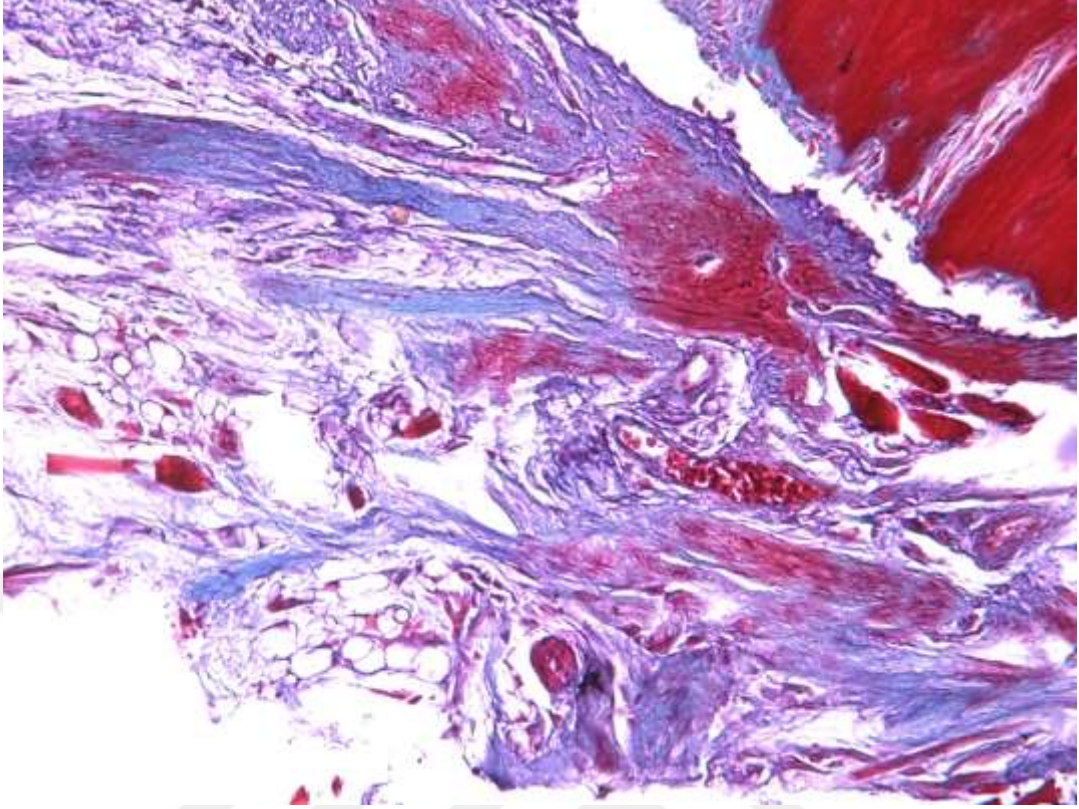
Toplam 40 örnek histolojik olarak değerlendirilmiştir. İlk grup olan kontrol grubunda histolojik özelliklerinde, 4x'lük büyütmesinde kemikte defekt olduğu gösterilmekte (Şekil 4.7). 10x'lük büyütmesine bakıldığı zaman oklar ile işaretli alanlarda yeni oluşan kemik adacıkları ve yağ dokusu hücreleri görülmektedir (Şekil 4.8). Bu alanların 20x mikroskopik büyütmesi aşağıda verilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.7. Kontrol grubu örneği, 4x mikroskopik görüntüsü

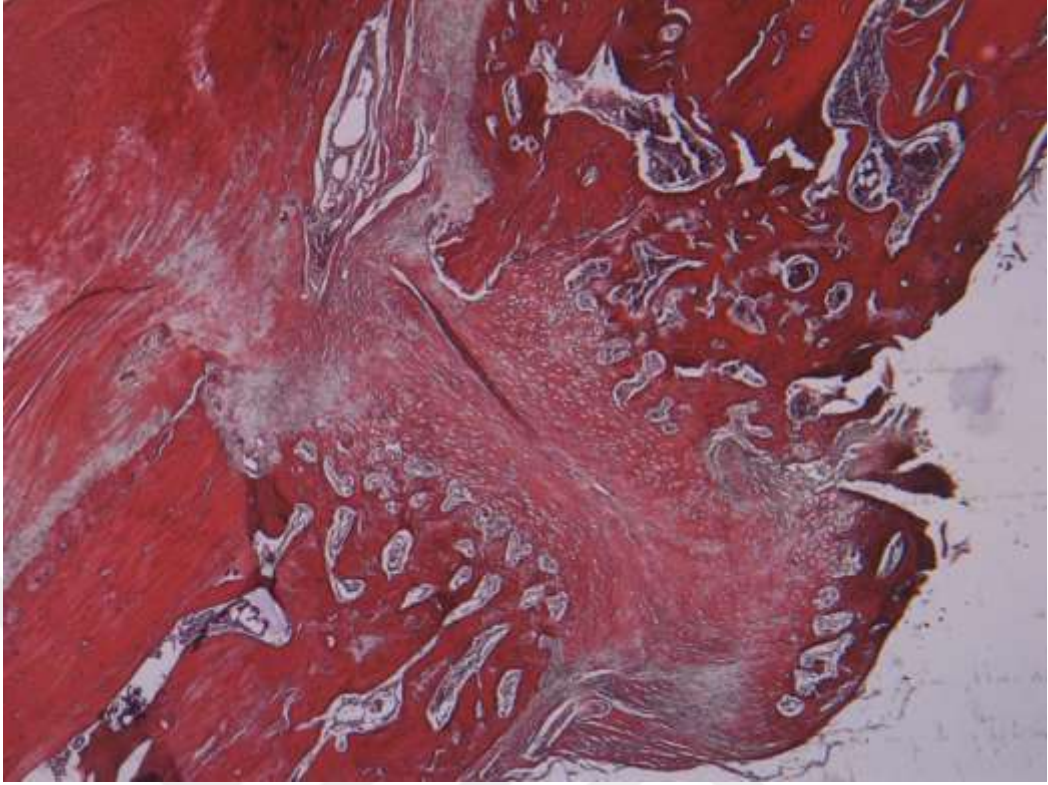


Şekil 4.8. Kontrol grubu örneği, 10x mikroskopik görüntüsü

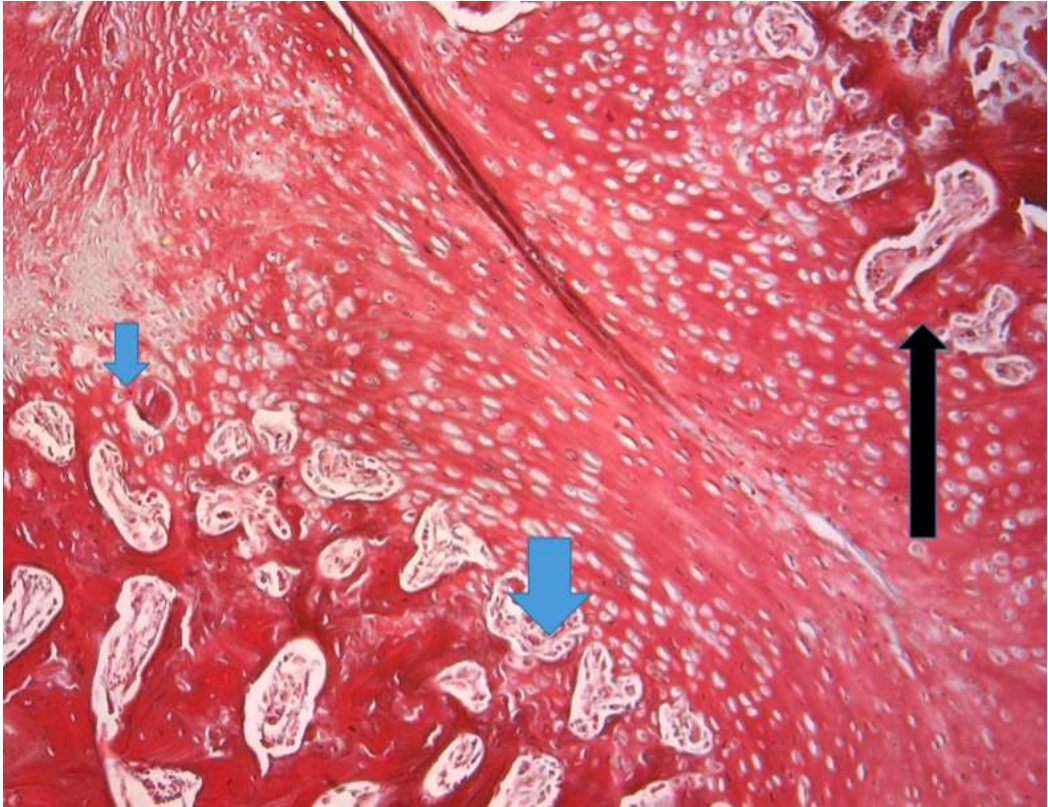


Şekil 4.9. Kontrol grubu örneği, 20x mikroskopik görüntüsü

İkinci grup olan Omentum grubunun histolojik özelliklerine bakıldığında, defektlerin tamamen dolu olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.10). 10x 'luk büyütmesine bakıldığında ara biyoçatı tamamen organize kemik ile dolmuş ve kalsifikasyon başlamıştır (Şekil 4.11). Omentum grubundan bir örnek aşağıda verilmiştir. Örnek oklar ile işaretlenmiştir.

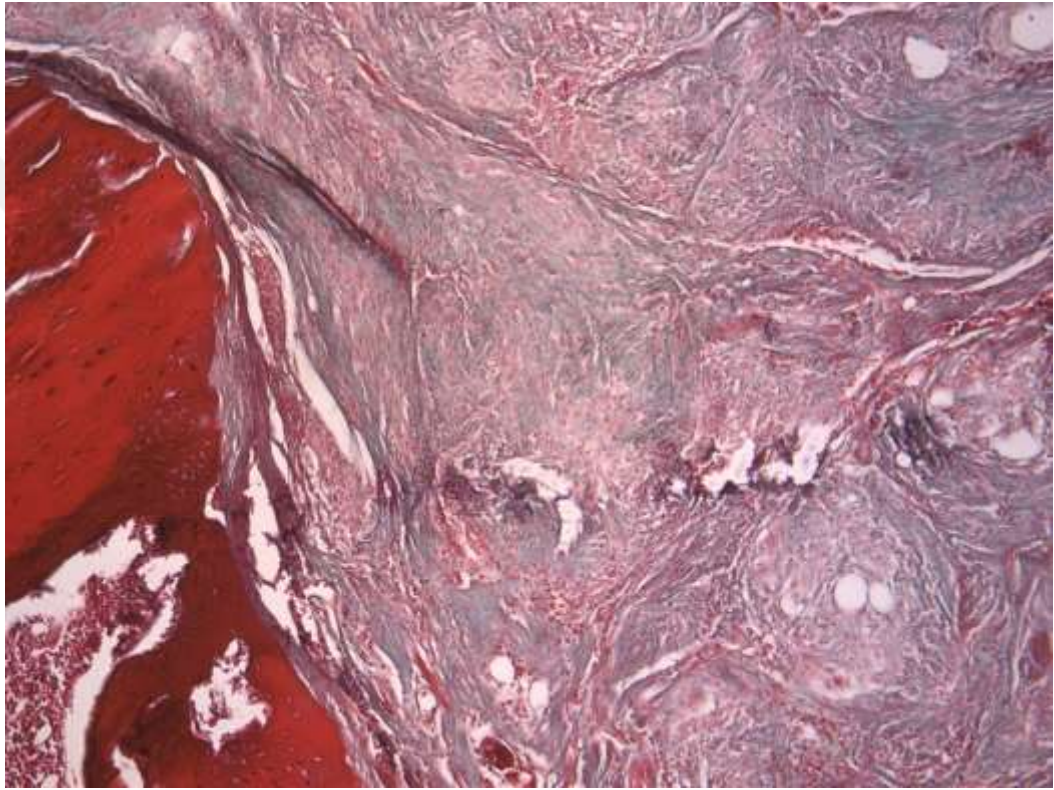


Şekil 4.10. Omentum grubu örneği, 4x mikroskopik görüntüsü

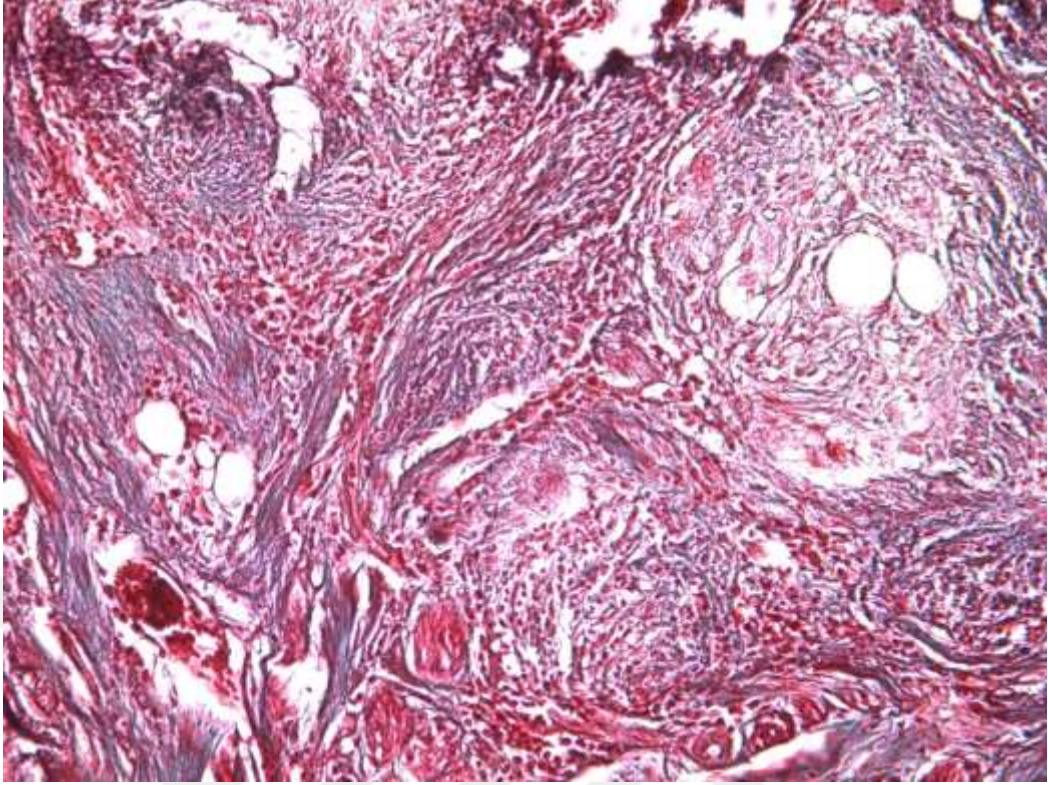


Şekil 4.11. Omentum grubu örneği, 10x mikroskopik görüntüsü

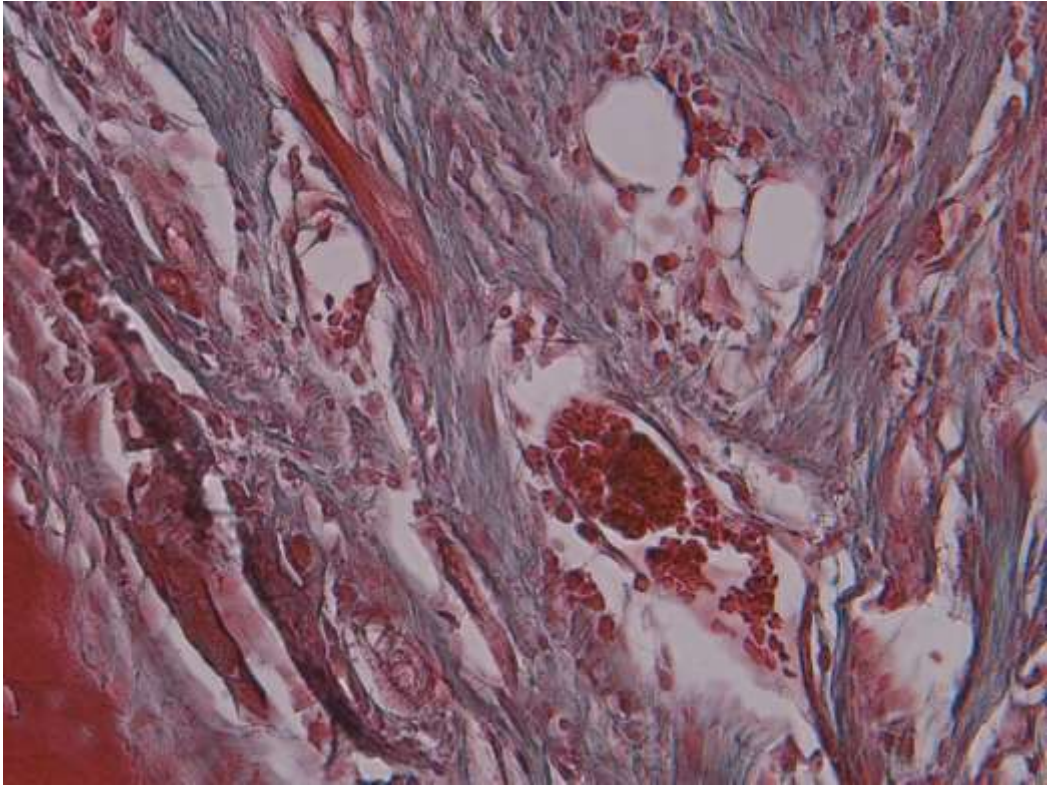
Üçüncü grup, deselülerize omentum ve kök hücre beraber uygulanan gruptur. Histolojik özelliklerine bakıldığı zaman, yoğun mavi renk ile biyoçatının kollajeni seçilmektedir (Şekil 4.12). Çok sayıda hücre grubu biyoçatı içerisinde canlılığını koruduğu görülmüştür (Şekil 4.13). Minimal alanda kalsifikasyon ve çok az miktarda kemik adacıkları gözlemlenmiştir (Şekil 4.14). Gruba ait birer örnek aşağıda gösterilmiştir.



Şekil 4.12. Omentum ve kök hücre grubu örneği, 10x mikroskopik görüntüsü

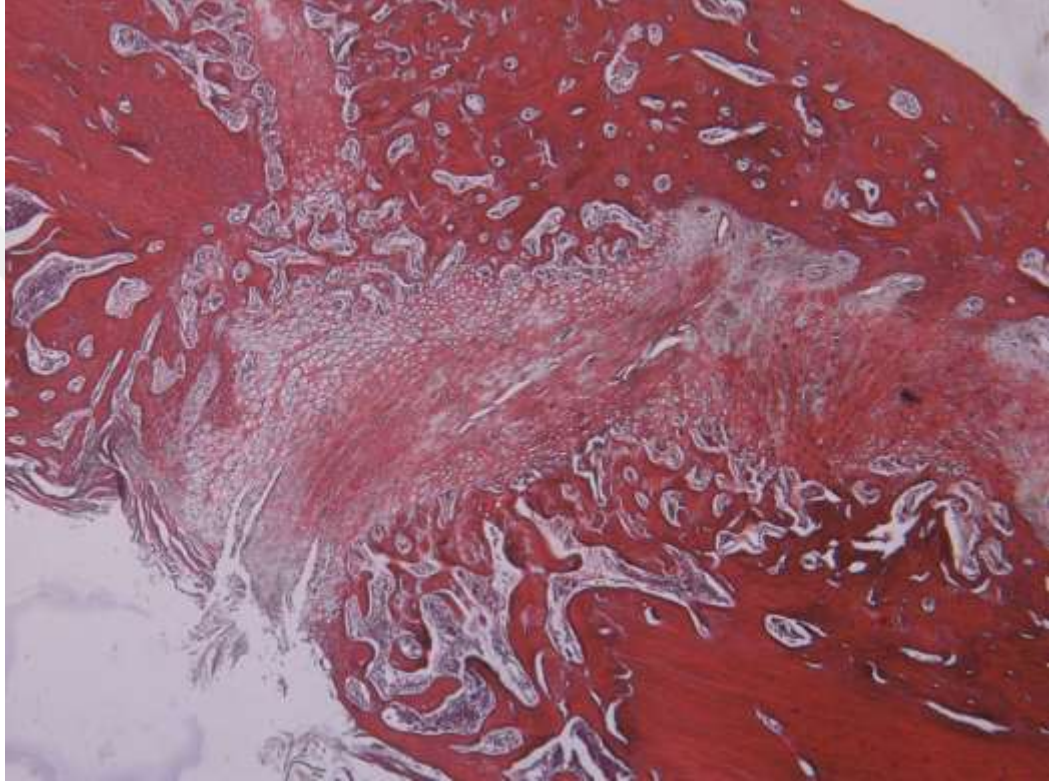


Şekil 4.13. Omentum ve kök hücre grubu örneği, 20x mikroskopik görüntüsü

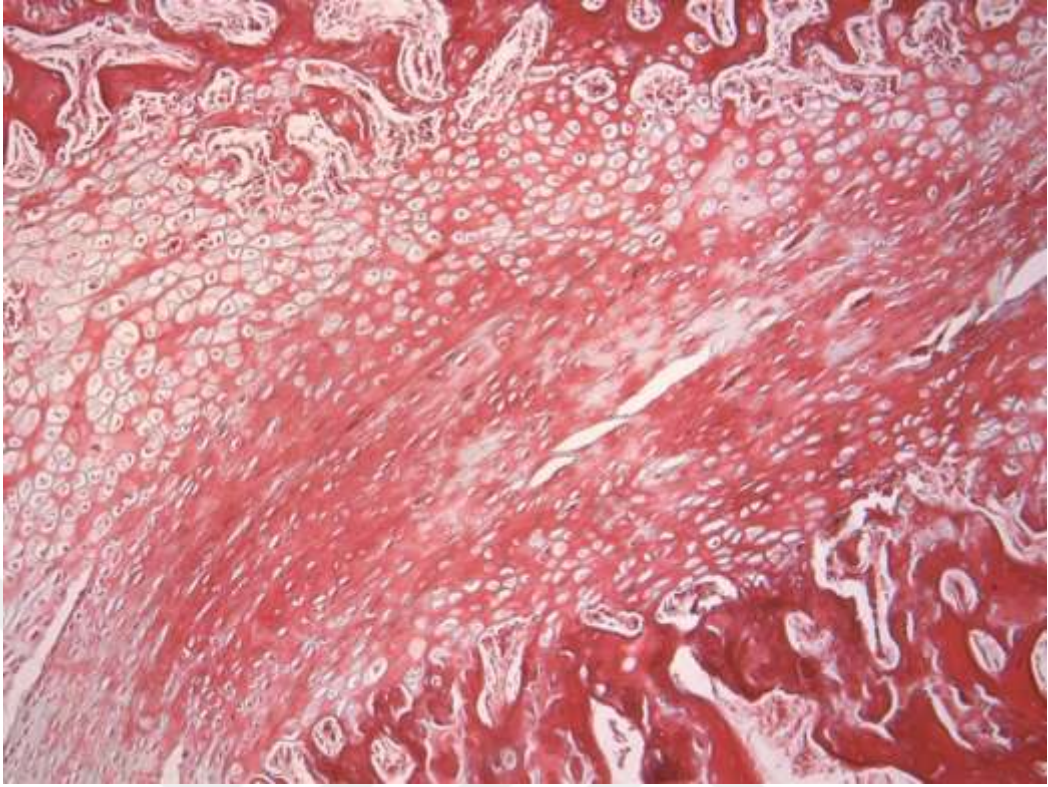


Şekil 4.14. Omentum ve kök hücre grubu örneği, 40x mikroskopik görüntüsü

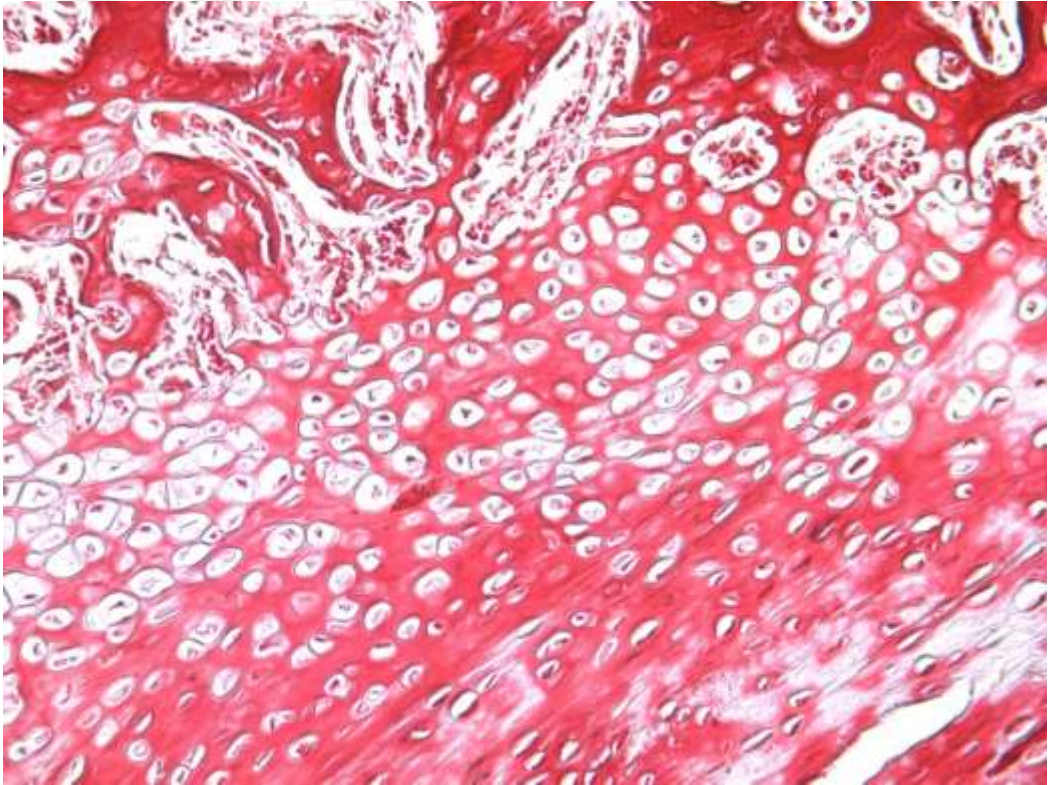
Dördüncü grup, omentum ve PRP'nin beraber uygulandığı gruptur. Bu grup histolojik incelemesinde, defekt alanının küçüldüğü, (Şekil 4.15) her iki kemik ucunda yeni kemikleşme ile beraber en fazla kemikleşme ve en düzenli kemikleşmenin olduğu görülmektedir (Şekil 4.16, 4.17). Aynı zamanda kalsifikasyonun da daha fazla olduğu görülmüştür.



Şekil 4.15. Omentum ve PRP grubu örneği, 4x mikroskopik büyütme

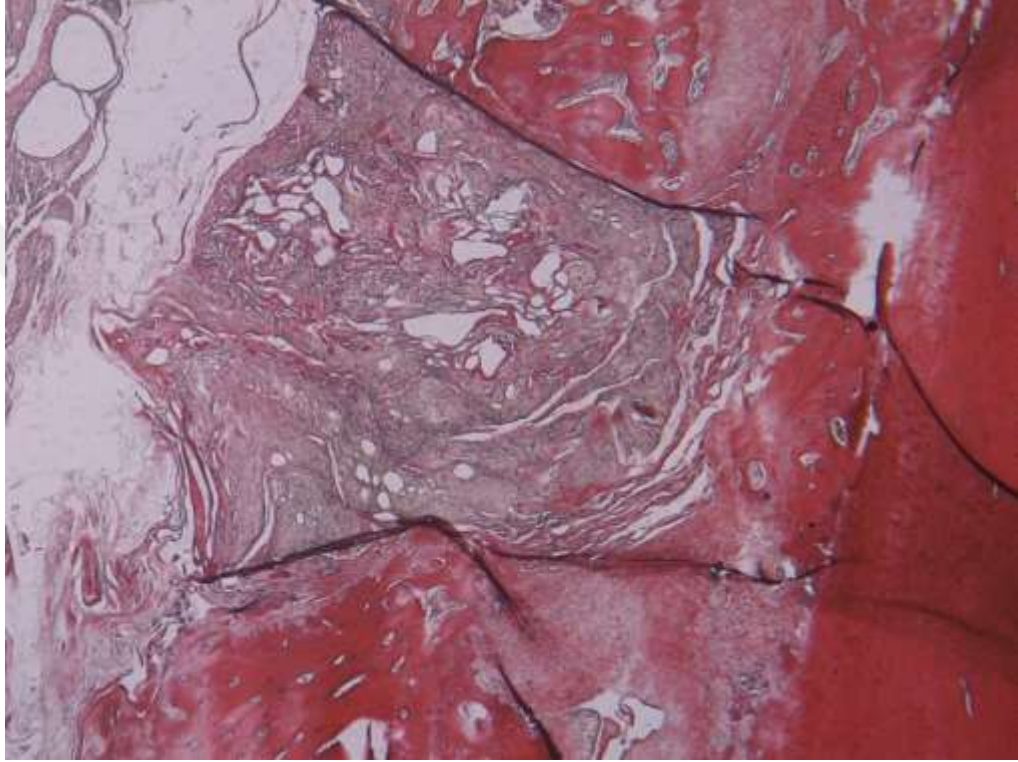


Şekil 4.16. Omentum ve PRP grubu örneği, 10x mikroskopik büyütme

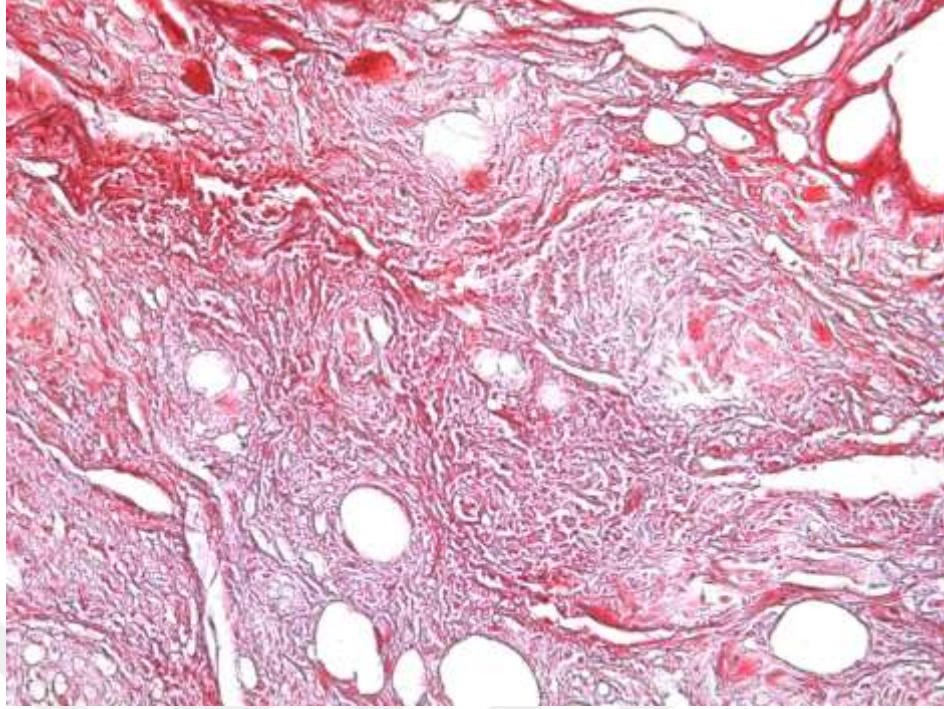


Şekil 4.17. Omentum ve PRP grubu örneği, 20x mikroskopik büyütme

Son grup olan beşinci grupta, omentum, PRP ve kök hücre beraber uygulanması sonucunda histolojik bulgulara bakıldığında zaman, bol miktarda damarlanma ve yağ adacıkları gözlemlenmiştir. (Şekil 4.18) Yakından bakıldığında zaman omentum ve kök hücre grubuna kıyasla daha fazla kemik adacıkları ve kalsifikasyonlar gözlemlenmiştir (Şekil 4.19).



Şekil 4.18. Omentum, PRP ve kök hücre grubu örneği, 4x mikroskopik büyütme



Şekil 4.19. Omentum, PRP ve kök hücre grubu örneği, 10x mikroskopik büyütme

Çalışmaya dahil edilen toplam 40 önkol Salkeld Skorlama Sistemi'ne göre skorlaması yapılmıştır. Skorlamada varolan Kaynama Kalitesi, Korteks Oluşumu ve Remodelizasyonu ve Yeni Kemik Oluşumu başlıkları değerlendirilmiştir. Her bir grup bu başlıklar ve toplam puan üzerinden kendi içlerinde istatistik olarak değerlendirilmiştir. Sonuçlar aşağıda verilmiştir.

Tablo 4.3. Histolojik bulguların Kruskal-Wallis Testi ile değerlendirilmesi

	Kaynama Kalitesi	Korteks Oluşumu ve Remodelizasyon	Yeni Kemik Oluşumu	Toplam skor	P değeri
Kontrol grubu	2 (1-2)	0 (0-0)	1 (0-1)	3 (1-3)	< 0.01
Omentum Grubu	3 (2-3)	3 (2-3)	3 (3-3)	9 (7-9)	< 0.01
Omentum + Kök Hücre Grubu	1.5 (1-2)	0 (0-1)	1 (1-2)	2.5 (2-5)	< 0.01
Omentum + PRP Grubu	3 (2-3)	2.5 (2-3)	3.5 (2-4)	8.5 (6-10)	< 0.01
Omentum + Kök Hücre + PRP Grubu	2 (2-3)	2 (0-3)	2 (1-3)	6.5 (3-9)	< 0.01

* Veriler ortanca (maksimum-minimum) şeklinde verilmiştir.

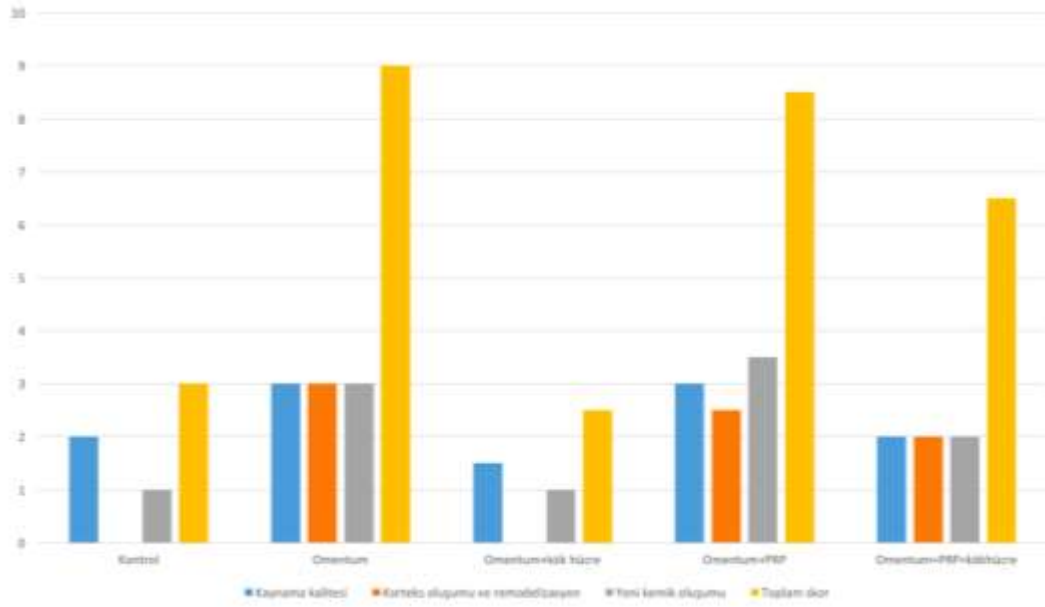
Beş grup arasında Salkeld Skorlama Sistemi'nin her bir skorlaması ve toplam skorlaması açısından anlamlı fark bulundu. Bu farkın nedenini ortaya koymak üzere gruplar ikili karşılaştırıldığında, kontrol grubunun kaynama kalitesi skoru omentum grubu ve omentum ve PRP uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı düşük saptandı (sırası ile $p=0,004$, $0,016$). Aynı zamanda omentum ve kök hücre beraber uygulanan grup ile omentum grubu arasındaki farkın p değeri 0.001 olarak omentum grubu lehine ve omentum ve kök hücre uygulanan grup ile omentum ve PRP uygulanan grup arasındaki farkın p değeri 0.006 olarak omentum ve PRP uygulanan grup lehine anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

Korteks oluşumu ve Remodelizasyonu ayrı olarak ikili olarak karşılaştırıldığında, kontrol grubunun skoru omentum grubu ve omentum ve PRP uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu (sırası ile $p=0.001$ ve $p=0.001$). Aynı zamanda omentum ve kök hücre beraber uygulanan grup ile omentum grubu ve omentum ve PRP uygulanan grup arasında yine istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuştur (sırası ile $p=0.001$ ve $p=0.007$).

Yeni Kemik Oluşumu skorları ayrı olarak ikili olarak karşılaştırıldığında, kontrol grubunun skoru omentum grubu ve omentum ve PRP uygulanan gruba göre anlamlı olarak düşük bulundu (sırası ile $p=0.001$ ve $p=0.001$) Aynı zamanda omentum ve kök hücre beraber uygulanan grup ile omentum grubu arasındaki farkın p değeri 0.013 omentum grubu lehine ve omentum ve kök hücre uygulanan grup ile omentum ve PRP uygulanan grup arasındaki farkın p değeri 0.016 olarak omentum ve PRP uygulanan grup lehine anlamlı fark bulunmuştur.

Toplam skorlar değerlendirildiğinde anlamlı fark bulundu. Bu farkın nedenini ortaya koymak üzere gruplar ikili karşılaştırıldığında, kontrol grubunun kaynama kalitesi skoru omentum grubu ve omentum ve PRP uygulanan gruba göre istatistiksel anlamlı düşük saptandı (sırası ile $p=0.001$, 0.001). Aynı zamanda omentum ve kök hücre beraber uygulanan grup ile omentum grubu arasındaki farkın p değeri 0.002 omentum grubu lehine ve omentum ve kök hücre uygulanan grup ile omentum ve PRP uygulanan grup arasındaki farkın p değeri 0.003 omentum ve PRP uygulanan grup lehine anlamlı olarak farklı bulunmuştur.

Her bir skarlama ve toplam skor Şekil 4.20’de tek tek incelenerek grafide gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Salkeld Skarlama Sistemi skorlarının grafisi

5. TARTIŞMA

Kemik defektleri özellikle ortopedik cerrahi tedavide sık görülen bir sorundur. Travma, tümörler, masif osteoliz ve enfeksiyonlar gibi en sık kemik defektleri oluşturan hastalıklarda, sebebi ne olursa olsun eksik kemik segmenti, düzgün ve fonksiyonel olarak iyileşmeyi sağlayacak şekilde yerine konmalıdır. Kemik defektleri, bahsedildiği gibi, kritik defekt haline geldiği zaman, klasik iyileşme modelini takip edemez. Günümüz teknolojik gelişmelerini takiben, doku mühendisliğinin ilerlemesi, tedavi seçeneklerinde yeni ufuklar açmıştır. Ortopedik cerrahi tedavide ise, doku mühendisliğinin başyapıtlarından bir tanesi biyoçatıdır. Kemik biyoçatısı, osteojenik hücre tutunmasına ve proliferasyonuna izin veren ve aynı zamanda bunu stimüle eden üç boyutlu matrikstir (92).

Günümüz literatürüne bakıldığında özellikle tek bir biyomateriyalin yeterli ve bütün optimal biyoçatı özelliklerine sahip olmadığı görüşü hakimdir. Geleneksel bilgilerimize bakıldığında zaman özellikle bir biyoçatının rezorbe olabilmesi, aynı zamanda hücre tutunmasına izin verebilmesi ve mekanik ve yapısal desteklik sunabilmesi, doku uyumunun iyi olması, gerekirse de biyomoleküllerle beraber kullanımında uyumunun iyi olması gerekmektedir. Standart kullandığımız materyallere baktığımızda özellikle metal ve seramik biyoçatıların rezorbe olamaması, sentetik polimerlerin hücre tutunması ve diferansiyasyonuna izin verememesi, aynı zamanda da mekanik ve yapısal destek sunamaması, biyocamların ise kırılabilirliği ve rezorpsiyonunun az olması ve ek biyomolekül uyumunun az olması nedeni ile optimal bir biyoçatı materyali bulunamamıştır. Özellikle önerilen daha çok doğal ekstraselüler matriks kompozit biyoçatılardır. Çünkü ekstraselüler matriksin orijinal dokuya yakın olması ile özellikle hücre adezyonu ve proliferasyonuna, hücre diferansiyasyonuna izin verebiliyor olması ile diğer sentetik polimerlerden ve aynı zamanda diğer doğal polimerlerden ise antijenik olmaması ile ayrılmaktadır (93).

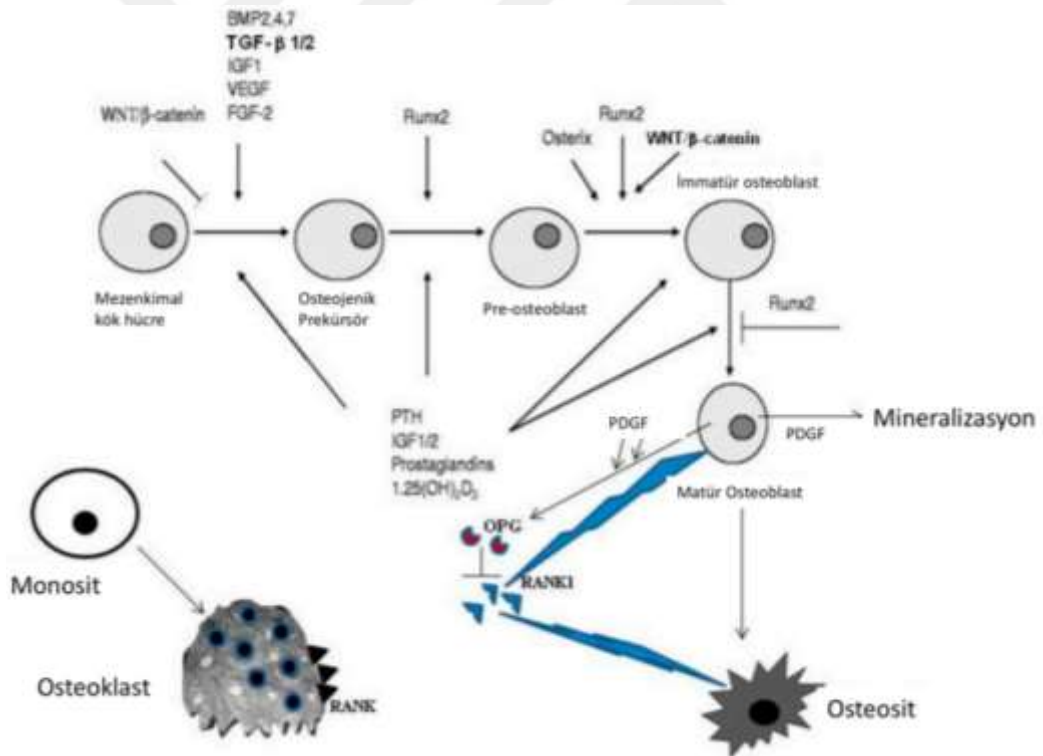
Bizim çalışmamızda kullanılan hücreden arındırılmış omentum, daha önce ortopedik cerrahi tedavide denenmemiştir. Bu çalışmamızda ilk amacımız, uygun ve optimal bir biyoçatı elde edebilmek için omentumu hücreden arındırarak test edebilmektir. Hücreden arındırarak antijenik özelliğini kaybetmesini sağladık.

Ekstrasellüler matriks kökenli bir biyoçatı olması itibarıyla uyumluluğunun fazla olacağı düşünerek tercih ettik. Histopatolojik sonuçlarına bakıldığında çalışmamızda özellikle histolojik yorumda hücre vitalitesini desteklediği üzerine sonuç bulundu. Kombine edilmeden sadece biyoçatı olarak kullanılan grupta iyileşme üzerine etkisinde ortanca değeri kontrol grubuna göre yüksek olarak bulundu. Aynı zamanda kemikleşmenin olduğu, defektin azaldığı ve kaybolduğu, biyoçatının rezorbe olduğu görüldü. Histolojik analizinden hem yeni kemikleşmenin olduğu, kaynama kalitesinin arttığı ve korteks oluşumunun sağladığı gösterildi. Çalışmadaki diğer gruplara baktığımızda, kök hücre kombinasyonu ile olan gruplarda ve omentum ile PRP beraber uygulanan gruplarda, hücreden arındırılmış omentum biyoçatının aynı şekilde hücre proliferasyonuna ve diferansiyasyonuna izin verdiği, hücre vitalitesinin sağlandığı mikroskopik olarak gösterildi. Daha önce omentum literatürde ortopedik cerrahi tedavide denenmemiştir ve biz hücreden arındırılmış omentumun bir biyoçatı olarak kullanılabileceğini göstermiş olduk.

Çalışmamızdaki ikinci amacımız olan kaynamanın daha fazla nasıl arttırılabileceği sorusuna cevap aradığımız diğer gruplarımıza baktığımızda, kök hücre kombinasyonu olan grubumuzda hücre vitalitesinin olduğu ve devam ettiği bulundu. Osteojenik etkinin var olması üzerine yapılan araştırmamızda kullanılan mezenkimal kök hücrelerin eksprese ettiği özellikle CD44, CD45, CD73, CD90 ve CD105 belirteçlerinin önemi literatürde bahsedilmektedir. (94). Çalışmamızda kullanılan kök hücreler bu belirteçlere sahip olacak şekilde seçilmesine ve biyoçatımızın hücre proliferasyonu ve diferansiyasyonuna izin verdiği görülmesine rağmen, hem Salkeld Skorlaması'nda hem de mikroskopik incelemesinde kullanılan kök hücrelerin yeterli osteojenik etkiyi gösteremediği görüldü. Bunun tam tersi olarak kemikleşmenin ve yeni korteks oluşumunun azaldığı, kaynama kalitesinin düştüğü gözlemlendi. Mikroskopik incelememizde özellikle minimal kemikleşme ve kalsifikasyon ile beraber, osteojenik formasyon yerine, artmış damarlanma, artmış adiposit ve hematopoetik hücreler ile birlikte ek bağ dokusu hücreleri gördük.

Bu durumun sebeplerini araştırmak için literatüre baktığımızda, bizden farklı olarak özellikle in vitro çalışmalarda mezenkimal kök hücrelerin osteoindüksiyonu ve osteogenezisi özellikle arttırdığı vurgulanmaktadır (95-98). İn vitro deneylerde bir biyoçatı ile beraber direkt enjeksiyonu uygulandığında kaynamayı arttırdığı,

iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir. Fricain ve arkadaşları polisakkarit biyoçatı ile kombine mezenkimal kök hücre uygulamasında başarılı sonuçları mevcuttur (99). Benzer bir şekilde Duarte Campos ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada hidrojel kombine mezenkimal kök hücre uygulamasında osteojenik hücre kültürleri üretebilmişlerdir (100). Ancak direkt mezenkimal kök hücre enjeksiyonunun kritik kemik defektlerinde ve kaynamamalarda başarılı olmadığını ve mezenkimal kök hücre uygulamasının iyileşmeye olumlu etkisinin olmadığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. Bu çalışmalarda mezenkimal kök hücrenin osteojenik dönüşümünün bozulmasının sebebi olarak erken dönem osteojenik etkiden sorumlu gen olan *Runx2* gen ekspresyonundaki bozulma gösterilmektedir (101). *Runx2*, osteoblastik gidişte Osterix ve WNT/ β - katenin yolunda yükseltim ile kemikleşmeyi sağlamaktadır (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Mezenkimal kök hücre ve osteoblastik yoldaki etkili moleküler ve genetik prekürsörler*

*Valenti, M., Dalle Carbonare, L., & Mottes, M. Osteogenic Differentiation in Healthy and Pathological Conditions. International Journal of Molecular Sciences (2016)

Bu genin aktive olamadığı in vitro çalışmalarda, osteojenik yolağın aktive olamadığı, kök hücre adiposit dönüşümün gözleendiği hayvan deneylerinde gösterilmiştir. Özellikle mezenkimal kök hücrenin adiposit veya osteoblast dönüşümü için gerekli olan sinyalinde Runx2 gen ekspresyonunun bozulmasının katkısı için literatüre bakıldığında, hipoksinin ve TNF-a seviyelerinin önemi bulunmaktadır. Hipoksik kalan kök hücrelerde gen transkripsiyonunun bozulması ile beraber osteoblastik dönüşüm kısıtlanmıştır (102).

Runx2 gen aktivasyonundaki ikinci önemli etkenimiz TNF-a seviyelerinin yüksek olması ile Runx2 gen ekspresyonunun azaldığını söyleyen birçok yayın bulunmaktadır (103-105). Ancak TNF-a seviyelerinin, eş zamanlı olarak mineralizasyonu arttırdığı, Alkalen Fosfataz seviyelerini arttırdığını ve kemikleşmeye yardımcı olduğunu söylenmeye başlamıştır (106). TNF-a üzerine yapılan çalışmalarda osteoblastik yolağı aktive ettiğine, kemikleşmeyi arttırdığını söyleyen yayınlar da mevcuttur. Bu yayınlarda düşük doz TNF-a seviyelerinin ters olarak Runx2 ve Osterix transkripsiyonu ile beraber Alkalen Fosfataz seviyelerini arttırdığı ve böylelikle osteojenik yolağın aktivasyonu sağlandığı söylenmektedir (107, 108). Aynı zamanda TNF-a, NK-Fβ aktivasyonu üzerinden BMP-2 translasyonunu arttırmaktadır (109). Süre olarak ta TNF-a seviyesinde 24 saatlik maruziyetinde osteoblastik dönüşümü arttırdığı vurgulanmaktadır (110). Bizim çalışmamıza benzer şekilde TNF-a ile beraber biyoçatı uygulamasında düşük doz TNF-a seviyelerinin osteoblastik dönüşümü bozduğu, ancak yüksek doz TNF-a seviyelerinin osteoblastogenezi arttırdığına dair sıçan çalışması da mevcuttur (111). Kümülatif dozda verilen mezenkimal kök hücrelerin anti-inflamatuar etkisi hem lokalize olarak hem de sistematik olarak gösterilmiştir (112). Kök hücreler bu anti inflammatuar etkisi ile beraber kallus dokusunda TNF-a seviyelerinde azalma yaratmaktadırlar. Bu durumda özellikle mezenkimal kök hücre ve osteojenik transformasyon bozularak kök hücre farklılaşması adipojenik yola doğru kaymıştır.

Bizim çalışmamızda bulduğumuz sonuç ta benzer bir şekilde mezenkimal kök hücreler biyoçatımız üzerinden adipojenik yola daha fazla kaymış ve kaynama ve yeni kemik doku oluşumu bozulmuştur. Bu durum aklımıza literatürde anlatılan benzer mekanizmanın aktive olması sorusunu getirmiştir. Ancak mezenkimal kök hücrelerin neden osteojenik formasyonunun görülemediğini tam olarak açıklayamamaktayız.

Yine bir diğer grubumuzda kök hücrelerimiz ile beraber PRP kombine ettiğimizde kaynamanın ve mineralizasyonun arttığını bulmuştuk. Kemik adacıklarının artmış olması, osteojenik formasyonun artmış olması, moleküler düzeyde sadece mezenkimal kök hücre verilen gruba göre bizim açımızdan anlamlıdır. Literatüre bakıldığı zaman PRP kullanımının kemik iyileşmesine etkisi anlamlı iyi olarak gösterilmektedir. Bu etkinin mekanizmasında, trombositlerde bulunan granüller içerisinde depolanan büyüme faktörlerinin, özellikle PDGF, VEGF, FGF, TGF β 1-2 bulunmaktadır (83). Bu büyüme faktörlerinin etkisi ile başarılı sonuçlar mevcuttur (113, 114). Biz de benzer bir sonuç bulmuş olduk. Bu sonucumuz literatürü bu açıdan desteklemektedir. Omentum ve PRP grubumuza baktığımız zaman histolojik yorumunuzda daha organize kemikleşme olduğunu göstermemize ve kontrol grubuna göre Salkeld Skorlaması'nda yüksek puanlama ile anlamlı fark bulmamıza rağmen izole hücreden arındırılmış omentum grubumuza göre anlamlı fark olmaması, kaynamayı daha fazla arttıramadığımızı düşünmemize yol açmıştır.

Radyolojik sonuçlarımız ise, histolojik sonuçlarımız ile koreledir. Sonuçlarımızdaki anlamlı farklılık yaratan gruplarımız izole omentum grubumuz ile beraber omentum ve PRP kombine gruplarımızdır. Bu gruplar kontrol ve omentum ve kök hücre kombinasyonu olan gruplarımız göre anlamlı olarak iyi puanlama alması, histolojik sonuçlarımıza benzerdir. Bu bulgumuzun çalışmamıza daha fazla güç kattığını düşünmekteyiz. Biyoçatımızın tamamen kemikleşmediği ve iyileşmenin radyografik olarak tamamen gösterilemediği akılda tutulmuştur. Ancak literatürde radyografik olarak tam iyileşme için ne kadar süre gerektiğine dair herhangi bir çalışma mevcut değildir.

Biyomekanik çalışmamızda, çökme yükü, eğilme dayanıklılığı, maksimum yük taşıma ve eğilme momentini ölçmek istedik. Böylece kaynamanın bu açılardan güç ölçülme planı yapıldı. Test için modelleme yapılırken üç noktadan basınç uygulayacak şekilde model planı yapıldı. Ancak teste başladığımızda Ulna ve Radius kemikleri distalden ve proksimalden füzyon halinde olduğundan dolayı beraber ölçüm yapıldı. Bu model üzerinden basıncı her iki kemiğe uygulamak zorunda olmamızdan ötürü radiusa izole basınç uygulamak mümkün olmadı. Kemik defekti doğası itibari ile radiusun ulnadan daha zayıf olmasına neden olduğundan ötürü, her iki kemiğe basınç uygulandığında biyomekanik olarak daha güçlü olan ulna kırılana kadar önkol

kemikleri direnç gösterdi ve hiçbir grupta kemik defekti olan radiusun ulnaya erişemediği görüldü. Radius kemiğinden ziyade, ulna kemiğinin biyomekanik olarak çökme yükü, eğilme dayanıklılığı, maksimum yük taşıma ve eğilme momenti ölçülebilmiş oldu. Çalışmamızın modellemesinde Radius kemiğinin izole olarak ölçülmesi gerektiği ve izolasyon için farklı bir modelleme yapılması gerektiği düşünüldü. Ancak literatürde modellemenin nasıl yapılacağı veya nasıl izole edileceğine dair herhangi bir çalışma mevcut değildir. Çalışmamızdan sonra, daha sonraki benzer çalışmalar için daha farklı bir biyomekanik modelleme yapılması ihtiyacı duyulmuştur.

Çalışmamızın en büyük kısıtlılığı, az sayıda örnek ile çalışılmış olmasıdır. Hayvan sayısının artırılması ile daha fazla anlamlı sonuçlar bulunabilir. Literatürde de benzer bir çalışma olmaması ve bizim çalışmamızda da başarılı sonuç alınması bu tür çalışmaların desteklenme ihtiyacını ortaya çıkarmıştır. Çalışmamızdaki bir kısıtlılığımız da kullanılan PRP'nin sıçandan üretilip kullanılmış olmasına rağmen kaynamayı arttırmak için kullandığımız mezenkimal kök hücrelerin insan kaynaklı olmasıdır. Bir diğer kısıtlılığımıza bakacak olursak porozite, mikro ve nano yapı yapı gibi biyoçatı tanımında ve teknik özelliğinde önem arz eden bir özelliği bizim çalışmamızda bakılamamış olması ileri dönem çalışmalarda bakılması ihtiyacını doğurmuştur. Yine çalışmamızın bir basamağı olan radyografik analizimizde anlamlı olarak fark çıkmasına rağmen tam iyileşmenin bulunamaması ve yapılan diğer biyoçatı çalışmalarında tam iyileşme için gerekli sürenin optimize edilememesi önemlidir. Umudumuz bu tür çalışmaların artması ile beraber optimal sürenin bulunması ve bu süreye göre değerlendirilme yapılmasıdır. Yine bir diğer kısıtlılığımız, biyomekanik çalışma modellememizde oluşan hatadır. Daha iyi bir modelleme ile uygun biyoçatının biyomekanik özelliklerinin ölçülebileceği inancındayız. Umut ediyoruz ki; bu biyoçatımız ile ilgili çalışmalar artar ve bizim başarılı olarak bulduğumuz hücreden arındırılmış omentum biyoçatımızı, özellikle kemik defektlerinde ortopedik cerrahi tedavi seçenekleri arasında görebiliriz.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Bu çalışmamızın sonucu olarak başlangıçta cevabını aradığımız sonuçlara şu cevapları bulduk;

1. Hücreden arındırılmış omentum biyoçatısı, kritik kemik defektlerinde kullanılabilecek uygun bir biyoçatıdır.
2. Kaynamayı arttırmak için biyoçatımız ile beraber kombine ettiğimiz mezenkimal kök hücreler tam tersine kaynamayı bozmuştur.
3. Kaynamayı arttırmak için biyoçatımız ile beraber kombine ettiğimiz PRP, histolojik olarak daha iyi kaynama sağlamıştır.
4. 6 haftalık iyileşme süresi, radyografik iyileşme için biyoçatımıza yeterli olmamıştır.

Çalışmamız ortopedik cerrahi literatüründe bu konuda yapılmış ilk çalışmadır ve biyoçatımız, kullanılabilecek uygun bir biyoçatıdır. Geliştirilmesi ve araştırılması gereken bir konudur. Çalışmada kullanılan mevcut markerlara sahip kök hücrelere sahip kök hücreleri canlı tutmak ile birlikte omentumda kemik diferansiyasyonu sağlayamamaktadır. Bu çalışmanın farklı allojenik ve otojenik kök hücreleri ile tekrar edilmesini önermekteyiz. Bize omentum biyoçatı hakkında daha fazla bilgi verecektir. Dolayısı ile yaptığımız çalışmaya benzer çalışmalar yapılmasını ve daha geniş çalışmalarda kullanılması gerektiğini önermekteyiz. Özellikle klinik çalışma yapılması ile omentum biyoçatının değerlendirilmesini önermekteyiz.

Gelecekte, birinci olarak omentum deselülerizasyonunun standardizasyonunu, ikinci olarak patent başvurusunun yapılmasını ve üçüncü olarak ta patent sonrası ürün olarak kullanımı açısından üretimini planlamaktayız.

7. KAYNAKLAR

1. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *Journal of clinical pathology*. 2008;61 (5):577-87.
2. Grabowski P. Physiology of bone. *Endocrine development*. 2009;16:32-48.
3. Rho J-Y, Kuhn-Spearing L, Zioupos P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical engineering & physics*. 1998;20 (2):92-102.
4. Lanyon LE. Osteocytes, strain detection, bone modeling and remodeling. *Calcified tissue international*. 1993;53 Suppl 1:S102-6; discussion S6-7.
5. Oreffo RO, Cooper C, Mason C, Clements M. Mesenchymal stem cells. *Stem cell reviews*. 2005;1 (2):169-78.
6. Aarden EM, Nijweide PJ, Burger EH. Function of osteocytes in bone. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;55 (3):287-99.
7. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell... and more. *Endocrine reviews*. 2013;34 (5):658-90.
8. Sims NA, Gooi JH, editors. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in cell & developmental biology*; 2008: Elsevier.
9. Jee W. Principles in bone physiology. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2000;1 (1):11-3.
10. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF- β /Smad signaling system. *The EMBO journal*. 2000;19 (8):1745-54.
11. Lee M-H, Kwon T-G, Park H-S, Wozney JM, Ryoo H-M. BMP-2-induced Osterix expression is mediated by Dlx5 but is independent of Runx2. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;309 (3):689-94.
12. Nauth A, McKee MD, Einhorn TA, Watson JT, Li R, Schemitsch EH. Managing bone defects. *Journal of orthopaedic trauma*. 2011;25 (8):462-6.

13. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *Journal of orthopaedic trauma*. 2017;31 Suppl 5:S20-s2.
14. Keating JF, Simpson AH, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2005;87 (2):142-50.
15. Sanders DW, Bhandari M, Guyatt G, Heels-Ansdell D, Schemitsch EH, Swiontkowski M, et al. Critical-sized defect in the tibia: is it critical? Results from the SPRINT trial. *Journal of orthopaedic trauma*. 2014;28 (11):632-5.
16. Gugala Z, Gogolewski S. Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *Journal of orthopaedic trauma*. 1999;13 (3):187-95.
17. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery*. 1990;1 (1):60-8.
18. Reichert JC, Epari DR, Wulschleger ME, Saifzadeh S, Steck R, Lienau J, et al. Establishment of a preclinical ovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16 (1):93-104.
19. Reichert JC, Saifzadeh S, Wulschleger ME, Epari DR, Schutz MA, Duda GN, et al. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research. *Biomaterials*. 2009;30 (12):2149-63.
20. Gomez-Barrena E, Rosset P, Lozano D, Stanovici J, Ermthaller C, Gerbhard F. Bone fracture healing: cell therapy in delayed unions and nonunions. *Bone*. 2015;70:93-101.
21. Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA. Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clinical orthopaedics and related research*. 1998 (355 Suppl):S41-55.
22. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annual review of cell and developmental biology*. 2000;16:191-220.

23. Bonnarens F, Einhorn TA. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 1984;2 (1):97-101.
24. Shapiro F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1988;70 (7):1067-81.
25. Slatter DH. *Textbook of small animal surgery*: Elsevier health sciences; 2003.
26. Kaderly RE. Primary bone healing. *Seminars in veterinary medicine and surgery (small animal)*. 1991;6 (1):21-5.
27. Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, Nicholls FH, Stapleton SN, Fitch JL, et al. Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. *The journal of histochemistry and cytochemistry: official journal of the Histochemistry Society*. 2006;54 (11):1215-28.
28. Perren SM. Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2002;84 (8):1093-110.
29. Einhorn TA. Clinical applications of recombinant human BMPs: early experience and future development. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;85-A Suppl 3:82-8.
30. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions: a prospective, randomized clinical trial comparing rhOP-1 with fresh bone autograft. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2001;83 (Pt 2):S151.
31. Kain MS, Einhorn TA. Recombinant human bone morphogenetic proteins in the treatment of fractures. *Foot and ankle clinics*. 2005;10 (4):639-50.
32. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42 (6):551-5.

33. Mandracchia VJ, Nelson SC, Barp EA. Current concepts of bone healing. *Clinics in podiatric medicine and surgery*. 2001;18 (1):55-77.
34. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36 (12):1392-404.
35. Ketenjian AY, Arsenis C. Morphological and biochemical studies during differentiation and calcification of fracture callus cartilage. *Clinical orthopaedics and related research*. 1975 (107):266-73.
36. Kanczler J, Oreffo R. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater*. 2008;15 (2):100-14.
37. Green E, Lubahn JD, Evans J. Risk factors, treatment, and outcomes associated with nonunion of the midshaft humerus fracture. *Journal of surgical orthopaedic advances*. 2005;14 (2):64-72.
38. Brinker MR, O'Connor DP, Monla YT, Earthman TP. Metabolic and endocrine abnormalities in patients with nonunions. *Journal of orthopaedic trauma*. 2007;21 (8):557-70.
39. Mauffrey C, Barlow BT, Smith W. Management of segmental bone defects. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2015;23 (3):143-53.
40. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European spine journal*. 2001;10 (2):S96-S101.
41. Albrektsson T, Branemark PI, Hansson HA, Lindstrom J. Osseointegrated titanium implants. Requirements for ensuring a long-lasting, direct bone-to-implant anchorage in man. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1981;52 (2):155-70.
42. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review. *Injury*. 2011;42 Suppl 2:S3-15.
43. Hertel R, Gerber A, Schlegel U, Cordey J, Ruegsegger P, Rahn BA. Cancellous bone graft for skeletal reconstruction. Muscular versus periosteal bed--preliminary report. *Injury*. 1994;25 Suppl 1:A59-70.

44. Loeffler BJ, Kellam JF, Sims SH, Bosse MJ. Prospective observational study of donor-site morbidity following anterior iliac crest bone-grafting in orthopaedic trauma reconstruction patients. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2012;94 (18):1649-54.
45. Bae H, Zhao L, Zhu D, Kanim LE, Wang JC, Delamarter RB. Variability across ten production lots of a single demineralized bone matrix product. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2010;92 (2):427-35.
46. Masquelet AC, Begue T. The concept of induced membrane for reconstruction of long bone defects. *The Orthopedic clinics of North America*. 2010;41 (1):27-37; table of contents.
47. Viateau V, Bensidhoum M, Guillemin Gv, Petite H, Hannouche D, Anagnostou F, et al. Use of the induced membrane technique for bone tissue engineering purposes: animal studies. *The Orthopedic clinics of North America*. 2010;41 (1):49-56; table of contents.
48. Chaddha M, Gulati D, Singh AP, Singh AP, Maini L. Management of massive posttraumatic bone defects in the lower limb with the Ilizarov technique. *Acta orthopaedica Belgica*. 2010;76 (6):811-20.
49. Papakostidis C, Bhandari M, Giannoudis PV. Distraction osteogenesis in the treatment of long bone defects of the lower limbs: effectiveness, complications and clinical results; a systematic review and meta-analysis. *The bone & joint journal*. 2013;95-b (12):1673-80.
50. El-Rosasy MA. Acute shortening and re-lengthening in the management of bone and soft-tissue loss in complicated fractures of the tibia. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2007;89 (1):80-8.
51. Zhen P, Hu YY, Luo ZJ, Liu XY, Lu H, Li XS. One-stage treatment and reconstruction of Gustilo Type III open tibial shaft fractures with a vascularized fibular osteoseptocutaneous flap graft. *Journal of orthopaedic trauma*. 2010;24 (12):745-51.

52. Cavadas PC, Landin L, Ibanez J, Nthumba P. Reconstruction of major traumatic segmental bone defects of the tibia with vascularized bone transfers. *Plastic and reconstructive surgery*. 2010;125 (1):215-23.
53. Bragdon BC, Bahney CS. Origin of Reparative Stem Cells in Fracture Healing. *Current osteoporosis reports*. 2018;16 (4):490-503.
54. Xing Z, Lu C, Hu D, Miclau T, 3rd, Marcucio RS. Rejuvenation of the inflammatory system stimulates fracture repair in aged mice. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2010;28 (8):1000-6.
55. Caplan AI, Correa D. The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell*. 2011;9 (1):11-5.
56. Utvag SE, Grundnes O, Reikeraos O. Effects of periosteal stripping on healing of segmental fractures in rats. *Journal of orthopaedic trauma*. 1996;10 (4):279-84.
57. Moore SR, Heu C, Yu NY, Whan RM, Knothe UR, Milz S, et al. Translating Periosteum's Regenerative Power: Insights From Quantitative Analysis of Tissue Genesis With a Periosteum Substitute Implant. *Stem cells translational medicine*. 2016;5 (12):1739-49.
58. Chang H, Docheva D, Knothe UR, Knothe Tate ML. Arthritic periosteal tissue from joint replacement surgery: a novel, autologous source of stem cells. *Stem cells translational medicine*. 2014;3 (3):308-17.
59. Schieker M, Seitz H, Drosse I, Seitz S, Mutschler W. Biomaterials as scaffold for bone tissue engineering. *European journal of trauma*. 2006;32 (2):114-24.
60. Sharma B, Elisseeff JH. Engineering structurally organized cartilage and bone tissues. *Annals of biomedical engineering*. 2004;32 (1):148-59.
61. Sundelacruz S, Kaplan DL, editors. *Stem cell-and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine*. *Seminars in cell & developmental biology*; 2009: Elsevier.

62. Hulbert SF, Young FA, Mathews RS, Klawitter JJ, Talbert CD, Stelling FH. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *Journal of biomedical materials research*. 1970;4 (3):433-56.
63. Freed LE, Vunjak-Novakovic G, Biron RJ, Eagles DB, Lesnoy DC, Barlow SK, et al. Biodegradable polymer scaffolds for tissue engineering. *Bio/technology* (Nature Publishing Company). 1994;12 (7):689-93.
64. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold design for bone regeneration. *Journal of nanoscience and nanotechnology*. 2014;14 (1):15-56.
65. Hunter G, Dickinson J, Herb B, Graham R. Creation of oxidized zirconium orthopaedic implants. *ASTM SPECIAL TECHNICAL PUBLICATION*. 2007;1471:16.
66. Staiger MP, Pietak AM, Huadmai J, Dias G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: a review. *Biomaterials*. 2006;27 (9):1728-34.
67. Lopez-Heredia MA, Sohier J, Gaillard C, Quillard S, Dorget M, Layrolle P. Rapid prototyped porous titanium coated with calcium phosphate as a scaffold for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2008;29 (17):2608-15.
68. Mohseni M, Jahandideh A, Abedi G, Akbarzadeh A, Hesaraki S. Assessment of tricalcium phosphate/collagen (TCP/collagene)nanocomposite scaffold compared with hydroxyapatite (HA) on healing of segmental femur bone defect in rabbits. *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. 2018;46 (2):242-9.
69. Yoon DM, Fisher JP. Natural and synthetic polymeric scaffolds. *Biomedical Materials*: Springer; 2009. p. 415-42.
70. Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, et al. Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: a review. *Polymers*. 2016;8 (4):115.
71. Villa MM, Wang L, Huang J, Rowe DW, Wei M. Bone tissue engineering with a collagen–hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2015;103 (2):243-53.

72. Meagher MJ, Weiss-Bilka HE, Best ME, Boerckel JD, Wagner DR, Roeder RK. Acellular hydroxyapatite-collagen scaffolds support angiogenesis and osteogenic gene expression in an ectopic murine model: Effects of hydroxyapatite volume fraction. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2016;104 (9):2178-88.
73. Saltz R, Stowers R, Smith M, Gadacz TR. Laparoscopically harvested omental free flap to cover a large soft tissue defect. *Annals of surgery*. 1993;217 (5):542.
74. Micheau P. [The greater omentum. Its role in reconstructive plastic surgery]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 1995;40 (2):192-207.
75. Porzionato A, Sfriso M, Macchi V, Rambaldo A, Lago G, Lancerotto L, et al. Decellularized omentum as novel biologic scaffold for reconstructive surgery and regenerative medicine. *European journal of histochemistry: EJH*. 2013;57 (1).
76. Masuda T, Furue M, Matsuda T. Novel strategy for soft tissue augmentation based on transplantation of fragmented omentum and preadipocytes. *Tissue engineering*. 2004;10 (11-12):1672-83.
77. Yow KH, Ingram J, Korossis SA, Ingham E, Homer-Vanniasinkam S. Tissue engineering of vascular conduits. *The British journal of surgery*. 2006;93 (6):652-61.
78. Soffer-Tsur N, Shevach M, Shapira A, Peer D, Dvir T. Optimizing the biofabrication process of omentum-based scaffolds for engineering autologous tissues. *Biofabrication*. 2014;6 (3):035023.
79. Sommeling CE, Heyneman A, Hoeksema H, Verbelen J, Stillaert FB, Monstrey S. The use of platelet-rich plasma in plastic surgery: a systematic review. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery: JPRAS*. 2013;66 (3):301-11.
80. Alsousou J, Ali A, Willett K, Harrison P. The role of platelet-rich plasma in tissue regeneration. *Platelets*. 2013;24 (3):173-82.
81. Intini G. The use of platelet-rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*. 2009;30 (28):4956-66.

82. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry*. 2001;10 (4):225-8.
83. Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2013;133 (2):153-65.
84. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, et al. Platelet-rich preparations to improve healing. Part I: workable options for every size practice. *The Journal of oral implantology*. 2014;40 (4):500-10.
85. Kececi Y, Ozsu S, Bilgir O. A cost-effective method for obtaining standard platelet-rich plasma. *Wounds: a compendium of clinical research and practice*. 2014;26 (8):232-8.
86. Zou J, Yuan C, Wu C, Cao C, Yang H. The effects of platelet-rich plasma on the osteogenic induction of bone marrow mesenchymal stem cells. *Connective tissue research*. 2014;55 (4):304-9.
87. Tajima S, Tobita M, Orbay H, Hyakusoku H, Mizuno H. Direct and indirect effects of a combination of adipose-derived stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration. *Tissue engineering Part A*. 2015;21 (5-6):895-905.
88. Yun JH, Han SH, Choi SH, Lee MH, Lee SJ, Song SU, et al. Effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on bone regeneration for osseointegration of dental implants: preliminary study in canine three-wall intrabony defects. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2014;102 (5):1021-30.
89. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert opinion on biological therapy*. 2016;16 (2):213-32.
90. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clinical orthopaedics and related research*. 1994 (301):302-12.

91. Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD. The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2001;83-a (6):803-16.
92. Ghassemi T, Shahroodi A, Ebrahimzadeh MH, Mousavian A, Movaffagh J, Moradi A. Current Concepts in Scaffolding for Bone Tissue Engineering. *The archives of bone and joint surgery*. 2018;6 (2):90-9.
93. Moradi A, Ataollahi F, Sayar K, Pramanik S, Chong PP, Khalil AA, et al. Chondrogenic potential of physically treated bovine cartilage matrix derived porous scaffolds on human dermal fibroblast cells. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2016;104 (1):245-56.
94. Chang H, Docheva D, Knothe UR, Knothe Tate ML. Arthritic periosteal tissue from joint replacement surgery: a novel, autologous source of stem cells. *Stem cells translational medicine*. 2014;3 (3):308-17.
95. Li H, Dai K, Tang T, Zhang X, Yan M, Lou J. Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;356 (4):836-42.
96. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;354 (2):453-8.
97. Hayashi O, Katsube Y, Hirose M, Ohgushi H, Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcified tissue international*. 2008;82 (3):238-47.
98. de Girolamo L, Lucarelli E, Alessandri G, Avanzini MA, Bernardo ME, Biagi E, et al. Mesenchymal stem/stromal cells: a new "cells as drugs" paradigm. Efficacy and critical aspects in cell therapy. *Current pharmaceutical design*. 2013;19 (13):2459-73.
99. Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A nano-hydroxyapatite--pullulan/dextran polysaccharide composite

- macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2013;34 (12):2947-59.
100. Duarte Campos DF, Blaeser A, Weber M, Jakel J, Neuss S, Jahnen-Dechent W, et al. Three-dimensional printing of stem cell-laden hydrogels submerged in a hydrophobic high-density fluid. *Biofabrication*. 2013;5 (1):015003.
 101. Kawane T, Qin X, Jiang Q, Miyazaki T, Komori H, Yoshida CA, et al. Runx2 is required for the proliferation of osteoblast progenitors and induces proliferation by regulating Fgfr2 and Fgfr3. *Scientific reports*. 2018;8 (1):13551.
 102. Dalle Carbonare L, Matte A, Valenti MT, Siciliano A, Mori A, Schweiger V, et al. Hypoxia-reperfusion affects osteogenic lineage and promotes sickle cell bone disease. *Blood*. 2015;126 (20):2320-8.
 103. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, et al. Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor-alpha. *Endocrinology*. 2000;141 (11):3956-64.
 104. Gilbert L, He X, Farmer P, Rubin J, Drissi H, van Wijnen AJ, et al. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2alpha A) is inhibited by tumor necrosis factor-alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277 (4):2695-701.
 105. Abbas S, Zhang YH, Clohisy JC, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor-alpha inhibits pre-osteoblast differentiation through its type-1 receptor. *Cytokine*. 2003;22 (1-2):33-41.
 106. Ding J, Ghali O, Lencel P, Broux O, Chauveau C, Devedjian JC, et al. TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life sciences*. 2009;84 (15-16):499-504.
 107. Huang H, Zhao N, Xu X, Xu Y, Li S, Zhang J, et al. Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell proliferation*. 2011;44 (5):420-7.
 108. Glass GE, Chan JK, Freidin A, Feldmann M, Horwood NJ, Nanchahal J. TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation

- of muscle-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2011;108 (4):1585-90.
109. Cho HH, Shin KK, Kim YJ, Song JS, Kim JM, Bae YC, et al. NF-kappaB activation stimulates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue by increasing TAZ expression. *Journal of cellular physiology*. 2010;223 (1):168-77.
 110. Lu Z, Wang G, Dunstan CR, Zreiqat H. Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha enables human osteoblasts to direct adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into osteogenic differentiation. *Stem cells and development*. 2012;21 (13):2420-9.
 111. Mountziaris PM, Tzouanas SN, Mikos AG. Dose effect of tumor necrosis factor-alpha on in vitro osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells on biodegradable polymeric microfiber scaffolds. *Biomaterials*. 2010;31 (7):1666-75.
 112. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baghaban Eslaminejad M. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *Cells, tissues, organs*. 2017;204 (2):59-83.
 113. Turhan E, Akca MK, Bayar A, Songur M, Keser S, Doral MN. A comparison of the effects of platelet-rich plasma and demineralized bone matrix on critical bone defects: An experimental study on rats. *Ulusal travma ve acil cerrahi dergisi = Turkish journal of trauma & emergency surgery: TJTES*. 2017;23 (2):91-9.
 114. Thor A, Franke-Stenport V, Johansson CB, Rasmusson L. Early bone formation in human bone grafts treated with platelet-rich plasma: preliminary histomorphometric results. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2007;36 (12):1164-71.