

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**PERİOST VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEMELLİ DEĞİŞİK
HÜCRELERİN KIRIK İYİLEŞMESİNDE DENEYSEL
KARŞILAŞTIRMASI**

DR. CİHANGİR TÜREMİŞ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR -2021

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ
ANABİLİM DALI

**PERİOST VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE TEMELLİ DEĞİŞİK
HÜCRELERİN KIRIK İYİLEŞMESİNDE DENEYSEL
KARŞILAŞTIRMASI**

DR. CİHANGİR TÜREMİŞ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Prof. Dr. HASAN HAVİTÇIOĞLU

ÖNSÖZ

Dokuz Eylül Üniversitesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı'nda Haziran 2015'de başlayıp, devam eden uzmanlık eğitimimde katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Haluk BERK ve değerli hocalarım Prof. Dr. Osman KARAOĞLAN, Prof. Dr. İzge Hakan GÜNAL, Prof. Dr. Hasan TATARİ, Prof. Dr. Vasfi KARATOSUN, Prof. Dr. Mustafa ÖZKAN, Prof. Dr. Can KOŞAY, Prof. Dr. Ömer AKÇALI, Prof. Dr. Kadir BACAKOĞLU, Prof. Dr. Mehmet ERDURAN, Doç. Dr. Onur HAPA, Doç. Dr. Ahmet KARAKAŞLI, Doç. Dr. Safa SATOĞLU, Doç. Dr. Onur BAŞÇI ve Uzm. Dr. Onur GÜRSAN'a

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin hazırlanmasında değerli bilgi ve deneyimleriyle bana her konuda yardımcı olan, Biyomekanik Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda çalışma imkanı veren tez danışmanım, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve Biyomekanik Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Hasan HAVİTÇIOĞLU'na,

Tezimde kullanılan doku iskelelerinin geliştirilmesinde ve karakterizasyonlarında emeği geçen Doç. Dr. Aylin ZİYLAN'a ve Dr. Oylum ÇOLPANKAN GÜNEŞ'e; histolojik değerlendirmeleri gerçekleştiren Prof. Dr. Ülker CANKURT'a, doktora öğrencisi Selma AYDEMİR'e ve biyomekanik testlerin yürütülmesi ve yorumlanmasında destek olan doktora öğrencisi Buğra HÜSEMOĞLU'na in vitro çalışmaların gerçekleştirilmesinde yardımcı olan doktora öğrencisi Gizem BAYSAN'a, in vivo testler esnasında yardımlarını esirgemeyen Arş. Gör. Nelo LİMA'a ve Arş. Gör. Selahaddin AYDEMİR'e

Uzmanlık eğitimim süresince, neredeyse tüm zamanımı birlikte geçirdiğim, birçok unutulmaz anıyı paylaştığım tüm asistan abilerim ve kardeşlerime, servis ve ameliyathanedeki hemşire, personel ve teknisyen arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca her an yanımda olan ve bu günlere gelmemde en büyük pay sahibi sevgili annem ve babam Şükran-Arslan TÜREMİŞ'e ve kardeşim Canan GELMEZ'e ve sonradan ailemizin üyesi olan eşi Halil GELMEZ'e,

Sonradan üyesi olduğum o güzel aileye Ayşen-Erkan ERKUL'a, Sedat ALTINEL'e

Uzmanlık eğitimimde bana ileri görüşlülüğünü gösteren, hoş görü vefakarlığını esirgemeyen canım eşim

Bengü ERKUL TÜREMİŞ'e

Sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

CIHANGİR TÜREMİŞ

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	iii
ŞEKİL VE GÖRÜNTÜ DİZİNİ	iv
GRAFİK LİSTESİ	iv
KISALTMALAR	v
1.ÖZET	vi
2. ABSTRACT	viii
3. GİRİŞ ve AMAÇ	1
4.GENEL BİLGİLER	3
4.1. Kemik Anatomisi:	3
4.2 Kemik Doku ve Histolojisi:	3
4.3. Kemik tipleri:	5
Kemik tipleri ikiye ayrılır:	5
4.4 Kemik Oluşumu:	6
.....	8
4.5. Kemik Fizyolojisi:	8
4.5.1. Kırık Tanımı Tipleri:	9
4.6. KIRIK KAYNAMASI	12
4.6.1. Kemik İyileşme Evreleri:	12
4.6.2. İnflamatuar (Hematom) Dönem (1–4 gün):	13
4.6.3. Onarım Dönemi (2- 40 gün):	14
4.6.4 Kemiğin Yeniden(Remodelling) Şekillenme Dönemi:	15
4.7. Alçı ve Atelleme:	18
4.8. Açık redüksiyon internal fiksasyon:	18
4.9. İntramedüller çiviler:	19
4.10. Eksternal fiksatörler:	19
4.11. Kemik Doku Mühendisliği ve Kullanılan biyomalzemeler:	20
4.12. Tezde kullanılan malzemelerin listesi	21
5. GEREÇ YÖNTEM:	23
5.1. Karboksimetil Kitosan (CMChT) Çözeltilisinin Hazırlanması:	23
5.2. Lif Kabağı Hazırlanması:	23
5.3. Hidrojel İskele Üretimi:	24

5.4. Doku İskelelerin Karakterizasyonu:	24
5.5. İskelelerin Ön Biyouyumluluk Analizleri	25
5.5.1. Hücrelerin İstenilen Sayıya Ulaştırılması	25
5.5.2. Doku İskelelerinin Hücrelendirilmesi:	25
5.5.3. Canlılık ve Proliferasyon:	26
5.5.4. Hücre Morfolojisi Analizi:	26
5.6. Doku İskelelerinin Kemik İliği ve Periosttan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücreler İle Biyouyumluluk Analizlerinin Gerçekleştirilmesi	26
5.6.1 Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu:	26
Periost Eldesi ve Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu:	26
Kemik İliği Eldesi ve Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu:	27
Mezenkimal Kök Hücre'lerin Karakterizasyonları:	27
5.6.3. Canlılık analizi	28
5.6.4. Hücre Tutunması	28
5.6.5 Alkalen Fosfataz (ALP) Analizi:	29
5.6.6. Histokimyasal incelemeler	29
5.6.7. İmmünohistokimyasal incelemeler	29
5.7. Deney Hayvanlarında Femur Kırık Modeli Oluşturulması ve İyileşme Takibi:	29
5.7.1. Deney Hayvanlarında Kırık Hattı Oluşturulması ve Fiksasyonu	30
5.7.2. Doku İskelelerinin İmplantasyonu	31
5.7.3. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonları:	31
5.7.4. Deney Hayvanlarından Elde Edilen Dokuların Biyomekanik Analizleri:	32
5.7.5 Radyolojik Değerlendirme	33
5.7.6 Histolojik incelemeler:	33
5.12.8. İstatistiksel Analiz	34
6. BULGULAR:	35
6.1. Doku İskelelerinin Oluşturulması:	35
6.3. Doku İskelelerinin HDF ile ön Biyouyumluluk Analizleri	38
Canlılık analizi	38
Farklılaşma analizleri:	40
6.3.3. Hücre Tutunması:	42
6.3.4 Histokimyasal incelemeler:	44
6.3.5. Doku İskelelerinin in vivo Biyouyumluluk Analizleri:	44
6.3.6. Radyolojik Değerlendirme	44
7.TARTIŞMA:	47
8.SONUÇLAR VE ÖNERİLER:	55
9. KAYNAKÇA	56

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Biyomalzemeler

Tablo 2: Scaffold basma testi ile dayanıklılık – elastik modulus ölçümleri

Tablo 3: BM-MSK Per-MSK Hücrelerin 7, 14, 21 ve 28. Günlerinin karşılaştırılması

Tablo 4: BM-MSK ve Per-MSK hücrelerinde yapılan ALP analizi sonuçları



GRAFİK LİSTESİ

Grafik-1: Doku iskelerinin şişme testi

Grafik-2: HDF WST-1 Analizi

Grafik 3: BM-MSC ve Per-MSC WST-1 Proliferasyon analizi

Grafik 4: BM-MSC ve Per-MSC hücrelerinde yapılan ALP analizi sonuçları

Grafik 5: Grupların in vivo biyomekanik analizi

Doku iskelelerinin karakterizasyonunda FTIR analizi sonuçları; **a.** Sünger yoğunluklu kısım **b.** HAp yoğunluklu kısım



ŞEKİL VE GÖRÜNTÜ DİZİNİ

Şekil-1: Havers sistemi

Şekil-2: İntramembranöz Kemikleşme

Şekil-3: Enkondral Kemikleşme

Şekil-4: Kırık oluştuğu zaman travmanın kendine ve kırığın oluş mekanizmasına özgü belirti ve bulgular gözlemlenir

Şekil-5: Kırık İyileşme evreleri

Şekil-6: Karboksi metil kitosan formülü

Şekil-7: Doku iskelesi

Şekil-8: Ratların Kirschner teli ile yapılan osteotomu sonrası fiksasyonu

Şekil-9: Shimadzu cihazında testleri yapıldı

Şekil-10: Lif kabağı (a) soyulmuş ve işlenmemiş ve (b) yıkama işleminden sonraki hali

Şekil-11: Direkt grafi ile 4 gruptaki iyileşme görünümü

Şekil-12: Shimadzu cihazında testleri yapıldı

Şekil-13: Doku iskelelerinin karakterizasyonunda FTIR analizi sonuçları; a. Sünger yoğunluklu kısım b. HAp yoğunluklu kısım

Şekil-14: Taramalı elektron Mikroskobu Görüntüsü a. Sünger yoğunluklu yapı b. HAp yoğunluklu yapısı

Şekil-15: Primer kültürün 14. Gününde (a) kemik iliği (b) periost kökenli kök hücrelerin görüntüsü

Şekil-16: (a) Adipojenik (Oil Red O), (b) Kondrojenik (Alcian Blue) (c) Osteojenik (Alizarin Red S) farklılaşmaların histolojik boyamalar sonucu kemik iliği kökenli kök hücrelerde inverted mikroskop ile gösterilmesi (20x büyütme ile)

Şekil-17: (a) Adipojenik (Oil Red O), (b) Kondrojenik (Alcian Blue) (c) Osteojenik (Alizarin Red S) farklılaşmaların histolojik boyamalar sonucu periost kökenli kök hücrelerde inverted mikroskop ile gösterilmesi (20x büyütme ile)

Şekil-18: a. kemik iliği ve b. periost kökenli doku iskelelerinde 7. Ve 28. Günde Taramalı Elektron Mikroskobunda Görüntüleri

Şekil-19: Direkt grafi ile 4 gruptaki iyileşme görünümü

Şekil-20: Mikro-CT ile deney gruplarına yapılan değerlendirme

KISALTMALAR

MKH: Mezenkimal kökenli hücre

CMChT: Karboksimetil kitosan

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

HAp: Hidroksiapatit

PEGDE: Polietilenglikol

ECM: Hücre dışı matrisini

DMEM: Dulbecco Modifiye Kartal Ortamı

PBS: Fosfat tamponlu salin

FTIR: Fourier transform kızılötesi spektroskopisi

Ege Matal: Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi

BM-BMC: Kemik iliği kökenli mezenkimal hücreler

Per-MSc: Periosttan köken alan mezenkimal hücreler

1.ÖZET

Periost ve Mezenkimal Kök Hücre Temelli Değişik Hücrelerin Kırık İyileşmesinde Deneysel Karşılaştırması

Dr. Cihangir TÜREMİŞ
Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi
Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı
İZMİR

Kemik dokusu organik ve inorganik bileşenlerin oluşturduğu yapıdır. Kemik dokusu ile ilgili problemlerin başında kırıklar yer almaktadır. Kemik kırıkları günlük yaşam aktivitelerini etkileyen önemli sağlık sorunlarından biridir. Kırığın kaynaması ve rehabilitasyon süreci çeşitli sebeplerden dolayı uzun zaman almaktadır. Bu durum iş gücü kaybı, maliyetin artmasına ve yaşam konforunda düşüş gibi sonuçlar doğurmaktadır. Kemik kırıklarında kaynamada gecikme, kaynamama durumları ve enfeksiyon gibi yan etkiler görülmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalar ortopedi cerrahlarını hücrelerel tedavi ve biyomalzeme alanına yönlendirmektedir. Literatür taraması sonucunda mezenkimal kök hücre ile doku iskelesi beraber kullanılan ve hasarlı dokuyu tedavi etmeyi hedefleyen çalışmalar kısıtlıdır. Kullanılan malzemelerin biyouyumluluğu, kullanılan yerde absorbe olması, osteokondüktif olması gibi özellikler aranmaktadır.

Bu çalışmada üretimi ve in vitro karakterizasyonları tamamlanan lif kabağı-karboksümetil kitosan (CMChT)-hidroksiapatit (HAp) doku iskelelerinin in vivo olarak sıçanlarda dört grup altında kırık iyileşmesi araştırılmıştır. Rastgele olarak 12' şerli gruplara ayrılan 48 adet Wistar Albino rat üzerinde çalışma tamamlanmıştır. Birinci grup(n=12), olan kontrol grubunda; femur orta shaftından osteotomi yaparak periost sıyrılmadan Kirshner teli ile intramedüler fiksasyon yapılmıştır. İkinci grup (n=12) olan doku iskelesinin in vivo biyouyumluluğunun ölçüldüğü grupta; kırık oluşturulduktan sonra periost sıyrılarak hücre sadece doku iskelesi implante edilerek kırık fiksasyonu yapılmıştır. Üçüncü grupta (n=12), ratlardan elde edilen kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ile hücrelendirilen doku iskeleleri kırık oluşturularak periostun sıyrıldığı kırık bölgesine yerleştirilerek fiksasyon sağlanmıştır. Son grupta (n=12) ise, ratlardan elde edilen periost kökenli mezenkimal kök hücreler ile hücrelendirilen doku iskeleleri

kırık oluşturulmuş periostun sıyrıldığı kırık hattına uygulanarak fiksasyon sağlanmıştır. Operasyonlardan sonra 8 hafta yaşatılan ratlar yüksek doz anestezi uygulanarak kurban edilmiştir. Deneklerden eksizye edilen dokularda; biyomekanik, radyolojik ve histolojik analizler gerçekleştirilmiştir.

Sonuç olarak, oluşturduğumuz kemik iliği ve periost kökenli kök hücrelerinin HAp + Lif kabağı+ CMChT temelli doku iskelelerinin; yaptığımız in vitro ve in vivo çalışmalarla, biyoyumlu olduğu ve kemik doku mühendisliğinde özellikle kırık iyileşmesine iyi bir alternatif olacağı gösterilmiştir. Kemik iliği ve periost kökenli hücreler kıyaslandığında in vitro ve in vivo deneyler sonucunda kemik iliği kökenli hücrelerin ekildiği doku iskelelerinin osteokondüktif özelliklerinin daha iyi olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Lif kabağı, Kitosan, Hidroksiapatit, Deney Hayvan Modeli, Kemik Doku Mühendisliği*

2. ABSTRACT

Comparison of Fracture Healing from Periosteum and Bone Marrow Derived Stem Cells Experimentally

Bone tissue is the structure of organic and inorganic components. Problems with bone tissue fractures are present. Bone fractures are one of the important health problems that affect daily life activities. The fractures union and rehabilitation process takes a long time due to various reasons. This is the loss of labor, results in an increase in costs and a decrease in living comfort. Side effects such as delaying in union in bone fractures, nonunion of the bone, infections are seen.

Recent studies have brought orthopedic surgeons to cellular therapy and biomaterials. As a result of the literature review, the studies in which mesenchymal stem cell and tissue scaffold were used together aiming to treat damaged tissue are limited. The biocompatibility of the materials used properties such as being absorbed on the ground and being osteoconductive are sought.

In this study; Loofah- carboxymethyl chitosan (CMCh)- whose production and in vitro characterization were completed. Fracture healing of hydroxyapatite (HAp) scaffolds in vivo in rats under four groups was investigated. The study was completed on 48 Wistar Albino rats randomly divided into 12 groups. In the first group (n=12), which was the control group; with Kirshner wire without stripping the periosteum by osteotomy from the mid shaft of the femur intramedullary fixation was performed. In the second group (n=12), in vivo biocompatibility of the scaffold, was measured. After the fracture has been made, the periosteum is stripped and the cell is only implanted with a scaffold for fracture fixation. In the third group (n=12), bone marrow-derived mesenchymal stem cells obtained from rats were cellular tissue scaffolds are fixed by creating a fracture and placing them on the fracture area where the periosteum is stripped. In the last group (n=12), cells with periosteal origin mesenchymal stem cells obtained from rats, tissue scaffolds were applied to the fracture line where the periosteum was stripped for fixation. The rats, which were kept alive for 8 weeks after the operations, were sacrificed by applying high-dose anesthetic. In the tissues; biomechanical, radiological and histological analyzes were performed.

As a result, our in vitro and in vivo studies show that HAp + Loofah + CMCh of bone marrow and periosteal stem cells based scaffolds, which is biocompatible and it has been shown

to be a good alternative to fracture healing engineering. When the bone marrow and periosteal origin cells are compared, as a result of in vitro and in vivo experiments, the tissue in which bone marrow-derived cells are cultivated were better in terms of the osteoconductive properties of the scaffolds.

Keywords: *Loofah, Chitosan, Hydroxyapatite, Animal Model, Bone Tissue Engineering*



3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kırık, herhangi bir nedenle kemik bütünlüğünün tam ya da kısmi olarak bozulmasıdır. Kırıklar, tarihin en eski dönemlerinden beri tıbbi bir problem olarak göze çarpmıştır. Hipokrat'ın tıbbi çalışmalarında da kırıkların tedavisi önemli bir yer almıştır. Günümüzde yüksek enerjili kırıkların yanı sıra artan ömür süresi nedeniyle yaşlı kırıklarının da arttığı gözlemlenmiştir. Bu nedenle kırık iyileşmesi deneysel ve klinik çalışmaları yoğunlaşmıştır. Ortopedi ve Travmatoloji genelinde kırıklar; sık karşılaşılan yaralanmalardandır. Hastaların beklentilerinin de artması sebebiyle, gerekli cerrahi ya da konservatif tedavinin yapılarak mümkün olan en hızlı şekilde kırık iyileşmesinin sağlanması ve hastanın erken mobilizasyonu önem taşır.

Kırık iyileşmesinin gecikmesi ya da kırığın kaynamaması tedavi güçlüğüne beraberinde getirmektedir. Bu durum çoğunlukla hastalar için kronik fonksiyonel ve fizyolojik bozukluklar, stres ve ekonomik kayıplara yol açmaktadır.(1) Kırık iyileşmesini hızlandırabilen etkili, güvenilir ve ucuz maliyetli ajanların geliştirilmesi kırık tedavisinde yeni yollar açabilir.(2) Bu durum bize kırık sağaltımının en hızlı ve en kolay yöntemlerle gerçekleştirilmesinin ne derece önemli olduğunu düşündürmektedir.

Kırık iyileşmesi; kemikten, periosttan ve çevre yumuşak dokulardan sitokin ve haberci inflamasyon hücrelerinden gelen sinyallerle gelen kanın kırık alanına birikmesiyle başlar(3). Bu dönem hematoma fazı olarak tanımlanır ve bir iki gün kadar sürer. Kırık iyileşmesi için gerekli inflammatuar mediatörler, büyüme faktörleri ve fibroblastlar bu kanama sayesinde kırık bölgesinde yer alırlar. Kanlanma ve periost dokusunun hasar miktarı iyileşmede önemli bir yer tutar(3)(4).

Birçok nedene bağlı olarak kırık iyileşmesinde gecikme(nonunion) veya psödoartroz görülebilmektedir. Bu nedenler arasında yaş, kullanılan ilaçlar, genetik rahatsızlıklar, beslenme yetersizlikleri gibi birçok etken olabilir. Ayrıca periost da kırık iyileşmesinde önemli bir yer tutar. Periost ameliyat sırasında korunmaya çalışılsa da zarar gördüğü durumlarda tam olarak tamiri yapılamamaktadır. Periost hasarı ve kırık iyileşmesindeki gecikme arasındaki korelasyon literatürde mevcuttur(5)(6). Literatürde doku mühendisliği temelli bazı periost çalışmaları da mevcuttur(7)(8). Ancak, hem kaynamama problemi olan vakaların tedavilerine alternatif bir tedavi imkanı verebilecek kemik dokusuna uygun biyomalzemeler kullanılarak üretilen yeni bir kemik doku iskelesi tasarımının in vitro ve in vivo olarak araştırılmasını, hem de kemik iliği ve periosttan elde edilen iki farklı kökenli kök hücrenin kemik iyileşmesi üzerine etkinliğini

kıyaslamayı hedefleyen doku mühendisliği çalışmaları kısıtlıdır. Biz de bu çalışma ile bu duruma alternatif oluşturmayı amaçladık.

Son yıllarda doku mühendisliği tekniklerinin gelişmesi sayesinde kök hücre tedavilerinin kemik yenilenmesi amacıyla kullanılmaya başlandığı bilinmektedir. Çoğunlukla kemik iliği ve yağ doku kaynaklı mezenkimal kök hücre

(MKH) uygulamaları kullanılmakla beraber, yapılmış olan çalışmalar göstermektedir ki periosttan elde edilen MKH'ler içeriğinde bulunan enzimler sayesinde kemik doku iyileşmesine daha çok katkı sağlamaktadır(9). Biz de planlanan çalışmamızda, doku mühendisliği tekniklerinden yararlanarak hem kaynamama problemi olan vakaların tedavilerine yeni bir bakış açısı oluşturmayı, hem de kemik iliği ve periosttan elde edilen iki farklı kökenli kök hücrenin etkinliğini kıyaslamayı hedefledik.

Çalışmamızda üretilecek olan doku iskelesinin yapısında kullanılacak olan lif kabağı, nanohidroksi apatit, karboksimetil kitosan gibi malzemeler ile doku iskelelerinin uygulanacağı gruplarda daha iyi sonuçlar alındığı önceki çalışmalarda görülmektedir. Bu amaçla, kemik doku iskelelerinin periosttan ve kemik iliğinden ayrı ayrı elde edilen MKH ile birlikte uygulanmasıyla kaynamama veya geç kaynama problemine çözüm bulmayı hedefliyoruz. Ayrıca, periost ve kemik iliğinden kök hücre izolasyon yöntemlerini geliştirmek ve kök hücre tedavilerine yeni bir yaklaşım getirilmesini amaçladık. İyileşmeyen kemik kırıklarında, iyileşme süresini kısaltmak ve iyileşme oranını arttırmak, böylece yüzbinlerce kişinin günlük hayatına erkenden dönmesini sağlayarak dolaylı yoldan ülke ekonomisine de katkı sağlamak temel hedeflerimizdendir. Çalışmamızın sonucunda, hastaların günlük yaşantısına daha erken dönmesini sağlayarak iş gücü kaybını azaltmak, toplum ve sanayi alanlarına yarar sağlanması planlanmaktadır. Ayrıca, özel olarak geliştirilecek doğal doku iskelesi ile gerçekleştirilecek olan uygulamaların ilerleyen dönemlerde de geliştirilmesi halinde, dünya çapında ticarileştirilmesi ve sonucunda hem pek çok insana fayda sağlanması hem de ülke ekonomisine katkıda bulunmasını hedeflemekteyiz.

4.GENEL BİLGİLER

4.1. Kemik Anatomisi:

Kemik embriyolojik olarak mezenşimal hücrelerden köken alır. Yapısı ve içeriği kişinin yaşına, bulunduğu yere ve mekanik özelliklerine bağlı olarak değişmektedir. İnsan vücudunun en sert dokularından biridir. Kemikğin gerilim direnci yani sertliği yüksek olmasına karşın; sertliğinden beklenilmeyecek derecede hafif ve esnektir. İskelet sisteminin görevleri arasında yumuşak dokulara desteklik sağlamak da vardır. İç organlara koruma görevi görür, hemoglobin yapımında önemli rol üstlenir.(10) Kemik; birçok hücreden oluşan, metabolik ve biyolojik yönden aktif bir dokudur. Bu özelliği dikkate alındığında büyümesi ve iyileşmesi birçok biyomekanik, biyokimyasal, hücresel, hormonal ve patolojik olayların zincirleme reaksiyonuna bağlı olarak gelişir.(11)

4.2 Kemik Doku ve Histolojisi:

Kemik dokusu mineralize matriksi nedeniyle vücudun sert dokularındandır. Kaslarla beraber oluşturduğu kaldıraç sistemleri ile hareketi sağlar. Hormonal ve mekanik uyarılara karşı dinamik olarak yapısı değişim içerisinde. Kalsiyum, fosfor, magnezyum ve diğer mineralleri içerir.(12) Aynı zamanda hematopoetik ve mezenkimal kök hücreleri içerir.(12) Vücutta önemli miktarda kanlanması mevcuttur.

Kemik dokusu yukarıda da belirttiğimiz gibi sert bir doku olmasına karşın hafif ve esnek olması nedeniyle etki altında kaldığı kuvvete bağlı olarak şekil ve yapısını değiştirebilir.Kemik dokuda nadir de olsa hücreler bulunmaktadır. Bunlar arasında:

Osteoprogenitör hücreler; osteojenerik hücreler de denilebilir. Kemikğin periosteum ve endosteneum tabakalarında damar çevresinde perisit olarak yer alan kemik hücresinin öncü hücreleri olup mezenkimal kökenlidir(13). Yeni kemik yapımı ve kırıkların iyileşmesi sırasında osteoblastlara dönüşümü söz konusudur.

Osteoblastlar; ostejenik hücrelerden köken alırlar. Kemik yapımından sorumludur. Kemik dokusunda mineralize olmamış organik matriksin yapımından sorumludurlar(14). İçerdikleri endoplazmik retikulum, golgi cisimciği ve mitokondrileri diğer kemik hücrelerinden daha fazladır. Osteoblastlar parathormon reseptörlerine sahip olup; kemik rezorpsiyonunu düzenlerler.(15) Matriksin mineralizasyonunda etkilidirler. Osteoblastların bir kısmı osteositlere dönüşürken bir kısmı da kemik yüzeyinde epitel hücrelerine dönüşür. Osteoblast hücreleri Tümör

Nekrozis Faktör A (TNF-a) tarafından inhibe edilir. Osteoblastlar alkalın fosfataz, osteokalsin, Tip 1 kollajen, kemik siyaloprotein, Nükleer faktör kappalı ligandının reseptör aktivatörünü üretirler. Yeni kemik oluşumu sırasında alkalın fosfataz değeri artar.(16)

Osteositler; osteoblastlardan meydana gelir ve matriks lamelleri arasında bulunan lakunalar içine yerleşmişlerdir. Her lakunada bir adet osteosit vardır. Kemik hücrelerinin çoğunu osteositler oluşturur. Kemigi korur ve desteklerler. Hücre dışı kalsiyum ve fosfat regülasyonunda görev alırlar.(17) Parathormon (PTH) tarafından inhibe edilen osteositler; kalsitonin tarafından stimüle edilirler.(18) Sitoplazmik uzantılar kanaliküller içinde seyreder. Bu şekilde her hücre lakünası birbirleriyle iletişim halindedir.

Osteoklastlar; kemik rezorpsiyonunu ve yıkımını gerçekleştirirler. 20- 100 µm çapında büyük hücrelerdir ve 2-50 arası değışen sayılarda nükleusları bulunur(19). Osteoklastlar makrofaj kökenli hematopoetik hücrelerden köken alırlar(20). Osteoklastlar proteolitik ve kollegenaz enzimleri ile rezorpsiyonu yapabilirler. Yıkım işlevi sayesinde kemik remodelizasyonunda son derece önemli görevlere sahiptir. Osteoklastlar kemikte Howship lakünası adı verilen boşluklarda yerleşirler.(21)

Kemik dokusunun özelliğı inorganik kısımlarının da olmasıdır. Kemige sertliğini ve ağırlığının önemli bir kısmını verir. Kalsiyum (Ca^{++}) ve fosfor (P^-) iyonlarının hidroksiapatit şeklinde matriksinde kristalize halledir.

Organik kısım ise osteoblastlar tarafından amorf ve fibröz kısım olarak ayrılır. Amorf kısımda hyaluronik asit, kondroitin 4-6 sülfat, keratan sülfat, osteonektin, osteokalsin, osteopontin ve gama karboksiglutamik asit bulunur. Fibröz kısımda ise Tip I kollajen lifler ağırlıklı olarak bulunur.

Bağ dokusundan oluşan zarlar kemiğın iç ve dış yüzünü sararlar. Kemiğın dış kısmını saran kısmına periosteum, içtekini saran kısmına ise endosteum denir. Eklem yüzeyi hariç tüm kemiğı sarar. Periosteumun kemik gelişiminde, beslenmesinde, desteklik yapmasında ve tamir olaylarında görevlidir. Yapısında kollajen ve elastik lifler bulunur. Sharpey lifleri adı verilen kollajenler matriks içine doğru ilerleyerek periosteumu kemiğe bağlar(22). Periosteum bol damar içerir ve çok sıkı bağ dokusu yapısında olan dış tabaka ve hücreden zengin gevşek bağ dokusu yapısında olan iç tabakadan oluşur. Dış tabaka, kollajen ve elastiklerden zengindir, metabolizmada rol alan vasküler yapıları ve lenfatikleri içerir. İç tabaka hücreleri mezenkimal kök hücre özelliğı gösterip kemik kırıklarında osteoblast haline dönüşerek yeni kemik doku

yapımı ve onarımını sağlarlar. Endosteum tabakası kemiğin kanal sistemlerini ve kemik iliğini çevreleyen ince retiküler bağ dokusundan oluşur ve periosteumdan incedir.(23) Bu tabaka hem kemik doku hem de hemopoetik hücreleri yapabilme özelliğine sahiptir. Kemik yüzeyini ve belirli boşlukları kaplayan bu iki bağ dokusu kemik için çok önemli olan hayati öneme sahip fonksiyonları yerine getirirken bütünlüğün bozulması halinde olumsuz etkilenir.(23)

4.3. Kemik tipleri:

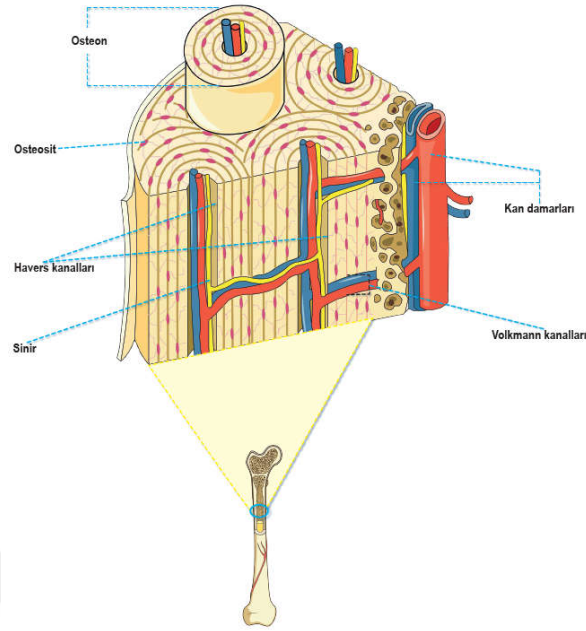
Kemik tipleri ikiye ayrılır:

Primer kemik doku içinde düzensiz dağılmış osteositlerden zengin olgunlaşmamış örgü şeklinde kollejen lifler gelişmiş güzel yayılmış şekilde seyrederler; kemik sertliğine tam olarak ulaşmamıştır.

Sekonder kemik dokuda ise lameller şeklinde üzerinde osteositler düzenli şekilde yer alır. Kemiğin olgunlaşmış şekli olup sertliğin maksimum hal aldığı kemik dokusudur. Kompakt ve süngerimsi doku olarak ikiye ayrılır.

Kompakt kemik dokusu mikroskopla bakıldığında küçük kanallarla donandığı görülür. Bu kanalların kemik dokuda vertikal olarak uzanan paralel kanallar Havers kanalı; havers kanallarını birbirine bağlayan kanallar ise Volkmann kanalları olarak adlandırılır. Bu kanallardan besleyici kan damarları ve sinirler seyreder. Homojen bir yapıdır. Havers kanalı ve çevresindeki lameller sistemi temsil etmekte olup osteon adını almıştır.

Süngerimsi yapıda ise lamellar tek tip ve paralel olarak seyreder lameller arası boşluk fazladır ve kemik iliği bu boşluklardadır.

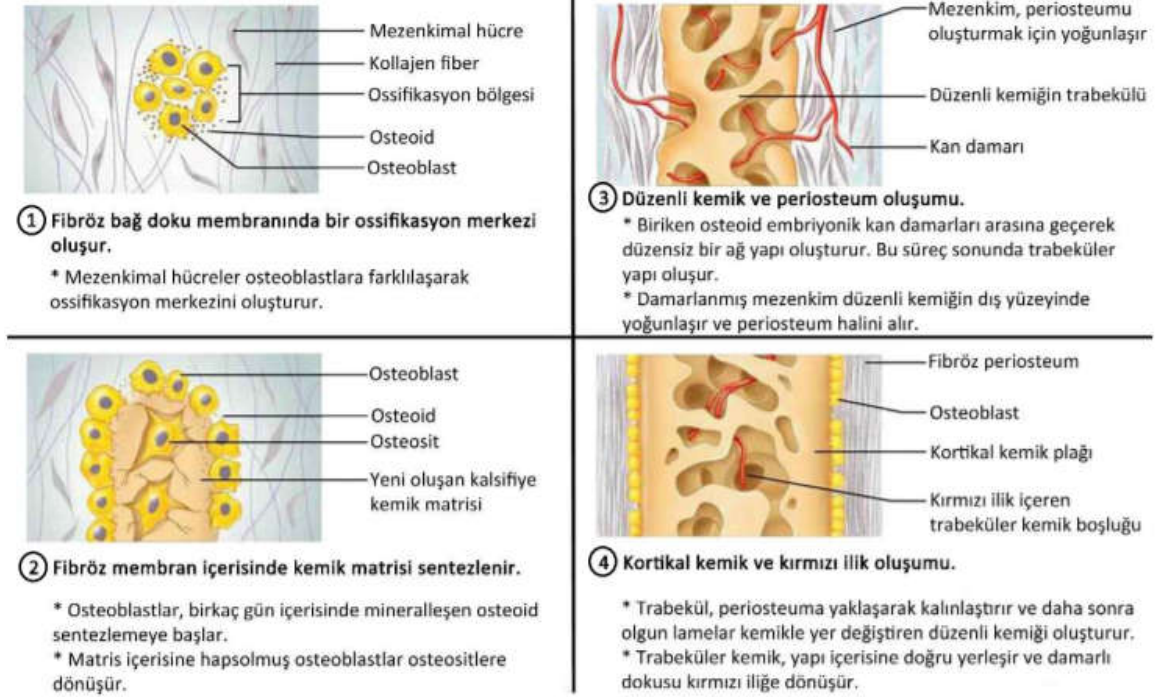


Şekil-1: Havers sistemi

4.4 Kemik Oluşumu:

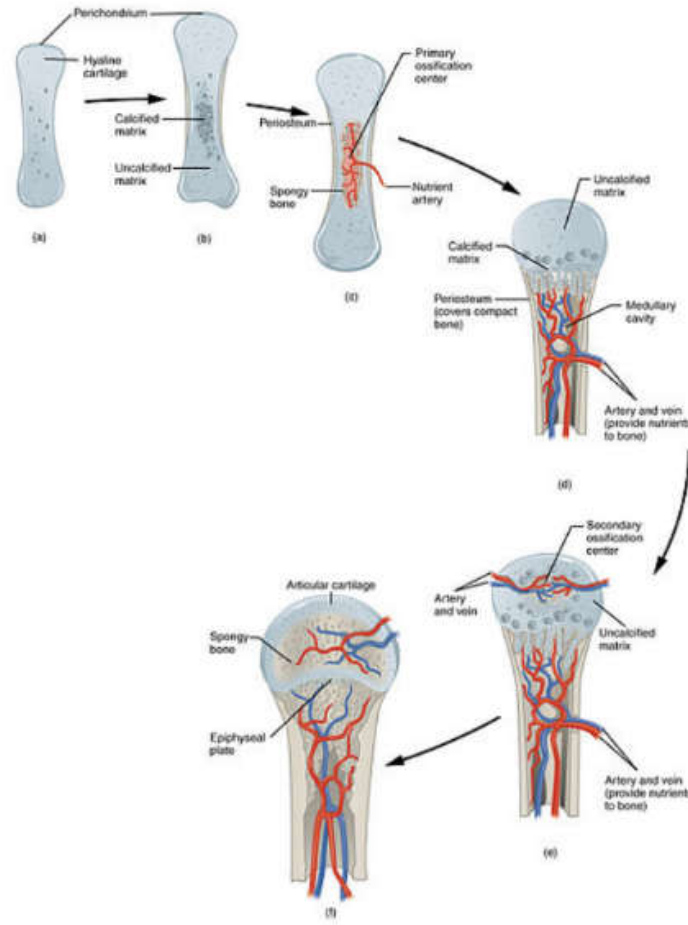
Kemik oluşumu iki şekilde gerçekleşir. Mezenkimal dokunun doğrudan kemik dokuya dönüşmesine intramembranöz kemikleşme; mezenkimal dokudan önce kıkırdak, sonra kemik dokuya dönüşümüne endokondral kemikleşme adı verilir.

İntramembranöz kemikleşme özellikle kafatası kemikleri, klavikula ve kırıklarda mutlak stabilite sağlanan kemiklerde mezenkimal dokudaki hücrelerin membran(tabaka) halinde birikimiyle osteoprogenitörlere dönüşür; onlardan da osteoblast oluşumu gerçekleşir. Osteoblastların matriks üretimi ile osteoblastlar matriks içinde gömülü kalır ve osteositlere dönüşür. Bu sırada oluşan anjiogenez sırasında osteoid alanlarına Ca ve P iyonları birikir(24). Alkalen Fosfataz yardımıyla CaPO_4 oluşur ve osteoid alan mineralize olarak primer kemik dokusu oluşur(25). Primer kemik merkezleri birbiriyle birleşerek süngerimsi kemik dokuları oluşturur ve trabeküler dokunun oluşumu artar. Kompakt doku kemik arasında hematopoetik hücreler ve kemik iliği hücreleri birikir.



Şekil -2 İntramembranöz Kemikleşme

Enkondral kemikleşme ise önce hiyalin kıkırdak ardından kemikleşmenin olması olarak adlandırılır. Genelde uzun kemikler bu şekilde kemikleşir. Uzun kemiklerin diafizinde ve uç noktalarında oluşan osteoblastlar kalsifiye olarak çevresini perikondrium oluşturur. Perikondriumun iç kısmındaki mezenkimal hücreler bölünerek osteoblastlara dönüşür. Osteoblastlar perikondrium üzerine tek sıra halinde dizilerek lamelleri sentezlerler.(26) Osteoblastlar osteosite dönüşür ve çevresindeki perikondrium periosteuma dönüşürek kemikleşme başlar. Ardından periostun olduğu kısımda osteoklast hücreleri oluşur ve delikler açarak perikondrium tarafından diffüzyonla beslenen kıkırdağın bütünlüğü bozulur. Bu deliklerden damar, Ca ve P girerek beslenme, mineralizasyon işlemleri başlar. Kıkırdak dokunun sekonder kemik dokuya dönüşümü sağlanmış olur.



Şekil-3: Enkondral Kemikleşme

4.5. Kemik Fizyolojisi:

Kemikler vücudun ağırlığını taşıyan iskeleti oluştururlar. İskelet kasları tendonlar aracılığıyla periosteumun bağ dokusu ile birlikte kemik içine girerler. Uzun kemikler kaldıraçlardan oluşmuş sistemleri meydana getirmek suretiyle, kasların kasılması ile oluşan kuvvetleri arttırırlar. Kemikler, kafa içi, spinal bölge ve göğüs kafesi içinde yer alan organları korurlar.(27) Kemiğin sertliğine rağmen uygulanan kuvvete göre trabekülleri yeniden şekillenmektedir. Kuvvetin çektiği yerde kemik yapımı; ittiği yerde ise yıkım gerçekleşir buna; Wolf kanunu denmektedir.(28)

Diyetle alınan Ca^{+2} duodenumdan aktif transportla jejunumdan pasif difüzyonla emilir ve süratle kemiklerde depo edilir. Vücut Ca^{+2} % 99' u kemikte bulunur. Vücutta kas dokusu kasılmalarında, sinir iletiminde, koagülasyon basamaklarında, hormonal salınım gibi pek çok

görevi bulunur. Serum kalsiyumunun düzeyi parathormon(PTH), 1–25 dihidroksi vitamin D3 tarafından ayarlanır. Ca^{+2} vücuttan dışkı idrarla atılır. Kan Ca^{+2} miktarı azaldığında ise kemikteki Ca^{+2} serbest hale getirilir. Kemikten kalsiyum çekilmesi hızlı ve yavaş olmak üzere iki yolla olur. İlk mekanizmada, iyonların basit olarak hidroksiapatit kristallerinden önce interstisiyel sıvıya, oradan da zamanla kana geçmesidir. Bu saf mekanizma süngerimsi kemikte olur. Olgun kemikte bile az kalsifiye olmuş yeni lamelller kalsiyumu kolaylıkla alır ve verir. Kemikten kalsiyumun serbestleşmesindeki ikinci yol ise hormon bağımlıdır. PTH osteoklastları aktive ederek matriksin rezorbsiyonunu başlatır ve kemikten Ca^{+2} serbestleşmesi sağlanmış olur. Tiroid bezinden sentezi yapılan kalsitonin, paratiroid hormona ters etki yaparak matriks rezorbsiyonunu inhibe eder.(29)

Fosfor, kemik mineralinin önemli bileşeni olmasına ek olarak, enzim sistemlerinde ve moleküler etkileşimlerde açısından da önemlidir. Plazma fosfatı çoğunlukla serbest haldedir. İdrarla atılabilen fosfat böbreklerin proksimal tübüllerinden geri emilir.(30) Kasılma için gereken enerjinin yapısında bulunan fosfat, kemikte çoğunlukla hidroksiapatit kristalleri şeklinde depolanır.

PTH ve kalsitonin dışında bazı hormonların kemik üzerine etkileri de mevcuttur. Büyüme hormonu kemiğin epifizinde boyuna uzamasını sağlar(31). Östrojen, kemik rezorbsiyonunu önleyerek kemik kaybını engeller. Ancak kemik yapımı ve yıkımı birbirlerine bağlı olaylar olduğu için östrojen tedavisi kemik oluşumunu da engeller. Kortikosteroid osteoblastları bastırarak kemik yapımını baskılar. İnsülin ve somatomedin de büyüme hormonunu pozitif etkileyecek şekilde kemik yapımını artırır.

4.5.1. Kırık Tanımı Tipleri:

Kemik anatomisinin ve bütünlüğünün bozulmasına dıştan ve içten etki eden kuvvetlerin etkisi kırık oluşumunun nedenidir. Bu durum kuvvetin şiddetine ve kemiğin absorbe edebilme yeteneğine göre kemikte çatlaktan(fissür), parçalı kırıklara hatta eklemde çıkıklı kırıklara sebep olmaktadır. Bu kuvvetler sadece kemikte değil yumuşak dokuda da hasar oluşturur.

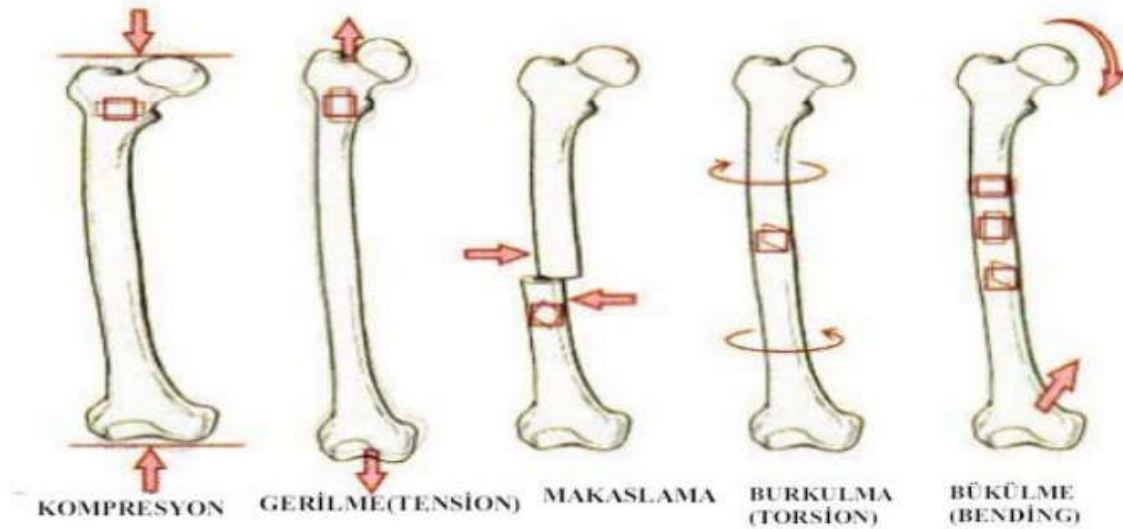
Kırığı oluşturan sebepler ile kırık lokalizasyonları yaşlara göre farklılıklar gösterir. Yeni doğan döneminde doğum travmaları, çocuklarda düşme ve trafik kazaları, gençlerde spor ve trafik kazaları, orta yaşlarda trafik ve iş kazaları ve ileri yaşlarda düşmeler ve tümöral olaylar kırık yapan başlıca nedenlerdir. Çocuklarda humerus suprakondiler kırıkları başta olmak üzere dirsek çevresi ve ön kol kemikleri ile femur cisim kırıkları sık görülür. Genç ve orta yaşlarda tibia, femur ve radius distali en çok kırılan bölgelerdendir. İleri yaşlarda düşük enerjili femur

boyunu, trokanterik bölge, humerus proksimali ve radius distali en çok kırık görülen bölgelerdendir.

Travmanın yol açtığı kırık nedenleri, trafik kazaları (araç içi veya araç dışı), ev içi kazalar, yüksekten, spor yaralanmaları, göçük altında kalma (deprem, maden kazaları vb), iş kazaları, ateşli silah yaralanmaları, kesici delici alet yaralanmaları ve yenidoğanlarda görülen doğum travmaları olarak sayılabilir.

Patolojik kırıklarda kırık çoğu zaman basit travmalarla veya bazen travma olmadan kendiliğinden meydana gelir. Altta yatan hastalık osteoporoz, benign tümör, primer veya sekonder malign tümör, osteomalazi gibi hastalıklar vardır.(32)

Tamamen normal bir kemikte dışardan etki eden kuvvetler ve vücut ağırlığının taşınabilmesi için gereken kas ve ligamentlerin kasılması gibi vücudun içinden etki eden kuvvetlerin şiddeti, doğrultusu, hızı ve etkileme süresine göre kırıklar meydana gelir.



Şekil-4: Kırık oluştuğu zaman travmanın kendine ve kırığın oluş mekanizmasına özgü belirti ve bulgular gözlemlenir.

Ağrı ve Duyarlılık: Tüm travmalarda ağrı olur fakat kırık sonrası ortaya çıkan ağrı daha şiddetlidir. Hastanın doğrudan travma bölgesinde olduğunu ifaden ettiği spontan ağrı, travma bölgesine bası uygulamakla meydana gelen ya da artan direkt ağrı veya uzaktan zormayla ortaya

çıkan veya artan indirekt ağrı olabilir. Hastanın bu spontan, direkt ve indirekt ağrıyı aynı lokalizasyonda hissetmesi kırık lehine bir bulgudur.

Hematom: Kırık sonrası kırık uçlarında bulunan damarların yaralanması veya kırığı oluşturan darbenini etkisiyle meydana gelir. Hematomun hızla büyümesi durumunda damar yaralanması olasılığı akla getirilmelidir.

Ekimoz: Cilt altına yayılan hematoma nedeniyle oluşan ciltteki görünümüdür. Travmanın erken dönemlerinde örülmesi masif kanama ve kırık habercisi olabilir. Ekimozun rengi zamanla yeşile ve sarıya dönüşür. Tamamen kaybolması 3 haftayı bulabilir. Ekimoz yer çekiminin etkisiyle yer değiştirir. Dirsek iç kısmında ve dirsek ekleminin hemen üst kısmında görülmesi humerus üst uç, uyluk arkasında görülmesi durumunda femur üst uç kırıkları olabileceği akılda tutulmalıdır.

Hareket Kısıtlılığı: Kırık oluştuğunda kemiğin kaldıraç kolu fonksiyonu ortadan kalkabileceği için ve ağrıya engel olabilmek için hareketler sınırlandırılır

Hastanın duruşu: Bazı kırıklarda hastanın duruşu tipik olabilir. Alt ekstremitelerde bir tarafta eğer adduksiyon, dış rotasyon ve diğer tarafa göre kısalık görülüyorsa, femur boyun kırığı veya trokanterik kırık akla getirilmelidir.

Deformite: Kırık uçlarının yer değiştirmesi ile olur. Kırık uçlarının birbirinden ayrılmasına deplasman, uçların birbirlerinin üzerine binmesine overriding, fragmanların birbirinden uzaklaşmasına distraksiyon, öne, arkaya veya yana açılmasına angulasyon, kırık uçlarının kendi eksenini etrafında dönmesine ise rotasyon denir.

Krepitasyon: Kırık uçlarının birbirine sürtünmesi sonucu palpasyonda hissedilen bir kırırtı hissidir. Tesadüfen tespit edildiğinde kesin kırık olduğunu gösterir. Ancak krepitasyon varlığını araştırmak nörovasküler yaralanmalara yol açabileceğinden yapılmamalıdır.

Anormal hareket: Bir kemikte normalde olmaması gereken anatomiye aykırı olarak gözlenen harekettir. Çok değerli ve kırık olduğunu gösteren bir bulgudur. Ancak krepitasyonda olduğu gibi anormal hareket olup olmadığını aramak hasarı arttırabileceğinden önerilmemektedir

Kırığın tanımlanmasında görüntüleme yöntemleri önemli yer tutar. Kırık uçlarının durumu, parça miktarı, sınıflama ve çıkıkları ve yabancı cisim belirlemede yardımcıdır. Direkt grafilerinde kırığın lokalizasyonu konumu anterior posterior ve lateral grafilerle değerlendirilir. Aynı zamanda kırığın ilişkide bulunduğu eklem ve dokular da grafilerde değerlendirilmelidir. Eklem içi kırıklarda pelvis kırıklarında, vertebra kırıklarında, patolojik kırıklarda ve şüpheli

durumlarda istenilecek bilgisayarlı tomografi tetkiki daha ayrıntılı ve kesin bir inceleme olanağı sunar.(33) Aynı zamanda eklem içi kırıklarda, patolojik kırıklarda, tumor vakalarında, vertebra kırıklarının nörolojik patolojilerinde manyetik rezonans(MRI) görüntüleme de son derece önemlidir.

4.6. KIRIK KAYNAMASI

4.6.1. Kemik İyileşme Evreleri:

Kırık oluşma durumu sonrası kemik ve vücudun verdiği reaksiyonla kırık alan skar dokusu oluşmadan kendini tamir eder. Kırık oluştuğu andan itibaren kırık iyileşme safhası başlar kırık hatta yeni kemik oluşumu ile bütünlük sağlanması ile tamamlanmış olur. Bu aşaması güne kadar iki türlü kırık onarım ve kemik iyileşme safhası tanımlanmıştır.

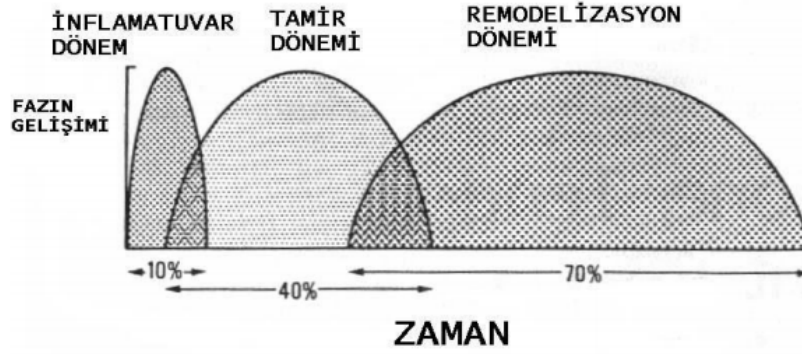
4.6.1.1. Primer Kırık İyileşmesi:

Primer kırık iyileşmesi nadir görülür. Doku kanlanması sağlandığı ve mutlak tespitle kırık uçlar arasında hareketin ve aralığın minimum seviyede tutulduğu anatomik tespitin sağlandığı durumlarda kallus dokusu oluşmadan osteblastik ve osteoklastik aktivitenin bir denge içinde olmasıyla primer kırık iyileşmesinden söz edebiliriz.

Kırık parçalar arası gerilim %2 den az olması ve aralarındaki mesafenin 0,02 mm den az olması esas kriterlerdendir. Kırık uçtaki alanda bulunan osteonlarda osteoklastik hücre aktivasyonu başlar ve ölü doku ve hücreler parçalanarak osteoprogenitor hücrelerin sevkıyatıyla damarlanma sağlanır. Burada osteblastalar da aktif hale gelir, Haversian sistemleri ve kemik matriksi oluşumu başlar. Havers sistemi ve damarlanmayla mezenkimal hücreler bölgeye gelir, osteoların oluşumu başlayarak lamelleri oluşturur. Böylece kallus dokusu oluşmaz.(34) Kırık parçalar arası mesafenin 1 milimetre(mm) ‘ den az olması ile kırık parçalar arasında Perren’ in gerilim teoremi ile parçalar birbirini destekleyerek mezenkimal hücrelerin osteonlara dönüşümü sağlanır.olgunlaşması sonrası köprüleşme gerçekleşir ve lamaller oluşumu sağlanır.(35)

4.6.1.2. Sekonder(İkincil) Kemik İyileşmesi:

Bu kırık iyileşmesi en çok görülen iyileşme türüdür. Anatomik olmayan ve mutlak tespit yapılmayan göreceli tespit yapılan kırıklarda öncelikle yumuşak kallus ardından sert kallus dokusu görülür. Sonrasında kallus yeniden şekillenmesi(remodeling) ile iyileşme sonlanır. Radyolojik ve histolojik olarak üç dönemde incelenir. Bu dönemler inflamatuvar dönem, tamir dönemi ve remodelizasyon dönemi olarak isimlendirilirler. Bu evreleme sistemleri birbiri içinde kesin ayrımları yapılamadan gözlemlenebilir.



Şekil-5: Kırık İyileşme evreleri

4.6.2. İnflamatuvar (Hematom) Dönem (1–4 gün):

Kemik bütünlüğünün bozulması ile beraber inflamatuvar (hematom) evresi başlamış olur. İnflamatuvar yanıtın başlamasıyla birlikte kırık uçları arasında ve kırık çevresinde oluşan hematoma koagülasyon sonucu meydana gelen fibrin, onarıcı hücrelerin migrasyonunu kolaylaştıran iskelet görevi görür ve trombositler büyüme faktörlerini salgılar. Hematopoetik kök hücrelerin ve büyüme faktörlerinin kaynağı kırık sonrası ortaya çıkan hematomdur. Hasarlanmış osteositler ve kemik matriks sonucu ortaya çıkan Tümör Nekrosis Faktör(TNF) alfa, Growth Faktör(TGF) beta, IL-1 (interlökin-1) beta, IL-6(interlökin 6), IL-17 (interlökin 17), IL-18(interlökin 18) ve IL-23(interlökin 23) gibi inflamatuvar mediatörler vasküler genişlemeye ve inflamatuvar polimorfonükleer lökositler, makrofaj, lenfosit gibi inflamatuvar hücrelerin kırık bölgesine toplanmasına neden olur. Kırık iyileşmesindeki ilk inflamatuvar evre olumlu etki gösterir. İlk 24 saate inflamatuvar yanıt en üst seviye yükselir ve 7. güne kadar azalarak devam eder.(36) Başlangıç evresinde TNF alfa, interlökin (IL) 1, interlökin 6, interlökin 11 ve interlökin 18 düzeyleri artar. Kemotaktik etkiyle ikincil inflamatuvar etki yaratan TNF alfa ilk 24 saatte en yüksek seviyeye ulaşır ve 72. saatte tekrar normal seviyeye iner. TNF alfa osteoblast ve osteoklast üzerindeki tümör nekrozis faktör reseptör 1 (TNFR1) ve tümör nekrozis faktör reseptör 2 (TNFR2) reseptörleri üzerinden mezenkimal ve inflamatuvar hücrelerin farklılaşmasını uyarıcı etki yapar. Sadece kırık iyileşme safhasında ortaya çıkması nedeniyle TNFR 2 reseptörünün özellikli olduğu düşünülür. Kırık iyileşmesinde IL-1 Vve IL-6' nın daha etkin olduğu

düşünülmüştür. Makrofajlarla IL1 düzeyinin artması, osteoblastlardan IL6 salınımını artırır ve bu da kırıldak kallus gelişimini, ILR1 ve ILR2 reseptörlerini etkileyerek damarlanmayı uyarır. Akut fazda salgılanan IL6 damar endotelial büyüme faktörü (VEGF) salınımını artırıcı, damarlanmayı, osteoblast ve osteoklast farklılaşmasını uyarıcı etki yaratır.(37) özellikle kemik iç kambiyum tabakında BMP-2 ve BMP-7' nin mezenkimal hücrelerin kemik iyileşmesinde osteositlere farklılaşmasında etkin oldukları belirtilmiştir.(37) Böylece mezenkimal kök hücreler, osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlar çoğalarak granülasyon dokusunu 7. güne kadar oluştururlar.

4.6.3. Onarım Dönemi (2- 40 gün):

Hücre sayının artması ve matriksin artması ile beraber 2. günden itibaren onarım safhası başlar. BMP2'nin mezenkimal hücre göçü çoğalması ve farklılaşmasında önemli role sahip olduğu bilinmektedir. Sekonder iyileşmede hem intramembranöz hem enkondral kemikleşme gerçekleşir. Fibrinden zengin granülasyon dokusu hematoma ardından oluşmaya başlar.(38) Kırık fragmanları arasındaki merkez bölgede ve periostun dış kısımlarında enkondral kemikleşme başlar, kırıldak ve fibröz içeriği fazla olan yumuşak kallus meydana gelir. Oluşan yumuşak kallus matriksin mineralizasyonu, kırıldak hücrelerinin apoptozu, vaskülarite artışı, osteoblast çoğalması ve enkondral kemikleşme ile sert kallusa dönüşür. Yumuşak kallus oluşumunun 7-9. günlerde başladığı, matriksde Tip 2 kollajen ve proteoglikan miktarlarında artış olduğu yapılan bazı çalışmalarda gösterilmiştir. Kırık bölgesinde kırık uçları arasında periost altındaki hücrelerde mezenkimal kök hücreler osteoblastlara intramembranöz kemikleşme meydana getirir. Kırıldak oluşumu ve enkondral kemikleşme TNF beta (TNF B2 ve TNF-3) etkisiyle uyarılırken, intramembranöz kemikleşme için BMP-5 ve BMP-6 gerekli hücre çoğalmasını sağlar.(39)

Kırık sonrası yeniden kanlanma problemidir. Kan damarları enkondral kemikleşmede kondrosit apoptozu, hücrelerin ve matriks dokusunun uzaklaştırılması ile bu bölgeye doğru büyür ve ilerler. Anjiogenez Vasküler Endotelial Growth Faktör (VEGF)'ye ve anjiyopoetine bağımlı olarak iki yoldan gerçekleşir. Anjiyopoetin 1 ve 2 seviyeleri iyileşmenin erken dönemlerinde artar. Anjiogenezde kritik öneme sahip VEGF osteoblastlardan ve hipertrofik kondrositlerden salınır, damarlanmada kritik role sahiptir. Endotelial mezenkimal hücre çoğalmasını uyarır, damar invazyonunu sağlayarak avasküler kırıldak dokusunun vasküler kemik dokusuna dönüşümünü sağlar. Damarlanmada BMP'ler VEGF ile sinerjistik etki gösterir ayrıca mekanik uyarı kırık bölgesinde VEGFR-2 reseptörü üzerinden anjiyogenik etki gösterir.(40)

Makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), nükleer kappa ligand reseptör aktivator (RANKL), osteoprotegrin ve TNF-alfa etkisiyle mineralize kırık doku rezorpsiyonu başlar ve bu sayede sert kallus yumuşak kallusun yerini alır. Osteoblast ve osteoklast üzerinde M-CSF, RANKL, osteoprotegrin'in örgü kemik yapımında etkisi olduğu düşünülmektedir. TNF-alfa'nın mezenkimal kök hücre uyarıcı etkisi yanında kondrosit apoptozunu başlatması etkisi de vardır. Kallus dokusundaki bulunan kondrositlerin sitoplazmasında ayrıştırılan kalsiyum granülleri ekstrasellüler matrikse taşınarak burada bulunan fosfat ile birleşir ve mineral depolanması başlar. Kalsiyum ve fosfat depolarından apatit kristaller oluşur. Yapılan çalışmalarda Tip I kollajen, osteokalsin, osteonektin ve alkalen fosfataz seviyelerine bakılarak sert kallus oluşumunun 14. günde en yüksek seviyede olduğu tespit edilmiştir. Mineralize kırık doku örgü kemik ile yer değiştirdikçe sert kallus oluşumu artar ve iyileşme dokusu mekanik olarak daha stabil hale gelir. Kırık uçları birleşip kortikal kemik uçları devamlılığı sağlanana kadar onarım devam eder. Kemiğin kansellöz ya da kortikal yapısı, çevre yumuşak doku desteği, stabilitesine göre iyileşmede değişiklik görülebilir.

4.6.4 Kemiğin Yeniden(Remodelling) Şekillenme Dönemi:

Sert kallus formasyonu kemiğe yakın bir içerik olsa da kemik dokusu kadar sert biyomekanik özellikte değildir. Oluşan kallusun lamelli kemik oluşması için yeniden şekillenmesine ve belli bir zamana ihtiyacı vardır. Bir yandan osteoblastların oluşturduğu lamellar kemik bir yandan osteoklastların meydana getirdiği sert kallus rezorpsiyonu denge içinde gerçekleşir. Kırık sonrası 3–4. Haftalardan itibaren başlayan bu süreç, klinik iyileşme sonrası yıllarca devam edebilir. Kemiğe özgü alkalen fosfataz ve osteokalsin değerlerinin gerilemediği artmış osteoblastik ve osteoklastik aktivite sinyallerinin uzun yıllar devam ettiği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.(16) kemik aksiyel yüklenmeyle yeniden şekillenmeye devam eder. Elektropolerite etkisiyle elektropozitif konveks yüzeyde osteoklast; elektronegatif konkav yüzeyde ise osteoblast etki uyarılır. Kallus dokuları intrameduler kavite ve lameller kemiğe döüşür.bu duruma özellikle kanlanma ve kırık parçaların stabilitesi katkı sağlar. Bu süreçte biyomekanik, kimyasal ve hücrel aktivitenin rolü büyüktür.

Kırık iyileşmesinde biyolojik, mekanik, sistemik etmenler mevcuttur. Yaş, cinsiyet, beslenme iyileşmede etmenler olduğu gibi travmanın çeşiti, darbenin enerjisi, kırık parçalarının sayısı, kırığın tespiti, açık yara olup olmadığı, kırık yerinin beslenmesi gibi etmenler etkilidir.

Bone morfojenik protein mezenkimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşması, hücre migrasyonu, matriks sentezi, ve kemik oluşumunun aktivasyonunda etkilidir. Bir çok BMP çeşiti keşfedilmiştir. Kemik iyileşmesi üzerine etkileri konusunda BMP2 üzerine çalışmalar yapılırken kaynamama ve osteonekroz tedavisinde çalışmalar BMP 7 üzerine yoğunlaşmıştır.(41)

Tranforming(Dönüştürücü) Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β): Osteoblast, kondrosit ve fibroblastlar üzerindeki etkileriyle matriks oluşumunu damarlanmayı enkodral kemikleşmede, kalsifikasyonu kırık kallusunda kırıkda ve kemik oluşumunu kontrol ettiği görüşü mevcuttur.(42)

Fibroblast Kaynaklı Büyüme Faktörü (FGF): Mezenkimal kök hücre çoğalmasında, kırıkda oluşumu, angiogenezis, osteoblastik aktivitede etkilidir. Kırık iyileşmesinde belirgin olarak FGF2 olmak üzere diğer FGF' lerin de etkili olduğu bildirilmiştir.(43)

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF): Fibroblast ve kemik hücreleri için çoğalabilir. VEGF, IL6 seviyesini uyararak anjiyogenezisi artırıp iyileşmeye olumlu etkisi vardır. Kırık iyileşmesinde trikalsiyum fosfat ile birlikte hazırlanmış PDGF uygulamaları konusunda yapılan çalışmalar vardır.(44)

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 (IGF-2): Tip I kollajen üretimini, damarlanmayı, osteoprogenitör hücre çoğalmasını uyarır(45). Plazma Fibronektini: Yeni damar oluşumu için mitojeniktir.

Somatomedin C: İskelet sistemi üzerinde büyüme hormonuna benzer fonksiyonu vardır. Kondroblastların bölünme ve farklılaşmalarını, ayrıca kemik matriksi oluşumunu hızlandırır.

Epidermal Büyüme Faktörü (EGF): Kemik geri emilimini hızlandırır.

Kondroblast Kökenli Büyüme Faktörü(CDGF): İki tipi vardır ve Tip II kollajen ve hiyaluronik asit için düzenleyicidir. Makrofaj Kaynaklı Büyüme Faktörü(MDGF): Sıçanlarda osteoblast benzeri hücreler ve kondrositler için mitojeniktir. Epidermal Hücre Kaynaklı Büyüme Faktörü (ECGF): Kemik ve kırıkda için mitojeniktir.

Kırık iyileşmesinde sistemik faktörler de nörolojik deficit durumlarda önem arz etmektedir.

Hormonal olarak:

Büyüme hormonu kemik içerisine kalsiyum emilimini artırır.

Kalsitonin osteoklastları inhibe ederek kemik çözünmesini azaltır.

Östrojen kemik çözünmesini engelleyici etkisi vardır.

Kortikosteroidler kollajen sentezini inhibe ederek kemik oluşumunu engeller, çözünmesini artırır.

Tiroid Hormonları kemik çözünmesini, oluşumundan daha çok tetikler.

Paratiroid hormonu kalsiyum, fosfat ve D vitamini metabolizmasını etkileyerek kemik mineral dengesinde kilit role sahiptir. Plazmadaki kalsiyum seviyesini ve böbrekteki fosfat fitrasyonunu düzenler. Sürekli salınımı osteoklastik aktiviteyi uyarırken aralıklı ve dengeli salınımının osteoprogenitör hücreleri etkileyerek, osteoblastik aktiviteyi artırarak kırık iyileşmesini uyardığı ve hızlandırdığı bilinmektedir(46). Yapılan çalışmalarda, paratiroid hormon kullanılan hastalarda kemik kütlelerinin arttığı kırık riskinin azaldığı ve kırık iyileşmesinin hızlandığı görülmüştür.(47)

İyileşmede biyolojik ve mekanik faktörler olumlu yönde etkileşim içindedirler. Kırık stabilitesi yukarıda da bahsedildiği gibi önem arz etmektedir. Kırık parçaları arasındaki mesafe ve hareket ne kadar az kırık sabit demektir. Kırık fiksasyonunda kullanılan materyalin sertliği ve elastik deformasyonu sabitliği etkiler. Kırık sabitliği(stabilite) iyileşmeyi belirler. Normal yüklenme sonrası kırık fragmanları arasında hareket olmamasına mutlak stabilite denir. Bu durumda kallus dokusu oluşmaz.(48) Bazı kısmi stabilite durumlarında mikrohareket sağlanır ve kallus dokusu oluşarak kırık iyileşmesi gözlemlenir. Mikrohareketten daha fazla hareket ve kırık parçalarının arasındaki mesafenin belli bir gerilimden fazla olması kayanamama ile sonuçlanabilir.

Kemiğin aldığı yüke bağlı olarak iyileşme artacak ve ona göre şekillenecektir. Buna Wolf Kanunu denmektedir. Özellikle kompresif kuvvetler olumlu olarak değerlendirilirken tensil ve makalama kuvvetleri kırığın iyileşmesinde olumsuz durum yaratmaktadır.(49)

Kırık stabillendikten sonra kallus dokusunun genişlemesiyle sertlik artar, hidrostatik basınç azalır ve matriks geçirgenliği artar. Bunun sonucu olarak kırık üzerindeki makaslama kuvvetleri azalır. Kondrosit sayısı giderek artar enkondral kemikleşme başlar(50). Kollajen matriks miktarı artınca gerilme azalır bu alana daha çok osteoblast gelir ve kemikleşme ilerler. Mezenkimal hücrelerin kemik hücrelerine dönüşümü için uygun gerilim sağlanmış olur.

Kemik yüklendiğinde kırık fragmanlar yer değiştirir bu hareket kırık hattında çok yönlü farklı kuvvetlerin (aksiyel, torsiyonel, eğilme) oluşumuna yol açar. Fiksasyonun rijiditesi, kırık uçların yüzey alanı; fragmanlar arası hareketi etkileyerek doku yüklenmesini ve kırık boşluğundaki hücre yanıtını belirler. Kırık parçalarının arası hareketin yönü yüklenmeye, kas kuvvetlerine ve seçilen sabitleme materyalinin sertliğine göre değişkendir. Parçalar arası hareketin oluşturduğu kuvvet, kırığın şekline göre değişkendir. Örneğin, parçalı kırıklarda daha geniş bir yüzey alanı var olduğundan hareket bu kırık alanlarına paylaşılır daha büyük hareketleri

tolere edebilir. Oluşacak kallus dokusunun miktarı fragmanlar arası hareketin boyutuna bağlı olmakla birlikte fazla hareketin kaynamayı olumsuz etkileyeceği de gerçektir. Yeterli stabilite sağlanması sonrası enkondral iyileşme gerçekleşecektir.(51)

Yapılan mutlak stabilitenin gereğinden fazla olması yük dağılımını orantısız şekilde seçilen implantlardan gönderilmesine ve kemikte yeniden şekillenme ve kallus dokusu oluşumunda azalmaya sebep olacaktır(52). Bu durumda; kaynama olumsuz etkilenecektir.

Kırık tedavisi dışarıdan ve içeriden müdahalelerle kırığın stabilitesi sağlanıp doğru bir uzunluk ve doğrultu sağlanarak hızlandırılması sağlanmıştır. Gelişen implantlar teknikler ve materyaller sayesinde günümüzde olumlu sonuçlar artmıştır.

Kırıklarda özellikle diafiz yani shaft bölgesinde doğru bir dizilim yeterli iken eklemi ilgilendir durumlarda mutlak stabilitenin şart olduğu görülmüştür. Mekanik yüklere karşı izin verildiği ölçüde hareketi olan kırıklar göreceli olarak sabitlenmiştir ve bu aşamada kallus dokusu oluşarak iyileşme sağlanır. Bu nedenle sıkıştırma yöntemi ile yani kompresyon vidası, kompresyon plağı ve gergi bandı yöntemleri mutlak stabiliteyi sağlamak için kullanılırken; kanal içi çiviler, internal fiksator ve eksternal fiksatorler göreceli(esnek) sabitleme sağlarlar.

4.7. Alçı ve Atelleme:

Bu uygulama ile tedavi edilen kırıklarda dizilimi sağlayarak sınırlı hareketle redüksiyon sağlanır bu nedenle bu kırıklarda kısmi stabilizasyon vardır ve sekonder kırık iyileşmesi görülür uzun süre hareketsizlik olumsuz etkilerindendir. Bu nedenle erken mobilizasyon önemlidir. Tedavi yöntemine kırığın özellikleri, hastanın genel sağlık durumu, olası ameliyat komplikasyonları ayrıntılı olarak değerlendirilerek karar verilmeli

4.8. Açık redüksiyon internal fiksasyon:

Komplikasyon risklerinin fazla olduğu kırıkları cerrahi yöntemlerle tedavi etmek gerekir. Son 150 yılda bilimdeki ilerlemeyle, çeşitli cerrahi implantlar ve yöntemler geliştirilmiştir. 1800'lerde ilk olarak Lister tarafından patella kırığına internal fiksasyon yapılmıştır. Bundan sonra, yapılan implantlarda sınırlı biyolojik ve mekanik bilginin olmasına bağlı korozyon, yetersiz stabilite, enfeksiyon gibi komplikasyonlar gelişmiştir. Gelişen implant çeşitleriyle internal fiksasyon çektirme vidalarıyla mutlak stabilite sağlayıp primer kemik iyileşmesi sağlanmıştır.ardından kemikte görülen kanlanma bozuklukları ve kaynamama durumlarında kemiğe daha az temaslı ve esnek stabilizasyon sağlayan kilitli vidalarla çok parçalı kırıklarda köprüleme veya destek sağlamak suretiyle mikroharekete de izin veren vida plak uygulamaları

yapılmış ve başarılı olunmuştur.günümüzde eklem içi kırıklarda mutlak stabilite sağlayarak kallus oluşu olmadan primer kemik iyileşmesi sağlanmıştır.

4.9. İntramedüller çiviler:

Uzun bir geçmişi olan intramedüler çivilemenin bugünkü anlamda modern hali Küncher tarafından tasarlanmıştır. Mikroharekete izin veren bu tasarımla beraber kallus oluşumu ile iyileşme sağlanmaktadır. Dinamik ve statik kilitleme ile hareketin miktarı ayarlanmaktadır. Intramedüler kısmı ise rimelize edilerek endosteal kemik alınarak sabitlenmesi artrılmakta olmasına rağmen kanlanma azaltılır(53). Proksimal femoral civiler de kısa süreli sıkıştırma ile sabitleme yapmasına karşın kemikte bir süre sonra rezorbsiyona sebep olmaktadır(54). Elastik çivilerin kullanımı da özellikle çocuk hastalarda kullanılmakta olup göreceli fiksasyon sağlamakta kallus oluşturmaktadır.

4.10. Eksternal fiksatörler:

Yüksek enerjili açık kırıklarda enfeksiyon riski nedeniyle internal sabitleme yerine kullanımı mevcut olup ekstremitenin uzatmalarında da kullanılmaktadır. Tespitin sertliği, cihazın tipine, elemanlarının kemiğe göre dizilimine, cihaz ile kemik arası veya çiviler arası mesafeye, çivi sayı ve kalınlıklarına, gerginliğine göre değişebilmektedir(55). Tespitin sertliği katılığı değiştirilmekle beraber esnek bir sabitleme sağladığından sekonder iyileşmede daha çok kullanılmaktadır. Halka eksternal stabilizörlerde sertlik sağlamada daha efektif olup primer kaynamada önemli rol oynar(56).

Kırık parçalar arasında kontrollü hareketin sağlanması önemli bir konudur. Kaynamaların geç safhasında bu hareketin kaynamayı olumlu etkilediği savunulsa da hareketin istenenden fazla olması kanlamayı azaltmaktadır. Bu durumda kaynamanın olumsuz etkileneceği görüşü ağırlık kazanmıştır.

Kaynamama durumu da iyileşme durumu gibi görülmektedir. Özellikle kaynamama veya geç kaynama konusunda bazı görüş ayrılıkları olmasına karşın 9. ayda kaynamama ya da son üç ayda kaynama ile ilgili olumlu bir görüntünün olmaması kaynamamayı ya da geç kaynamayı düşündürür. Kemiğin yaralanma alanı, kırığın şekli, bölgesi ve kırığa ek yaralanmalar, hastanın yaşı, ek hastalıkları, kullandığı ilaçlar, sigara alışkanlığı göz önünde bulundurularak, kaynamanın buna göre değerlendirilmesi gerekmektedir.(57)

Kaynamamanın da tipleri olduğu çalışmalarda görülmüş olup gruplandırılmıştır.

Hipertrofik kaynamama: Kanlanmanın yeterli olduğu kırıklarda fragmanlar arasındaki fazla harekete bağlı belirgin kallus oluşumu, doku farklılaşmasında yetersizlikle karakterize kaynamamadır.

Atrofik kaynamama: Doku kanlanmasındaki bozukluğa bağlı kallusun oluşmadığı ve kırık uçlarında rezorpsiyonun olduğu kaynamama durumudur.

Oligotrofik kaynamama: Kırığın yeterli redüksiyon ve fiksasyonunun olmaması nedeniyle, fibröz ya da kıkırdak doku oluşumuyla, yetersiz iyileşme dokusuyla karakterize kaynamama şeklidir. Bu olumsuzluklara rağmen doku iskelesi ve kök hücre çalışmalarının kırık iyileşmesine etkileri kemik doku mühendisliği çalışmaları ile son zamanlarda yoğunlaşmıştır.

4.11. Kemik Doku Mühendisliği ve Kullanılan biyomalzemeler:

Doku Mühendisliği: İnsanda hasar gören doku ya da organların yerini laboratuvar koşullarında üretilerek o doku ya da organın yerini alan bilim dalıdır.

Kemik doku mühendisliği, fiziksel ve kimyasal açıdan kemik hücre dışı matrisini (ECM) taklit edebilecek (biyomimetizm) biyomalzeme (doku iskelesi), uygun koşullar altında kemik oluşturma potansiyeli olan hücre ve kemik oluşumunu uyarıcı molekül (biyosinyaller) bileşenlerini kullanarak, insan vücudunun herhangi bir yerindeki hasarlı ya da işlev göremeyen kemik dokunun yenilenmesini (rejenerasyon) ya da onarımını (repair) amaçlamaktadır. Kemik ECM'si detaylandırıldığında, nanometre kalınlığındaki kollajen fiberlerin arasında nanoboyutlu plaka morfolojisinde hidroksiapatitlerin (HA) yerleştiği görülmektedir(58)(59) Buna bağlı olarak araştırmacılar, doğal ve/veya sentetik polimer nanofiber ana matris içerisinde biyoseramiklerin bulunduğu kompozit biyomalzemeler üreterek yeni kemik oluşumunun ve mineralizasyonun çok daha başarılı olduğunu gösteren sonuçlar elde etmişlerdir(60).

Biyomalzemeler canlı bir sistemde bütünlüğü sağlayan doku parçalarının yerini işlevsellikle beraber dolduran ve diğer canlı dokularla etkileşim halinde olan doğal ya da sentetik yapılardır. Doku iskelelerinin üretiminde kullanılan biyomalzemeler; polimerler, seramikler, metaller ve kompozit malzemeler olarak gruplandırılmaktadır. Biyomalzemenin onarımı hedeflenen dokuya olan benzerliği oldukça büyük önem taşıdığından yumuşak dokuyu oluşturacak doku iskeleleri doğal veya sentetik polimerlerden elde edilebilirken, sert dokuyu oluşturacak doku iskeleleri seramik, polimer veya kompozitlerden oluşur.(61)

Polikasyonik yapıda doğal bir polimer olan kitosan biyoyumlu ve toksik olmayan yapısı ile doku mühendisliği uygulamalarında geniş bir kullanım alanı bulmaktadır. En çok tercih edilen formları üç boyutlu gözenekli yapılar ve jel membranlardır. Kitosan yapılar, hepatosit

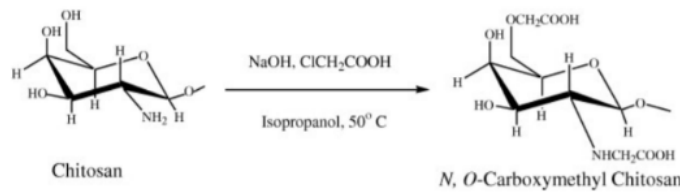
kültürlerinde, kırık doku rejenerasyonunda ve kemik rejenerasyonu için ortopedik kompozitlerde kullanılmıştır.(62)

Materyaller	Avantajları	Dezavantajları	Örnekler
POLİMERLER *Silastic®kauçuğu Teflon® *Dacron® *Nylon®	Esnetirler,fabrikasyonları kolaydır,düşük dansitelidirler.	Mekanik güçleri düşüktür ve zamanla parçalanırlar	Cerrahi iplikler, arter-ven damarları,tendonlar, burun, kulak elmacık kemiği
METALLER *316,316L,S,S *Vitalyum *Titanium Alaşımları	Gerilme dirençleri yüksektir kullanımda dayanıklıdır	Biyouyumlulukları düşüktür, dansiteleri yüksektir ve canlı ortamda korozyona uğramaktadırlar	Ortopedik birleştiriciler (tabaka, çivi vb.), diş implantları
SERAMİKLER *Alüminyum Oksitler *Kalsiyum Aluminatlar *Titanium Oksitler *Karbonlar	İnerttirler, biyouyumlulukları iyidir, korozyona ve fazla sıkıştırmaya dayanıklıdır	Mekanik güvenleri düşüktür, esneme özellikleri olmadığından ve yüksek dansiteli olduklarından fabrikasyon zorlukları vardır	Kalça protezleri,dişler, derialtı sistemleri
KOMPOZİTLER *Seramik kaplı metal *Karbon kaplı metal	Biyouyumlulukları iyidir, inerttirler,korozyona dayanıklı ve gerilme dirençleri yüksektir	Materyal fabrikasyonu zordur	Kalp kapakçıkları, diz kapağı implantları

Şekil-6: Biyomalzemeler

4.12. Tezde kullanılan malzemelerin listesi

Doğal bir polimer olan kitosan fizyokimyasal ve biyolojik özellikleri nedeniyle kemik dokudan kırık dokuya orthopedi ve travmatoloji için kırık iyileşmesi kırık dokunun tamiri gibi durumlarda kullanımı uygundur.(63) Kitosan yengeç ve karides kabuğunda bulunan kitinin deasetilasyonu ile elde edilmektedir.(64)



Şekil-7: Karboksimetil kitosan

Biyoseramikler kemiğin doğal yapısına kimyasal ve yapısal olarak benzerliği nedeniyle mükemmel biyouyum göstermesinin yanı sıra osteoblast farklılaşmasını ve çoğalmasını sağlaması bakımından kemik doku mühendisliği çalışmaları için oldukça önemlidir(65). Kırılgan olmaları, implantasyon için şekillendirilmelerinin zor olması gibi nedenlerden dolayı biyoseramikler genellikle tek başına kullanılmamakta, çeşitli polimerler ile birleştirilerek kompozit malzemeler hazırlanmaktadır.(66) Kompozit doku iskelesi hazırlanmasında sıklıkla kullanılan bir biyoseramik olan hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (HAp) kemiğin temel inorganik bileşenidir.(67)

Lif kabağı veya sünger kabak olarak bilinen *Luffa cylindrica* (LC) bitkisi *Curcubitacea* ailesinden gelmekte olup meyvesi kalın bir kabuğa sahiptir(68). Bu meyvenin iç kısmında çekirdekleri bulunmaktadır ve doğal bir mat içeren çok yönlü lif dizisine sahiptir. Çoğunlukla kullanım alanı banyo süngeri veya kozmetik olmasına rağmen, küçük bir lif kabağı çeşidi olan *acutangula*, sinüslerde tıbbi amaçlı olarak proteinleri hareketsizleştiren yataklar olarak da kullanılmaktadır.(69) Esas kompozisyonu 60% selüloz, 30% hemiselüloz ve 10% lignin olarak kabul edilebilir.(70) aynı zamanda gözenekli yapısı, toksik olmaması, maliyetinin düşük olması güvenilir ve kullanılabilir bir matriks parçası olarak değerlendirilir.(71)

5. GEREÇ YÖNTEM:

Tez çalışması kapsamında doku iskelesi üretimi için % 91 deasetilasyon derecesine sahip O-karboksimetillenmiş kitosan (CMChT, 358091), Santa Cruz Biotechnology, ABD'den satın alındı. Hidroksiapatit (HAp) nano tozu (partikül boyutu <200 nm), poli (etilen glikol) diglisidil eter (PEGDE) (475696, Mn = 500) ve fosfat tamponlu salin (PBS) Sigma-Aldrich, ABD'den satın alındı. Sodyum hidroksit (NaOH) ve asetik asit, Merck, Almanya'dan getirildi. Doğal lif kabağı Kuzey Kıbrıs Türk Cumhuriyeti'nden temin edilmiştir. Dulbecco Modifiye Kartal Ortamı (DMEM), steril filtrelenmiş PBS ve fetal sıgır serumu (FBS), Cegrogen Biotech GmbH (Nordost, Almanya), L-glutamin ve Tripsin-etilendiamintetraasetik asit (EDTA) solüsyonundan (% 0,25, steril filtreli solüsyon) Sigma-Aldrich'den (Missouri, ABD), T-25 şişelerinden, 48 ve 96 oyuklu plakalar, SPL Life Sciences Inc.'den (Pocheon, Kore), Penisilin-Streptomisin (10.000 U / mL) Thermo Fisher Scientific'ten (Massachusetts, ABD) elde edilmiştir. Hücre sayımı ve canlılık yüzdesi hesaplamalarında kullanılan % 0,5 tripan mavi çözeltisi (Biological Industries, İsrail), kolorimetrik canlılık analizinde WST-1 Cell Proliferation Assay Kit (Cayman Chemicals, Michigan, ABD) kullanıldı. Bu çalışmada insan dermoblast (HDF) hücre hattı Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Laboratuvarından (ARLAB, İzmir) elde edilmiştir. Kemik iliği ve periost kökenli kök hücreleri primer kültür olarak kendi laboratuvarımızda dokudan izole elde edilmiştir.

5.1. Karboksimetil Kitosan (CMChT) Çözeltisinin Hazırlanması:

CMChT' nin saf suda çözülmesi ve oda sıcaklığında üç saat karıştırılmasıyla % 2.5 (w / v) CMChT çözeltisi hazırlanmıştır.

5.2. Lif Kabağı Hazırlanması:

Lif kabağı soyulduktan sonra ligninin arındırılması amacıyla oda sıcaklığında sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu (% 2 w / v) ile 90 dakika bekletilmiştir. Daha sonra nötr pH elde edilene kadar distile su ile yıkanıp vakumlu fırında 60°C'de 24 saat kurutulmuştur. Son olarak; takviye malzemesi olarak kullanılmak üzere lif kabakları keskin bir alet yardımıyla ufak ve eşit boyutlarda parçalara ayrılarak toz benzeri parçacıkların elde edilmesi sağlanmıştır.

5.3. Hidrojel İskele Üretimi:

İlk olarak, 0.02 gr nanohidroksiapatit (nHAp) ve 0.06 gr polietilenglikol (PEGDE) 4 ml CMCh solüsyonuna ilave edilmiş ve nHAp karışım içinde homojen olarak süspanse edilinceye kadar ultrasonik banyoda karıştırılmıştır. Daha sonra, 0.04 g kıyılmış lif kabağı lifi ilave edilmiş ve karışımın gece boyunca 40 ° C'de çapraz bağlanmasına izin verilmiştir. Çapraz bağlama reaksiyonunun sonunda, sünger formundaki üç boyutlu ve gözenekli doku iskeleleri, 2 gün boyunca 0.1 mbar basınç altında -25 ° C'de dondurarak kurutma işlemi (TELSTAR - LyoQuest - 85) ile elde edilmiştir. Üretilen iskele ve delikli numune Şekil 1'de gösterilmiştir.

5.4. Doku İskelelerin Karakterizasyonu:

İskelenin morfolojisi, *Taramalı Elektron Mikroskopu ((SEM) (JEOL JSM-6060))*, 5 kV'luk bir hızlanma geriliminde analiz edilmiştir. Doku iskelesi, analizden önce iletkenliğin sağlanması amacıyla ince bir altın / paladyum tabakası ile kaplanmıştır. Ayrıca iskele yüzeyinde Ca-P minerallerinin dağılımı ve varlığı enerji dağılımlı X-ışını spektroskopisi (EDX) haritalama analizleri ile araştırılmıştır.

İskelenin kimyasal yapısı 4 cm⁻¹ çözünürlükte 4000-650 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında *Fourier transform kızılötesi spektroskopisi (FTIR)* (Perkin Elmer Spectrum BX) kullanılarak ve numune başına 25 kez taranarak incelenmiştir.

Doku iskelelerinin şişme testi bir PBS solüsyonunda gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, kurutulmuş doku iskeleleri (n = 3) tartılmıştır (w₀) ve daha sonra 37 ° C'de 1, 24 ve 48 saat PBS'ye daldırılmıştır. Fazla su bir filtre kağıdı ile çıkarıldıktan sonra, şişen yapı iskeleleri tartılmıştır (w_s). Hidrojel iskelelerinin şişme oranı ve su içeriği değerleri sırasıyla aşağıdaki eşitliklere (1) ve (2) göre hesaplanmıştır.

$$\text{Şişme oranı (\%)} = \frac{(w_s - w_0)}{w_0} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Su içeriği (\%)} = \frac{(w_s - w_0)}{w_s} \times 100 \quad (2)$$

Doku iskelelerini biyomekanik analizi; bu amaçla mekanik basma dayanımları elektromanyetik aküatör ile 5 kN yüklenme altında 10 mm/dk hız ile ölçülerek elastik modül değerleri hesaplanmıştır.

5.5. İskelelerin Ön Biyouyumluluk Analizleri

Doku iskelelerinin ön biyouyumluluk analizleri, ilk olarak ARLAB' dan temin edilen pasaj 9 insan dermal fibroblast (HDF) hücre hattı ile gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla hücre ekimi yapılan iskelelerden 7 gün boyunca canlılık ve morfoloji analizleri yapılmıştır. Bunlara ek olarak 28 gün boyunca kemik iliği ve periost kökenli kök hücreler ekilmiş olan iskelelerden alkalen fosfataz(ALP) tayini, histolojik değerlendirmeler, canlılık analizi ve hücre tutulumu gösterilmiştir.

5.5.1. Hücrelerin İstenilen Sayıya Ulaştırılması

Hücreler tek tabakalı kültürler olarak T-25 flasklarında büyütülmüştür ve %80 yoğunluğuna ulaştığında pasajlanmıştır. Tutunan hücreler PBS ile yıkanarak Trypsin-EDTA solüsyonu ile pasajlanmıştır. Hücre süspansiyonu, 1200 rpm'de 5 dakika süreyle santrifüj edilerek (Hettich, Universal 32, Almanya), yeniden inkübe edilmiştir. Kültür ortamı, % 10 (v / v) FBS, %1 (v / v) L-glutamin ve % 1 (v / v) penisilin-streptomisin solüsyonu ile desteklenen Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) da büyütülmüştür. Ortam gün aşırı değiştirilerek % 5 CO₂ ve %95 nem içeren 37 ° C inkübatörde büyütülmüştür. Hücrelerin genel görünümleri bir inverted mikroskop (Olympus, CKX41SF, Tokyo, Japonya) kullanılarak gözlenmiştir.

5.5.2. Doku İskelelerinin Hücrelendirilmesi:

İskeleler 4 mm çapında ve 3 mm kalınlığında parçalar halinde bir biyopsi punch ile kesilmiştir. Etilen oksit kullanılarak sterilize edildikten sonra hücre kültürü öncesinde 48 saat havalandırılmıştır. Hücreler iskelelere ekilmeden önce tripsinizasyon ile kaldırılmış olup Thoma Lamı ve tripan mavisi ile sayılmıştır. Hücrelerin canlılık yüzdesi ve sayısı (3) formülü ile hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Canlılık} = (\text{Renksiz hücre sayısı}) / (\text{Toplam hücre sayısı}) \times 100 \text{ (3)}$$

$$\text{Alan Başına Ortalama Hücre Sayısı} = (\text{Alan Başına Hücre Toplamı}) / (\text{Alan Sayısı})$$

Doku iskelesi başına 7×10^4 hücre ekilerek tutunması için 2 saat beklenmiştir. Kültür ortamı eklenerek gerekli analizler için 37 °C' de inkübe edilmiştir.

5.5.3. Canlılık ve Proliferasyon:

Hücre canlılığı, üç tekrarlı olarak 1, 3, 5 ve 7 gün sonra WST-1 kolorimetrik test kullanılarak Synergy HTX çok modlu okuyucuda (Bio-Tek, Winooski, VT, ABD) 450 nm'de kit talimatlarına göre ölçülmüştür. Her kuyuya 10 ul WST-1 reaktifi (100 ul çözelti için 9: 1 oranında) ilave edilmiş ve 37 °C'de 2 saat inkübe edilmiştir. WST-1 deneyi, hücresel mitokondriyal dehidrojenazlar tarafından tetrazolyum tuzunun formazan aktivasyonuna dayanır. Canlı hücrelerin sayısındaki artış, mitokondriyal dehidrojenazların aktivitesinde bir artışa neden olur ve bu da oluşan formazan boyası miktarında bir artışa yol açar. Canlı hücreler tarafından üretilen koyu sarı formazan boyası, 450 nm'de absorbans ölçülerek ölçülebilir ve doğrudan hücre sayısı ile ilişkilendirilir

5.5.4. Hücre Morfolojisi Analizi:

Doku iskelelerinin morfolojisi SEM yardımıyla ölçülmüştür. İskeleler PBS ile yıkandıktan sonra % 4 paraformaldehit çözeltisi ile fikse edilmiş ve artan etanol konsantrasyonları (% 20, %50, %75, % 90, % 100) kullanılarak dehidrate edilmiştir. Vakum altında kurutulan iskeleler Bölüm 5.4' te tariflendiği üzere analiz edilmiştir.

5.6. Doku İskelelerinin Kemik İliği ve Periosttan Elde Edilen Mezenkimal Kök Hücreler İle Biyouyumluluk Analizlerinin Gerçekleştirilmesi

5.6.1 Mezenkimal Kök Hücre Eldesi ve Karakterizasyonu:

Periost Eldesi ve Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu:

Deney Hayvanlarından Periost Elde Edilmesi: Kırık hattı oluşturulmadan önce sıçarlardan periost elde edilmiştir. 10 ml/kg Xylazine ve 50ml/kg ketamin, sıçarlara intraperitoneal bölgeden uygulanarak anestezi sağlanmıştır. Lateral insizyon ile sağ tibianın görünen yüzünden 10x7 mm periost kambiyum dokusu bistüri ile kesilmiştir ve sıçarlara başka herhangi bir cerrahi işlem uygulanmadan kapatılmıştır. Elde edilen periost, steril koşullara uygun bir şekilde, Dokuz Eylül Üniversitesi, Biyomekanik Bölümü Hücre Kültürü Laboratuvarı' na getirilip hüce kültürü işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Periosttan Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu: Eksize edilen periost dokuları, 2 saat boyunca çalkalamalı inkübatörde 37 ° C' de % 0.02 klostridial kollajenaz ile muamele edilmiştir. Bu sürenin sonunda kollajenazı inaktive etmek için FBS içeren mediumla 1:1 oranında seyreltilen sıvı 1200 rpm ile 5 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant uzaklaştırılarak hücre pelletleri normal protokolda DMEM ve %10 FBS içeren büyüme ortamı ile sulandırılarak hücre kültür

kaplarına ekilmiştir. Büyüme ortamları gün aşırı değiştirilerek hücreler gerekli analizler için çoğaltılmıştır.

Kemik İliği Eldesi ve Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu:

Deney Hayvanlarından Kemik İliği Elde Edilmesi: Kırık hattı oluşturulmadan önce sıçanlardan kemik iliği aspirasyonu elde edilmiştir. 10 ml/kg Xylazine ve 50 ml/kg ketamin, sıçanlara intraperitoneal bölgeden uygulanarak anestezisi sağlanmıştır. Kemik iliği, 10 ml hacme sahip şırınganın ucundaki 18 gauge iğne yardımı ile sıçanların sol femorallerinden femur shaftına girilerek şırınga içerisindeki heparin ile süspanse edilerek alınmıştır.(72) Elde edilen kemik iliği, steril koşullara uygun bir şekilde, laboratuvara getirilerek hücre kültürü işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Kemik İliğinden Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu: Elde edilmiş olan aspirat falkon tüpüne aktarıldıktan sonra Ficoll-Paque üzerinde tabakalandırılarak 1650 rpm ile 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj işleminden sonra buffy-coat tabakası toplanarak PBS ile yıkama gerçekleştirilmiştir. Ardından pellet, büyüme ortamı ile seyreltilerek 25 lik flasklara ekilmiştir. Büyüme ortamları gün aşırı değiştirilerek hücreler gerekli analizler için çoğaltılmıştır.

Mezenkimal Kök Hücre'lerin Karakterizasyonları:

MKH'ler izole edildikten ve 3 kez pasajlandıktan sonra karakterizasyon analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla akım sitometri ve farklılaşma işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Farklılaşma kapasitelerinin araştırılması: Adipojenik, osteojenik ve kondrojenik hücrelere farklılaştırma için StemPro tarafından üretilen farklılaşma kitleri kullanılmıştır. Hücreler tripsinizasyon ile kaldırılıp sayımları Tripkan mavisi ile yapıldıktan sonra kuyucuklu plakalara ekilmiştir. Adipojenik (A1007001, Gibco), kondrojenik (A1007001, Gibco) ve osteojenik (A1007201, Gibco) farklılaşma için kit talimatlarına göre farklılaşma ortamları hazırlanmıştır. Kuyucuk başına 3×10^5 hücre olacak şekilde ekilen hücrelere yaklaşık 1.5 mL kültür ortamı eklenerek 37 ° C' de, % 90 nem, % 5 CO₂'de inkübe edilmiştir. 21 ile 28 gün boyunca, haftada bir kez medyumları değişecek şekilde büyümeleri takip edilmiştir. Adipojenik farklılaşma sonrası histoloji analizleri için 21 gün, osteojenik ve kondrojenik farklılaşma sonrası histoloji analizleri için ise 28 gün kültür süresi yeterlidir. Oil red O ile boyanarak adipojenik farklılaşma, Alcian blue ile boyanarak kondrojenik farklılaşma ve Alizarin Red-S ile boyanarak da osteojenik farklılaşmalar gösterilmiştir.

Akım sitometri analizleri: FACS Canto II akım sitometri cihazı ve Fax Diva Software programı kullanılmıştır. Elde edilen kök hücreler, hücre yüzey işaretleyici analizleri için, tripsinizasyon işlemi ile hücrelerin kaldırıldıktan sonra yıkama tamponundaki hücrelerin yeniden süspansiyon edilmesinin ardından sıçan antijenlerine karşı antikorlar ile değerlendirilmiştir. Bu amaçla kullanılan antikorlar fluorescein (FITC), phycoeritrin (PE), Allophycocyanin (APC), Alexa Fluor® 647, PerCP-Cy™5.5 ve Alexa Fluor® 488 etiketleri ile konjüge antikorlardan kullanılarak akım sitometri cihazı ile analizleri yapılmıştır. Kemik iliği ve periosttan izole edilen mezenkimal kök hücrelerin akım sitometri analizleri için kök hücrelere özgü pozitif ekspresyon yapabilen ve sıçana reaktif olan CD73, CD90 ve CD105 antikorlarına karşı analiz edilmiştir.(73) (74)(75) Bu analizler için Dokuz Eylül Üniversitesi Hematoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarından yararlanılmıştır.

5.6.2. Doku İskelelerine Kök Hücrelerinin Ekilmesi:

İzole edilen ve karakterizasyon işlemleri tamamlanan hücrelerin Bölüm 5.5.2’ de tariflendiği üzere ekimi gerçekleştirilmiştir. Önceden etilen oksitle sterilize edilerek havalandırılan doku iskeleleri periost ve kemik iliğinden elde edilen kök hücreler ekilmeden önce 48’ li plakalara ayrı ayrı gruplandırılmıştır. İn vitro analizler, pasaj 4 mezenkimal kök hücreler ile gerçekleştirilmiştir. Ekim işleminden sonra 28 günlük kültür süreci boyunca hücrelerin gerekli analizleri gerçekleştirilmiştir.

5.6.3. Canlılık analizi

Canlılık testleri hücre ekiminden sonraki 7, 14, 21 ve 28. günlerde kullanıma hazır WST-1 reaktifi (BioVision Inc.) kullanılarak üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Canlılık, 4- [3- 4-iodophenyl]- 2- (4- nitrophenyl)- 2H- 5- tetrazolium)- 1, 3- benzen disülfonat (WST-1) canlılık testi ile tayin edilerek, spektrofotometrik olarak 450 nm absorbans değerinde ölçülmüştür. Belirtilen zamanlarda eklenen WST-1 ile 2 saat 37 °C’de inkübasyon sonrasında, mikropilaya okuyucuda kit talimatlarına göre spektrofotometrik olarak ölçülmüştür. Bu deneyde, ölçülen absorbans canlı hücre sayısı ile doğru orantılıdır. Elde edilen sonuçlar Graphpad Prisma programı yardımıyla çizdirilerek gerekli kıyaslamalar gerçekleştirilmiştir.

5.6.4. Hücre Tutunması

Hücre ekiminden sonra 7. ve 28. günlerde doku iskeleleri %4 paraformaldehit ile fikse edildikten sonra PBS ile yıkanmıştır. Ardından dereceli alkol serilerinden geçirilip (%20, 40, 60,

80, 100 ve 100 olacak şekilde) desikatörde kurutulması sağlanan iskeleler bölüm 5.5.4’de anlatıldığı şekilde SEM analizi gerçekleştirilmiştir.

5.6.5 Alkalen Fosfataz (ALP) Analizi:

Hücrelerin ALP aktivitesi, yukarıda belirtilen günlerde bütün gruplarda ALP aktivite kiti (WAKO chemicals ELISA kit) ile ölçülmüştür. Öncelikle örnekler PBS yıkandıktan sonra kit tarifine uygun olarak kimyasallar ilave edilerek mikro plaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda 7, 14, 21 ve 28. Günlerde ölçümler alınmıştır.

5.6.6. Histokimyasal incelemeler

Doku iskeleleri mikroskopik incelemeler için %10’luk formaldehit solüsyonunda 2 gün süre ile fikse edildi. Akar çeşme suyu altında 1 gece rutin histolojik doku takibi protokolü aşamalarından geçirilerek parafin bloklara gömüldü. Elde edilen parafin bloklardan mikrotom ile polilizin kaplı lamlara 5µm kalınlığındaki kesitler alındı. Alınan parafin kesitler, deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60 °C’lik etüvde bekletildi. Ardından ilk olarak 20 dakika etüve daha sonra iki kere 10’ar dakikalık üç farklı ksilene tabi tutuldu. Rehidratasyon işlemi için azalan alkol derecelerinden (%96, %80, %70) geçirilip distile su aşamasına getirildi. Ardından doku iskelesi örneklerinin genel morfolojisini göstermek için Mayer’s Hematoksilen- Eozin, kollajen varlığını tespit etmek için Masson Trichrome, ekstraselüler matrikste glikozaminoglikan varlığını göstermek için Alcian Blue, proteoglikan varlığının tespiti için Safranin O/Fast Green boyamaları yapılarak değerlendirildi.

5.6.7. İmmünohistokimyasal incelemeler

İmmünohistokimyasal boyama Avidin- Biotin- Peroksidaz yöntemi (ABC Metodu) ile gerçekleştirildi. Doku iskeleleri içeriğindeki kolajen Tip I ve II yapıları; anti- kolajen Tip I ve anti- kolajen Tip II antikorları uygulanıp, doku iskelelerindeki protein ekspresyon lokalizasyonu gösterilerek immün- reaktivite şiddeti semi- kantitatif olarak değerlendirildi. Semi- kantitatif değerlendirmede; boyanma yok (0 değeri), %25’in altında zayıf boyanma (+1 değeri), %25- 50 arasında orta boyanma (+2 değeri), %50’den fazla kuvvetli boyanma (+3 değeri) şeklinde skorlandı(76).

5.7. Deney Hayvanlarında Femur Kırık Modeli Oluşturulması ve İyileşme Takibi:

Çalışmamızda 48 adet Wistar-Albino cinsi erkek rat (Dokuz Eylül Üniversitesi Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarı, İzmir) kullanılmıştır. Araştırma öncesi Dokuz Eylül Üniversitesi

Deneysel Hayvan Araştırma Laboratuvarı, Etik Kurulu'ndan araştırma için gerekli izinler alınmıştır.

Araştırmamız Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerekli izinler tamamlandıktan sonra yapılmıştır. Çalışmada kullanılan ratların ortalama ağırlıkları 350 gram (330-430 gram) olarak belirlenmiştir. Ratlar rastgele şekilde seçilerek 4 gruba ayrılmıştır. Her kafeste 2'şer hayvan olacak şekilde çalışmanın başından sonuna kadar takip edilmiştir. Operasyon öncesi ratlara sedasyon verilip sol femurları traşlanmıştır. İnsizyon bölgesi Povidon iyot ile boyanarak sterilize edilmiştir.

Grup 1 (n=12): Kırık iyileşmesinin kontrol grubu olarak değerlendirilmiştir. Wistar Albino sıçanlara hiçbir doku iskelesi ya da hücre tedavisi yapılmadan sadece periost sıyrılmadan kırık fiksasyonu gerçekleştirilmiştir. Literatür taraması yapıldığında kırık iyileşmesinde periost sıyrıldığı takdirde kaynamanın geciktiği bildirilmiştir(77)(78). Bu nedenle planlamış olduğumuz çalışmada sadece periostun sıyrıldığı kırık iyileşmesi grubuna ihtiyaç duyulmamıştır. Kontrol grubu olarak kemiğin doğal iyileşme sürecinin araştırılması hedeflenmiştir.

Grup 2 (n=12): Üretilen doku iskelesinin in vivo biyoyumluluk açısından kontrolü bu grupta gerçekleştirilmiştir. Herhangi bir hücre tedavisi uygulamadan, periost sıyrılarak sadece kırık hattına doku iskelesi yerleştirilerek Kirschner (K) teli ile kırık fiksasyonu yapılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Bu grupta, doku iskelesinin biyoyumluluğu ve iyileşme üzerine malzemenin etkilerinin olup olmadığının gözlemlenmesi amaçlanmıştır.

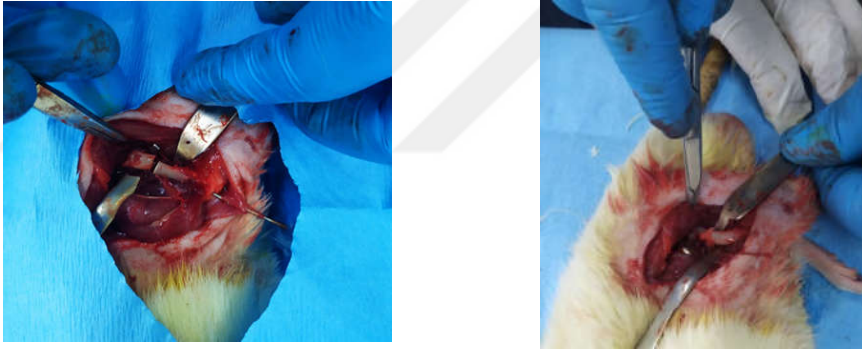
Grup 3 (n=12): Bu grupta sıçan kemik iliğinden Bölüm 5.6.1. tariflendiği üzere izole edilerek karakterizasyonları yapılmış olan mezenkimal kök hücreler doku iskelelerine ekilerek kırık hattına K teli ile fikse edilerek implante edilmiştir. Bu grupta, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler ekilmiş olan doku iskelelerinin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

Grup 4 (n=12): Bu grupta sıçan periosttan Bölüm 5.6.1. tariflendiği üzere izole edilerek karakterizasyonları yapılmış olan mezenkimal kök hücreler doku iskelelerine ekilerek kırık hattına K teli ile fikse edilerek implante edilmiştir. Bu grupta, periost kökenli mezenkimal kök hücreler ekilmiş olan doku iskelelerinin kırık iyileşmesi üzerine etkilerinin araştırılması hedeflenmiştir.

5.7.1. Deney Hayvanlarında Kırık Hattı Oluşturulması ve Fiksasyonu: Anestezi dozunun ayarlanması için her deney hayvanı ayrı ayrı tartılarak gerekli hesaplamalar yapılmıştır. 50 mg/kg

Ketamin (Ketalar, Pfizer) ve 10 mg/kg Xylazine (Rompun, Bayer) dozunda kombine edilerek kullanılmıştır. Anestezik karışım intraperitoneal yoldan uygulanmıştır. Sol femur bölgesi traş edildikten sonra batıconla boyanarak temizlenmiştir. 2 cm lik lateral insizyonla vastus lateralis ekarte edilerek sol femur ve diz orta şaftına mikrosirküler testere yardımı ile transvers bir kesi yapılarak 4 mm'lik açık kırık modeli oluşturulmuştur.(74)-(79). Daha sonra 1 mm Kirschner teli (Hipokrat®, İzmir, Türkiye) ile intrameduller tespit sağlanarak katlar usulüne uygun bir şekilde (cilt 2-0 ipek suture ile, Sterisilk®, Türkiye) kapatılmıştır.(80)

5.7.2. Doku İskelelerinin İmplantasyonu: Grup 2, 3 ve 4 için kırık oluşturulup fikse edildikten sonra yukarıda anlatıldığı üzere 4 mm lik osteotomi sonrası aradaki boşluğa doku iskelesi sıkıştırma yoluyla yerleştirilmiştir. Doku iskeleleri şişme özelliğinde olduğu için ek bir yapıştırıcıya gerek duyulmamıştır. Bu işlemlerden sonra insizyon hattı usulüne uygun kapatılıp uygun antibiyotik ve analjezi verilerek 8 hafta takip edilmiştir.

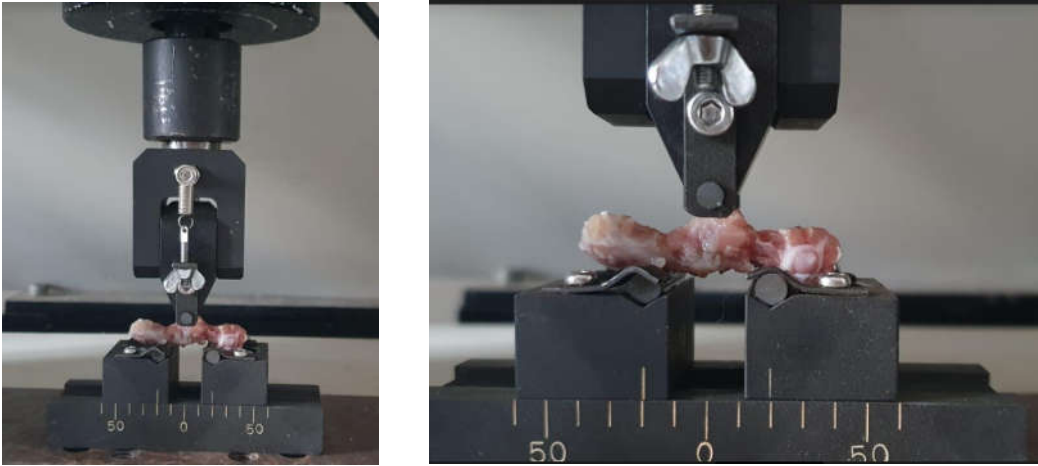


Şekil-8: Ratların Kirschner teli ile yapılan osteotomu sonrası fiksasyonu

5.7.3. Deney Hayvanlarının Sakrifikasyonları: Deney hayvanları 8.haftada yüksek doz anestezik (Ketamin-Ksilazin) kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Sol femurlar ligamentum teresten kesilerek yumuşak dokudan arındırılmıştır. Elde edilen örnekler, analizler için gerekli protokollere uygun koşullarda saklanmıştır. Sakrifiye edilen her grupta; 3 nokta bending, mikroCT, histolojik boyamalar ve immünohistokimyasal incelemeler için gerekli testler gerçekleştirilmiştir. Bunlara ek olarak mekanik testler için ayrılan örneklerden direkt grafi ile radyolojik incelemeler yapılarak kırık hattı gözlemlenmiştir.

5.7.4. Deney Hayvanlarından Elde Edilen Dokuların Biyomekanik Analizleri:

Biyomekanik incelemeler Dokuz Eylül Üniversitesi Biyomekanik Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. *3 nokta eğme analizleri* için her deney grubundan rastgele seçilen 5'er adet sıçan femuru kullanılmıştır. Bu amaçla, özel eğme çeneleri yardımıyla üç nokta eğme testi uygulanmıştır. Eğme çeneleri arası mesafe ASTM E290-14 standartının önerdiği $C=2r+3t \pm t/2$ formülü kullanılarak ve ortalama kemik boyu göz önünde tutularak 16 mm olarak belirlendi. C çeneler arası mesafe, r mandrel çapı, t numunenin çapı, olarak alınıp hesaplamalar gerçekleştirilmiştir. Keskin köşelerin oluşturabileceği hatalardan sakınmak için her bir köşeye R1,5mm pah açılmıştır. Eğme deneyi, oda sıcaklığında, $\pm 0,1$ ölçüm tamlığında ve 2-2500 Newton güç aralığında test edilmiştir. Çeneler üzerine yatay olarak yerleştirilen numunenin tam orta noktasından mandrel, dik olarak, 10mm/dk ilerleme basma kuvvetini numune kırılana kadar uygulanmıştır. Biyomekanik deney sonrasında kırılmanın meydana geldiği kuvvet tespit edilerek deney sonlandırılmıştır.(81) Her grup için program ara yüzünden temin edilen kuvvet uzama eğrileri kıyaslanmıştır. Sakrifiye edilen ratların femurları her gruptan alınan örneklerle Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyomekanik Anabilim Dalı'nda biyomekanik test için hazırlanmıştır.



Şekil-9: Shimadzu cihazında testleri yapıldı

Biyomekanik Anabilim Dalı'nda Elektromanyetik aküatör cihazı (5 kN AG-X; Shimadzu, Kyoto, Japan) ile kuvvet uzama eğrileri hesaplanmıştır. Testler süresince örnekler serum fizyolojik içinde tutularak, nemli kalmaları sağlanmıştır. Elde edilen sonuçlar Graphpad Prisma programı yardımıyla çizdirilerek gerekli kıyaslamalar gerçekleştirilmiştir.

5.7.5 Radyolojik Değerlendirme

Sakrifiye işleminden sonra, femur kalça ve diz ekleminden düzgün şekilde ayırarak çıkarılmıştır. Direkt grafi ve mikro-bilgisayarlı tomografi (MikroCT) işlemine kadar saline içeren kaplarda dondurulmuştur. Direkt grafi için her gruptan bir deney hayvanı değerlendirilmek üzere Dokuz Eylül Üniversitesi Radyoloji Anabilim dalından yararlanılmıştır. MikroCT işlemi için ise her gruptan ikişer deney hayvanı değerlendirilmek üzere Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (Ege Matal) Laboratuvarları'ndan hizmet alımı yapılmıştır.

MikroCT taraması amacıyla; 250 µA'lık bir tarayıcı yardımıyla, 75 kVp enerji ile ve her 1250 ms'de taranan örneklerden veriler toplanmış ve bir arayüz yardımı ile yumuşak doku ve mineralize doku ayrımı gerçekleştirilmiştir.

5.7.6 Histolojik incelemeler:

Histolojik yöntemler ile Kirshner teli ile implante edilen femur kemiği histolojisi araştırıldı. Dokular, formalin ile fikse edildikten sonra, formalinin uzaklaştırılması amacı ile 1 gece akarsu altında yıkandı ve 20'şer dakika %70'den %96'ya doğru artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidre edildi. Bu işlemi takiben, 20'şer dakika 4 değişim aseton solüsyonundan geçirildikten sonra 2 değişim xylolde 30'ar dakika bekletildi. Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirilerek dokular son olarak parafine gömüldü. Dokular dondurulduktan sonra kesitleri mikrotom (RM 2255, Leica) ile alınarak hematoksilin/ eozin ile boyandı. Dokuların genel morfolojik görüntüleri ışık mikroskobunda (Olympus DP71) incelendi. Femur kemik kırığının histolojik olarak değerlendirildi(82). Ardından örnekler; dokunun genel morfolojisini göstermek için Mayer's Hematoksilin- Eozin, kollajen varlığını tespit etmek için Masson- Trichrome, ekstraselüler matrikste glikozaminoglikan varlığını göstermek için Alcian Blue boyamaları yapılarak değerlendirildi.

5.7.7. İstatistiksel Analiz

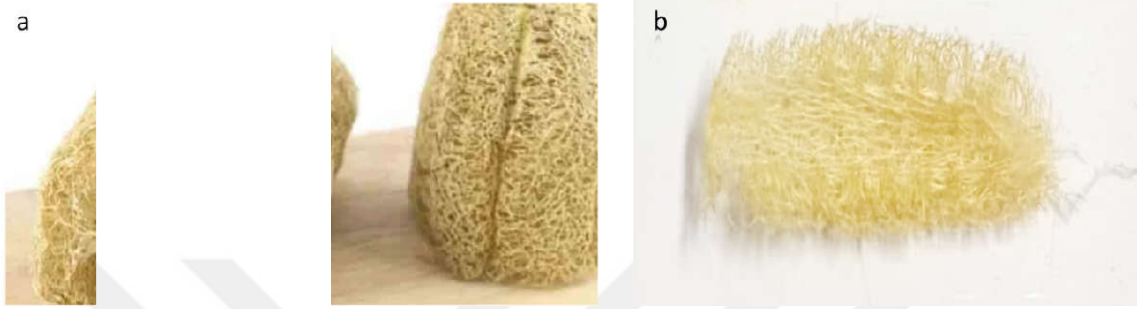
Verilerin değerlendirilmesinde Graphpad Prisma programı kullanılmıştır. İn vitro biyoyuymululuk testleri ile mekanik çalışmalardan elde edilen veriler ortalama± standart sapma ile verilmiştir. Gruplar arasındaki farklılıklar ve gruplardaki zamana göre değişimler one-way ANOVA ile test edilerek fark bulunduğunda Tukey oklu Karşılaştırma Testi uygulanmıştır. İstatistiksel kararlarda; $p < 0.05$ istatistiksel farklılığın göstergesi olarak kabul edilmiştir. Deney grupları arasında, histolojik ve radyolojik incelemelerden elde edilen sonuçların kontrol grubu ile kıyaslanması sağlanarak çalışmanın uygunluğu kendi içerisinde tartışıldı.



6. BULGULAR:

6.1. Doku İskelelerinin Oluşturulması:

Doku iskelesinde kullanılmakta olan lif kabakları Şekil- a ve b olarak gösterilmiştir.



Şekil-10: Lif kabağı (a) soyulmuş ve işlenmemiş ve (b) yıkama işleminden sonraki hali

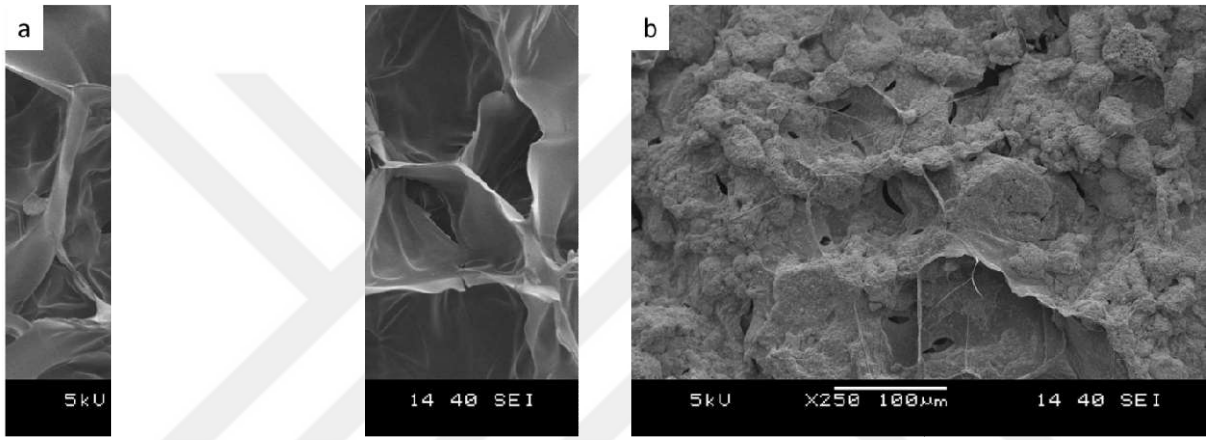
Lif kabağı+ CMCh+ HAp doku iskelelerinin PEGDE ile çapraz bağ oluşturulmuş görüntüsü ile 4 mm çap ve 3 mm yükseklikte kesilmiş iskeleler Şekil-11’ de gösterilmiştir.



Şekil-11: Üretilen doku iskelesi ve hücre ekimine uygun boyutlara getirilmiş hali

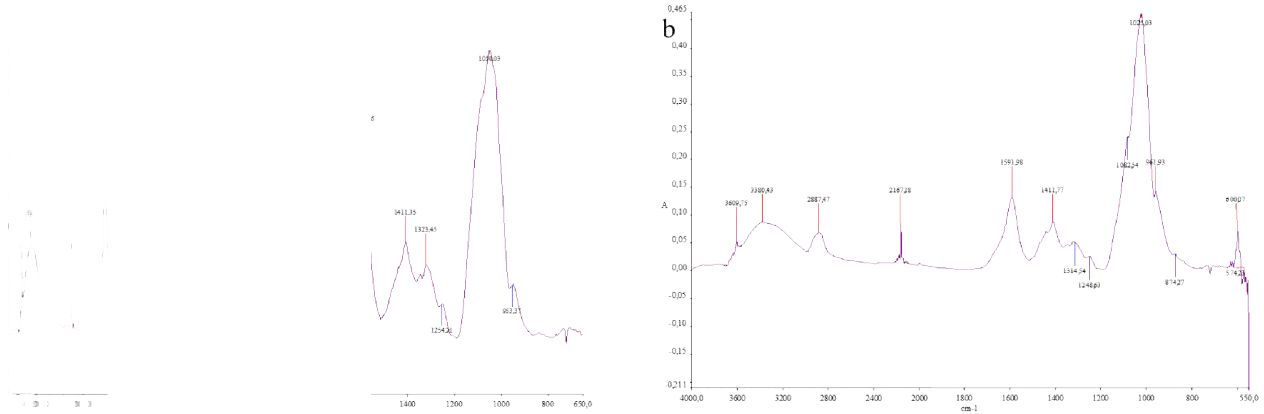
6.2. Doku iskelelerinin karakterizasyonu:

SEM ile morfoloji analizi: 250X büyütme ile şekilde doku iskelesinin sünger ve HAp yoğunluklu kısımlarının görüntülenmesi verilmektedir. Şekil a sünger yoğunluklu kısmın açık gözenekli yapıda olduğu ve bu sayede hücre tutunmasına imkan verdiği görülmektedir. Ayrıca şekil b de HAp' lerin yüzeye dağıldığı aralarını CMChT fiberlerinin doldurduğu görülmektedir. Bu nano yapıda malzeme dağılımı da hücre tutunmasına olanak sağlamaktadır.



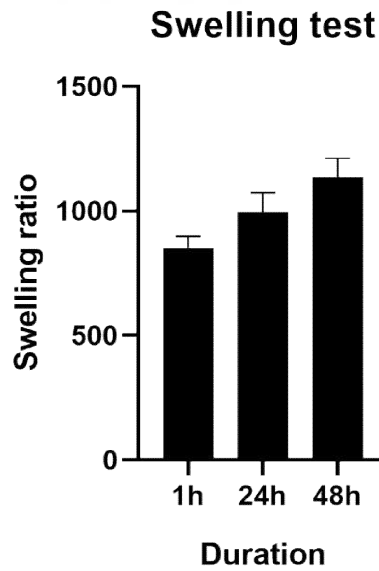
Şekil-12: SEM yardımıyla (a) sünger yoğunluklu (b) HAp yoğunluklu

Hazırlanan doku iskelelerinin kimyasal karakterizasyonu için gerçekleştirilen FTIR analizlerinin sonuçları grafiklerde belirtilmiştir. CMChT + nHAp + lif kabağı doku iskelesinin FTIR analizlerinin sonuçları grafiklerde verilmiştir. Sünger yoğunluklu kısım ile HAp yoğunluklu kısımlar ayrı ayrı gösterilmiştir. Bu durum lif kabaklarının ve HAp ağırlığının görece daha yüksek olmasından ve kurutma işlemi sırasında çökmesinden kaynaklanmaktadır.



Şekil-13: FTIR analizi ile kimyasal yapının (a) sünger yoğunluklu (b) HAp yoğunluklu kısım analizi

Doku iskelelerinin şişme testleri bölüm 5.4’de anlatıldığı gibi yapılmıştır, bu amaçla iskelelerin kuru ağırlıkları ve PBS içerisinde 1, 24, 48 saat bekletildikten sonra ıslak ağırlıkları tartılarak şişme oranları belirlenmiştir. şişme testi sonuçları 1, 24 ve 48. saatler için sırası ile; 850,06 ($\pm 47,72$), 995,21($\pm 77,68$), 1135,33($\pm 76,24$) olarak bulunmuştur.Sonuçlar Graphpad Prism 7 ile çizdirilerek verilmiştir.(Grafik-1)



Grafik-1: Doku iskelerinin şişme testi

Oluşturulan doku iskeleleri basma testi yapılarak biyomekanik olarak elastik modulu ölçümü yapılmıştır. Ortalama elastik modül değerleri ile maksimum stress- strain değerleri tablo-1’ de verilmiştir.

Tablo-1: Scaffold basma testi ile dayanıklılık – elastik modulus ölçümleri

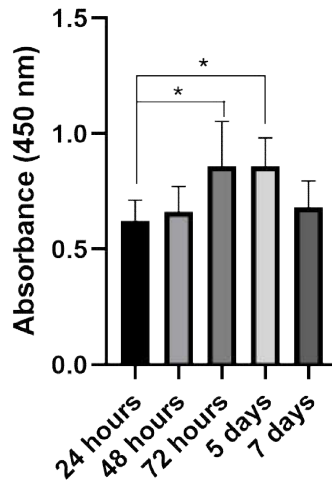
In vitro biyomekanik analiz	Stress (Mpa)	Strain (a.u.)	Elastic Modulus (Mpa)
Scaffold basma testi	2,35	13,525	5,755319149

6.3. Doku İskelelerinin HDF ile ön Biyouyumluluk Analizleri

Canlılık analizi

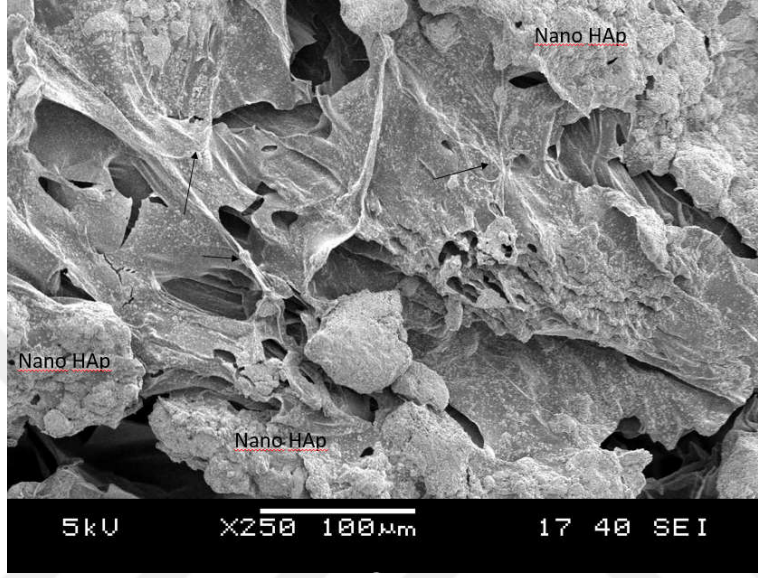
Doku iskelelerinin ön biyouyumluluk analizi iskelelere insan fibroblast dokusu ekilerek canlılık analizleri, 1. 2. 3. 5. ve 7. günlerde WST-1 solüsyonu ile gerçekleştirilmiştir. WST-1 analizlerinin sonuçlarına bakıldığında; ön biyouyumluluk analizlerini yaptığımızda 3 ve 5. günlerde elde edilen sonuç; diğer günlere göre daha fazla çıkmıştır. Buna karşın 3- 5. günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamaktadır. (Grafik-2)

Viability Analysis by HDF

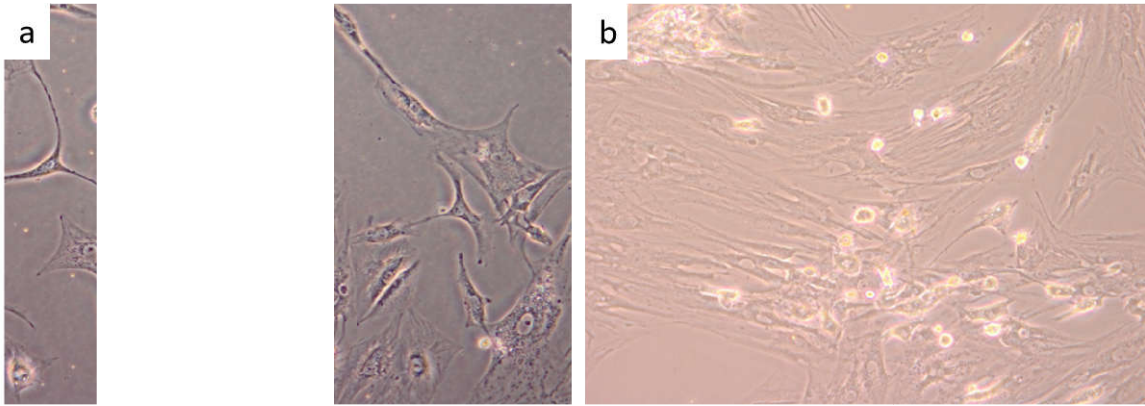


Grafik-2: HDF WST-1 Analizi

7. Günde doku iskelelerinin morfolojisi taramalı elektron mikroskopunda değerlendirilmiştir. Hücrelerin doku iskelelerine tutularak yüzeye yayıldığı görülmüştür (Şekil-16)

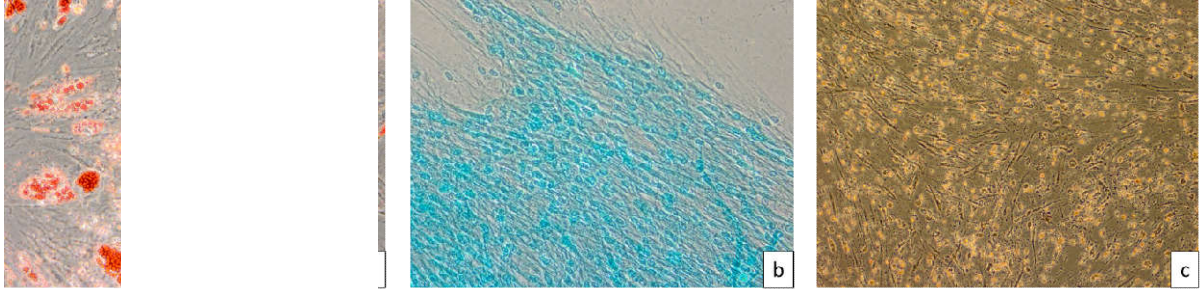


Şekil-14: HDF ekilen doku iskelelerinin 7. gün morfolojisi

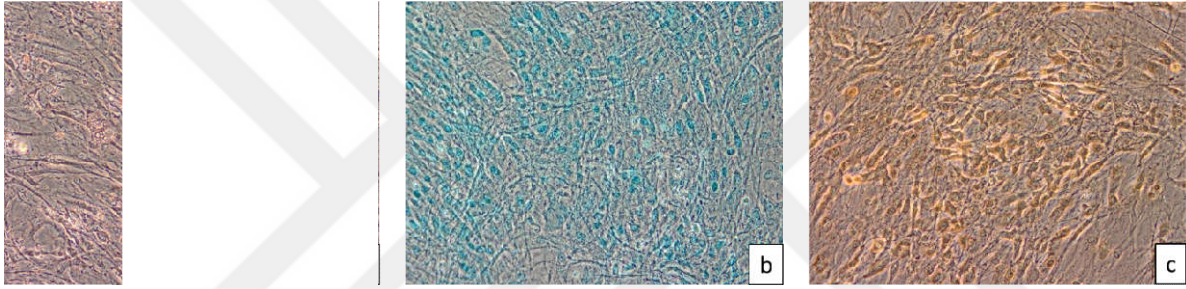


Şekil-15: Primer kültürün 14. Gününde (a) kemik iliği (b) periost kökenli kök hücrelerin görüntüsü

Farklılaşma analizleri:



Şekil-16: (a) Adipojenik (Oil Red O), (b) Kondrojenik (Alcian Blue) (c) Osteojenik (Alizarin Red S) farklılaşmaların histolojik boyamalar sonucu kemik iliği kökenli kök hücrelerde inverted mikroskop ile gösterilmesi (20x büyütme ile)



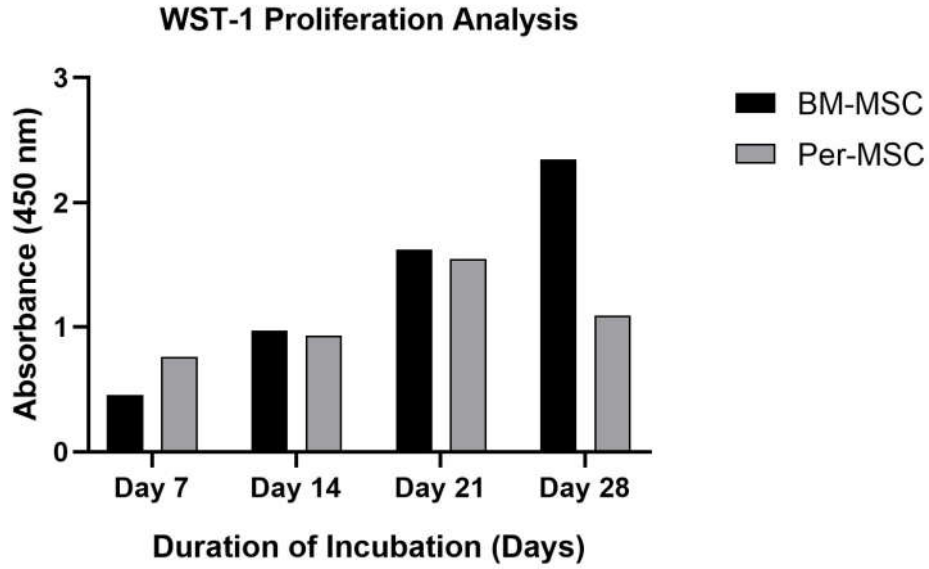
Şekil-17: (a) Adipojenik (Oil Red O), (b) Kondrojenik (Alcian Blue) (c) Osteojenik (Alizarin Red S) farklılaşmaların histolojik boyamalar sonucu periost kökenli kök hücrelerde inverted mikroskop ile gösterilmesi (20x büyütme ile)

Yapılan boyamalar sonucunda bu hücrelerin 3 farklı dokuya (adipojenik, kondrojenik, osteojenik) farklılaşma kapasitesinin olduğu ve elde edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliği gösterdiği sırasıyla Oil Red O, Alcian Blue, Alizarin Red S boyalarıyla görülmektedir.

Akım sitometri:

Yapılan akım sitometri analizleri sonucunda CD73, CD90 ve CD105 pozitif belirteçlerine karşılık sırasıyla kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücreler için %95.7, %95.5, %87.4 bulunurken periost kökenli mezenkimal kök hücreler için %99.1, %99.3, %93.6 bulunmuştur. Yapılan analizler iki farklı kaynaktan izole edilen hücrelerin mezenkimal kök hücre özelliğini gösterdiğini belirtmektedir.

Ön biyoyumluluk analizleri sonrası esas biyoyumluluk analizleri için kemik iliğinden elde edilen kök hücreler (BM-MSc) ve periosttan elde edilen kök hücreler (Per-MSc) WST-1 Proliferasyon analizi yapılmıştır. (Grafik-3)



Grafik-3: BM-MSc ve Per-MSc WST-1 Proliferasyon analizi

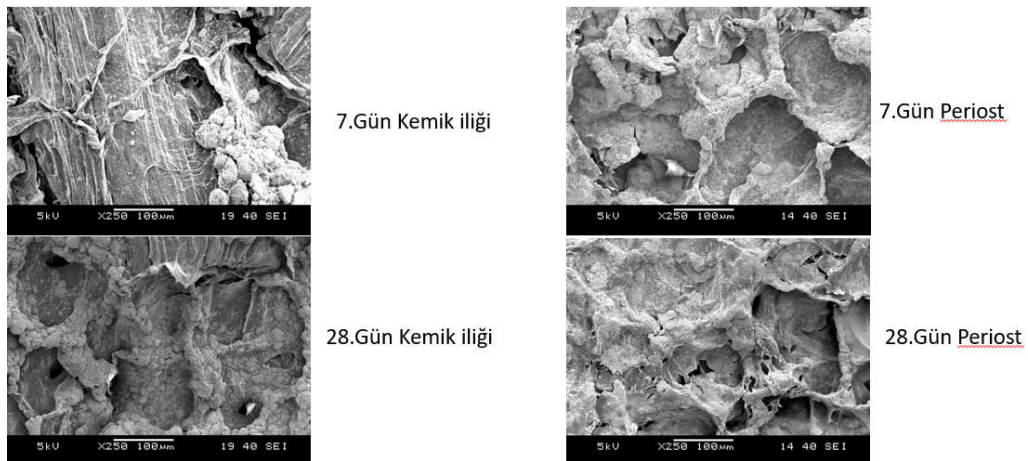
Kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin canlılık analizi sonuçları periostan elde edilen kök hücrelere göre daha yüksek değerlerde görünmektedir. BM-MSc için absorbans değerinde parabolik bir artış 28 gün boyunca devam etmekteyken Per-MSc için 21. Günden sonra istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir düşüş söz konusudur. BM-MSc ve Per-MSc için 7, 14, 21 ve 28. Günlerde gerçekleştirilen ANOVA analizi sonucu elde edilen istatistik değerleri aşağıdaki tabloda sunulmuştur.(Tablo-2)

Tablo-2: BM-MSC Per-MSC Hücrelerin 7, 14, 21 ve 28. Günlerinin karşılaştırılması

Tukey's multiple comparisons test	Significant?	Summary	Adjusted P Value
BM-MSC			
Day 7 vs. Day 14	Yes	*	0,0201
Day 7 vs. Day 21	Yes	**	0,0017
Day 7 vs. Day 28	Yes	***	0,0003
Day 14 vs. Day 21	Yes	*	0,0409
Day 14 vs. Day 28	Yes	**	0,0012
Day 21 vs. Day 28	No	ns	0,1543
Per-MSC			
Day 7 vs. Day 14	No	ns	0,4759
Day 7 vs. Day 21	Yes	**	0,0034
Day 7 vs. Day 28	No	ns	0,1248
Day 14 vs. Day 21	Yes	*	0,0326
Day 14 vs. Day 28	No	ns	0,2619
Day 21 vs. Day 28	No	ns	0,1825

6.3.3. Hücre Tutunması:

Doku iskelelerine hücrelerin tutunmaları, taramalı elektron mikroskobu yardımıyla 250x büyütmede 7. ve 28. günlerde gösterilmiştir. Hücrelerin yoğunluk açısından 28. günde, 7. güne kıyasla her iki iskele için de daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, hücreler yuvarlak morfolojiyi kaybederek 28. Günde iskele gözeneklerine yayılma özelliği göstermeye başladığı ve yüzeyi kapladığı görülmektedir.



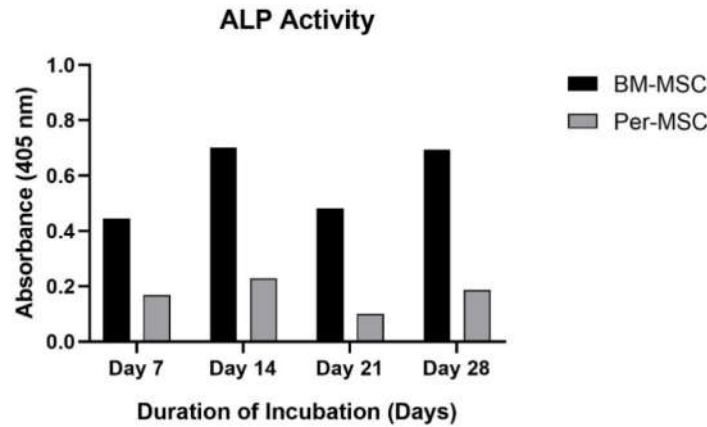
Şekil-18: **a.** kemik iliği ve **b.** periost kökenli doku iskelelerinde 7. Ve 28. Günde Taramalı Elektron Mikroskobunda Görüntüleri

Yine BM-MSC ve Per-MSC hücrelerinde yapılan ALP analizi sonuçlarına göre; kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin ALP analizi sonuçları periosta göre daha yüksek değerlerde görülmektedir.(Grafik-4)

İstatistik değerleri aşağıdaki tabloda mevcuttur.(Tablo-3) Bir artıp bir azalan davranış bu analiz için normaldir.

BM-MSC için 7-14, 7-28 ve 14-21 gün için istatistiksel olarak anlamlı bir fark (**** $p<0,0001$) bulunmuştur. Ayrıca 21-28. Günler arasında yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark (** $p<0,001$) vardır. Diğer günlerde anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Per-MSC için sadece 14-21. Günlerde anlamlı bir fark (* $p<0,1$) bulunurken diğer günler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır.



Grafik-4: BM-MSC ve Per-MSC hücrelerinde yapılan ALP analizi sonuçları

Tablo-3: BM-MS C ve Per-MS C hücreslerinde yapılan ALP analizi sonuçları

Tukey's multiple comparisons test	Significant?	Summary	Adjusted P Value
BM-MS C			
Day 7 vs. Day 14	Yes	****	<0,0001
Day 7 vs. Day 21	No	ns	0,7752
Day 7 vs. Day 28	Yes	****	<0,0001
Day 14 vs. Day 21	Yes	****	<0,0001
Day 14 vs. Day 28	No	ns	0,9979
Day 21 vs. Day 28	Yes	***	0,0001
Per-MS C			
Day 7 vs. Day 14	No	ns	0,4502
Day 7 vs. Day 21	No	ns	0,3400
Day 7 vs. Day 28	No	ns	0,9719
Day 14 vs. Day 21	Yes	*	0,0181
Day 14 vs. Day 28	No	ns	0,7105
Day 21 vs. Day 28	No	ns	0,1675

6.3.4 Histokimyasal incelemeler:

Immunhistokimyasal inceleme

6.3.5. Doku İskelelerinin in vivo Biyouyumluluk Analizleri:

Lif kabağı temelli periost ve kemik iliğı kökenli kök hücreli doku iskelelerinin hayvan modeli oluşturarak karşılaştırdığımız çalışmamızda; 48 adet Winstar Albino rat kullanılmıştır. Yapılan cerrahi işlem sonrasında ve 8 haftalık takip süresinde, ratlarda kilo kaybı, beslenmeme, anormal davranışlar gibi çalışmadan çıkarılmayı gerektirecek bir bulguya rastlanmamıştır. Postoperatif dönemde, ratların femurunda ısı artışı, kızarıklık, akıntı gibi enfeksiyon bulguları gelişmemiştir. Tüm ratların yara yerleri bir problem olmadan iyileşmiştir. Çalışmamızda deney hayvanlarında kayıp yaşanmamıştır. Deney hayvanlarının sakrifikasyonu sonrası, makroskopik bakıda normal doku iyileşmesi görülmüş; herhangi bir inflamasyon bulgusu saptanmamıştır.

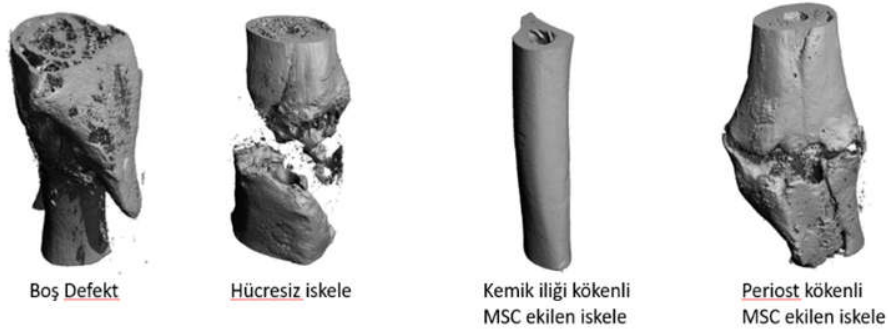
6.3.6. Radyolojik Değerlendirme

Radyolojik değerlendirme için alınan örnekler, femur ve tibia gövdesinden kesilip, diz eklemi korunarak çıkarıldı. Direkt grafi incelemesi sonucunda Per-MS C ekilmiş doku iskelesi grubunun diğerlerine göre daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. BM-MS C ekilmiş doku iskelesi grubunda da kallus dokusu olduğu görülmektedir. Her gruptan rastgele birer deney hayvanı seçilerek bu analiz gerçekleştirildiği için kesin bir sonuca tek veri kullanılarak varmak mümkün olmayacaktır.



Şekil-19: Direkt grafi ile 4 gruptaki iyileşme görünümü

Ege Üniversitesi Merkezi Araştırma Test ve Analiz Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (Ege Matal) Laboratuvarları'nda mikroCT hizmet alımı yoluyla kırık iyileşmesi değerlendirilmiştir. Alınan görüntüler, RadiAnt DICOM Viewer Programı'na yüklenerek ölçümler gerçekleştirildi. Yapılan değerlendirmede hüresiz doku iskelelerinin kırık iyileşmesine görüntülerde katkısı son derece düşük değerdedir. Kallus oluşumu son derece az ve sınırlıdır. Periostu sıyırmadan bıraktığımız Kirschner teli stabillediğimiz grupta kallus dokusu sınırlı olarak oluşmuştur. BM-MSK' de ise düzgün bir kallus dokusu oluşmakla beraber kemikte remodülasyon bulguları görülmektedir. Per-MSK' de ise kallus dokusu oluşumunu hızlandırdığı görülmektedir. BM-MSK' ye göre geride kalmış bir iyileşme söz konusu iken periostu sıyrılmamış gruba göre ise iyileşme daha iyi görülmüştür. Kök hücre konulan doku iskelelerinin kırık iyileşmesinin radyolojik değerlendirmede önde olduğu görülmüştür.

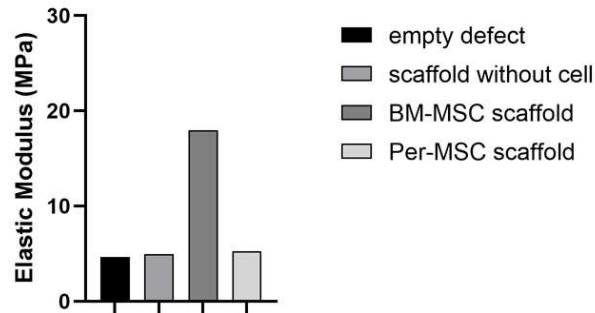


Şekil-20: Mikro-CT ile deney gruplarına yapılan değerlendirme

6.3.7. Biyomekanik Değerlendirme

8. haftada elde edilen dokulara bölüm 5.12.4.'de anlatıldığı üzere gerçekleştirilen biyomekanik analiz sonuçları verilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde; Lif kabağı temelli periost ve kemik iliği kökenli kök hücreli doku iskelelerinin biyomekanik labaratuvarında basma kuvvetine maruz bırakıldı. Elastik modulus ölçümü yapılarak tablo ve grafik oluşturuldu. Grupların sırasıyla ortalama elastik modulu; 4.64 Mpa, 4.93Mpa, 17.93Mpa ve 5.22Mpa olarak ölçüldü. BM-MSC' nin elastik modulusunun en yüksek olduğu görüldü. Femur kırık iyileşmesinin ve kallus dokusunun BM-MSC grubunda daha iyi geliştiği değerlendirilmiştir.

In vivo Biomechanical Analysis



Grafik-5: Grupların in vivo biyomekanik analizi

7.TARTIŞMA:

Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada, doku mühendisliği uygulamaları için 3- boyutlu gözenekli Lif Kabağı+ Karboksimetil Kitosan(CMChT)+ HAp doku iskeleleri üretilmiştir. Doku iskelelerimizin temeli olan lif kabağı; düşük maliyet ve doğal malzeme olması nedeniyle seçilmiştir. Ayrıca, lif kabağının, doku mühendisliği alanında, yüksek biyouyumluluğu ve mekanik özellikleri nedeniyle birçok çalışmada uygulandığı görülmüştür. Bal ve ark. yapmış olduğu çalışmada kullanılan lif kabağının düzensiz ve gözenekli yapısının olması biyomalzemeler arasında önemli özelliklerindendir.(83) (84).

Doğal polimerik bir biyomateryal olan kitin/kitosan çözücüsü asetik asit olan, doku iskelesi üretiminde en çok tercih edilen malzemelerdendir(85). Bir doku iskelesinde bulunması gereken özelliklerin başında biyobozunurluk, gözeneklilik, biyouyumluluk, hücre tutunmasına ve büyümesine imkan veren yapıda olmak, biyoaktiflik vb. sayılabilir. Bu özelliklere ek olarak kitin/kitosan antimikrobiyal özellikte, düşük toksisite ve immünojenitede bir biyomalzemedir (86). Bu nedenle, kitosan son yıllarda çeşitli biyomedikal uygulamalar için sıklıkla tercih edilmektedir. Ayrıca kitosan, üç boyutlu hidrojel doku iskelelerinin biyouyumluluğunu ve bağışıklık uyarıcı aktivitelerini geliştirmek için bileşenlerden biri olarak da kullanılabileceği gibi ilaç enkapsülasyonu, yara örtüsü vb. birçok farklı alanda tercih edilmektedir(87).

Chao Xu ve ark. yaptıkları çalışmalarda, CMChT' nin doku iskelelerine hücrelerin yapışmasını kolaylaştırdığı, antioksidan, biyouyumlu, biyobozunur ve antibakterial olduğu gösterilmiştir(88)(89). Ancak suda ve organik çözücülerde çözünürlüğü kısıtlı olduğundan kitosanın kullanımı sınırlı olmuştur(90). CMChT'nin kitosandan farkı, nitrojen veya oksijen atomuna bağlı karboksimetil grubudur. Bunun sayesinde suda çözünürlüğü, iyi biyoaktivitesi ve iyi biyouyumluluğu önemli bir türev haline gelmiştir(91).

HAp genellikle; kemik onarımı ve kemik rejenerasyonu gibi biyomedikal uygulamalarda polimerlerle kompozit olarak ortopedik alanlarda ve diş implantı alanlarında kullanılmaktadır. Tıbbi uygulamalarda yaygın kullanımının asıl nedenleri, kemik mineraliyle benzerliği, biyouyumluluğu ve osteokondüktif özellikleridir(92). HAp polimeri, kalsiyum fosfat birleşimine benzer yapıda olduğu için doku iskelesine sertlik kazandırmaktadır. Literatürde Liao ve ark. yapmış olduğu çalışmada doku iskelelerinin karakterizasyonunda biyomekanik sonuçlar incelendiğinde; HAp ile doku iskelelerinin elastik modüllerinin kemik yapısı ile benzer olduğu görülmektedir(93). Özellikle HAp nanoHAp partikülleri haline getirilmesi kemiğin

mineralizasyonu, sertliği ve osteokondüktif özelliğini artırmaktadır(94). Oluşan bu partiküllerin boyutunun kemikteki mineral boyutuna ulaşması da iyileşme sırasında kemik hücrelerinin tutunmasını ve çoğalmasını artıracaktır. Webster ve ark. geleneksel mikron boyutlu seramik malzemelere kıyasla nano boyutlu seramik malzemeler üzerinde protein absorpsiyonu ve osteoblast yapışmasında önemli bir artış göstermiştir(95)(96).

Hidrojeller ekstraselüler matriks ortamında hidrofilik yapıda olması ve şişme kabiliyeti yüksek yapıda olması nedeniyle kemik doku mühendisliğinde kullanılmaktadır.(97). Poly (ethylene glycol) diacrylate PEGDE hidrojelleri, doku mühendisliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılan biyolojik olarak inert, hidrofilik polimerik ağlardır(98). Bu polimer, beyaz ışığa maruz bırakılarak çapraz bağlanır, böylece hücreler çapraz bağlama sırasında termal toksisite riski olmadan çoğaltılabilir. PEGDE hidrojellerinin gözenekli ağı, gazların ve besinlerin difüzyonuna izin vererek, kapsüllenmiş hücrelerin canlı kalmasına izin verirken, kapsüllenmiş hücreleri bağışıklık sistemi tarafından temizlenmekten korur(99). Poly (ethylene glycol) diacrylate (PEGDE) iskelede hafif çapraz bağlanma ile stabiliteyi korumayı amaçlar. Böylece kök hücrelerin doku iskelesinde canlılığını artırarak yoğunlaşmasına da katkıda bulunur(100).

Çalışmamızda, doku iskelelerinin, taramalı elektron mikroskopunda çeşitli büyütme altında görüntüleri alınmıştır. Doku iskelelerimizin 250x büyütme altında görüntüleri incelendiğinde; lif kabağı liflerinin, Yu Yang ve ark. yaptığı çalışmada, NaOH ile işlem gören lif kabağının SEM görüntülerine benzer görünümde olduğu görülmektedir(101). Ayrıca, yine bu görüntülere bakıldığında; kitosan ve HAp ile elde edilen doku iskelesinin de başarılı olduğu görülmektedir. Yine görüntüler incelendiğinde; lif kabağı yüzeyinin, bu yöntem sayesinde, hücre tutunmasına uygun bir yüzey haline getirildiği görülmüştür. Gözenekli yapısı sayesinde tutunmayı artırarak hücre yoğunluğunun artışı sağlamaktadır.

Oluşturduğumuz lif kabağı doku iskelelerinin kimyasal yapılarını incelemek için FTIR analizi yapılmıştır. Lif kabağı+ HAp + CMChT oluşmaktadır. FTIR analizi sonuçlarımız literatürle karşılaştırıldığında, yapılan çalışmalarla benzer piklerin ortaya çıktığı görülmektedir(102)(103). Kitosan için karakteristik piklerin, 1650 cm⁻¹ (C=O stretching, amit I bandı), 1558 cm⁻¹ (N-H bending, amit II bandı), 1320 cm⁻¹ (C-N stretching amit III bandı) varlığı bölüm 6.2.'de verilen sonuç grafiklerinde görülmektedir. Ayrıca kitosan polimerinin sakkarit içeriğinden ötürü sahip olduğu, karakteristik bir bant olan C-O-C (stretching bandı) 1153 cm⁻¹'de görülmektedir(103). Lif kabağı için FTIR sonuçları da daha önceki çalışmalar ile

kıyaslandığında elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumlu olduğu görülmektedir(104). Lif kabağına karşılık gelen 1027 cm⁻¹ (C-O stretching bandı), 1642 cm⁻¹ (C=O stretching bandı), 3348 cm⁻¹ (O-H stretching bandı) değerleri bulunmaktadır. Buna karşılık, NaOH çözeltisi ile yıkama sonrasında, lif kabağında bulunan 1735 cm⁻¹'de (C=O stretching) hemiselüloze ait bant kaybolmuştur. Tüm bu veriler göstermektedir ki; hedeflendiği gibi tüm malzemeler iskele yapısında mevcuttur. Browning ve ark. yaptığı çalışmadaki PEGDE FTIR pikleri ile çalışmamızdaki lif kabağı, CMChT FTIR piklerinin arasında korole şekilde olduğu gösterilmiş olup doku iskelesinin yapısında olduğu doğrulanmıştır(105).

Çalışmamızın bulgularında, doku iskelesinin şişme analizinde; kitosan kullanılan doku iskelesinin, kitosanın hidrojel özelliğinden dolayı, şişme kapasitesinin olduğu görülmüştür. Ancak doku iskelelerinin canlılık analizleri sonucu, HAp'ında biyoyumluluğunun yüksek olmasından dolayı, benzer sonuçlar vermektedir. Limin ve ark yaptığı çalışmada lif kabağı şişme testlerinin oranları çalışmamızla benzer değerlerdedir(106). Doku iskelelerimizde kullandığımız lif kabağı, fazlasıyla hidrofilik bir malzeme olduğundan şişme özelliği fazladır. Çalışmamızda hidrojel yapıyı tercih etmemizin temel sebebi lif kabağının fazla şişmesini sınırlandırmaktır.

Çalışmamızdaki gruplardan aldığımız femur örneklerinin biyomekanik olarak elastik modullerini ölçtüğümüzde gruplardan sırasıyla 4.64, 4.93, 5.22 ve 17.9 GPa olup rat femur young modulu 10 GPa olarak değerlendirilmiştir(107). BM-MSC kökenli doku iskelelerinin kırık iyileşmesinde daha etkili olduğu ve kemiğe sertlik kazandırdığı gösterilmiştir. Literatürde bakıldığında, doku iskelelerinin viskoelastik özelliklerinin biyomekanik değerlendirmesinde; basma testleri, germe testleri, devirli yüklenme testleri uygulandığı görülmektedir.

Pezeshki-Modaress ve ark yaptığı çalışmada HDF hücrelerini 14 gün kültür sonrasında jelatin/kitosan doku iskelesinde kemik doku mühendisliği açısından test etmiştir. Bu çalışmada yine formazan aktivitesine dayalı bir canlılık analizi olan MTS analizi kullanılmıştır. 1, 3, 7 ve 14. Günlerde in vitro biyoyumluluk çalışmaları gerçekleştirilmiştir(108). Rungsiyanont ve ark yaptığı başka bir çalışmada ise periodontal ligamentten elde edilen fibroblast hücreleriyle yapılan kültürün 5. Gününde MTT analiz yardımıyla canlılık analizi yapılmıştır(109). Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada HDF hücrelerini kullanarak 1,2,3,5 ve 7. Günlerde WST-1 analizi yardımıyla canlılık ölçümü yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar MKH ile çalışmaya başlamadan önce ön biyoyumluluk değerlendirmesi amacıyla kullanılmıştır. Sonuçlar iskelede kullanılan biyomalzemelerin ve oranlarının devam çalışmaları için uygun olduğunu göstermiştir.

İskelelerin biyouyumluluğunu araştırmak için, çalışmada insan kemik iliği türevi mezenkimal kök hücreler üzerinde, WST-1 testi yapılmıştır. MTT testi; ISO 10993 ile malzemelerin sitotoksitesinin değerlendirilmesi için standart bir yöntem olarak kabul görmekte olmasına rağmen, WST-1 testi, MTT testine tercih edilmiştir. WST-1'in çalışma prensibi MTT ile benzerdir; her ikisi de mitokondriyal süksinat- tetrazolium redüktaz enzimi ile tepkimeye girerek formazan boyasını (mor) oluşturmaktadır. MTT testinden farklı olarak, WST-1 reaktifi suda çözünen formazan kristalleri üretmektedir. Ve bu reaksiyon ürünü, ilave bir çözündürme aşaması olmaksızın 0,5- 4 saat içinde ölçülebilmektedir. Bu nedenle, WST-1 testi son yıllarda daha çok tercih edilmektedir (114)(115). Çalışmamızda canlılık analizi sonuçları doku iskelelerinin sitotoksik olmadığını ve biyouyumlu olduğunu göstermiştir. WST-1 testine göre, doku iskelesinin proliferasyon aktivitesi parabolik bir eğri şeklinde artarak en yüksek 3 ve 5. günde görülmüştür. Bununla birlikte, doku iskelesinde 7. günde proliferasyon oranında bir düşüş görülmesine rağmen artış devam etmiştir.

Akım sitometri analizlerinden elde ettiğimiz sonuçlarda BM-MSC hücrelerinde, CD90 FITC (%95,5), CD73 APC (%95,7), CD105 PerCP-Cy™5.5 (%87,4); Pre-MSC' de CD90 FITC (%99,3), CD73 APC (%99,3), CD105 PerCP-Cy™5.5 (%93,6) belirteçlerine karşı pozitif yanıt göstermiştir. Bu sonuçlar literatürle kıyaslandığında, kullanılan belirteçler doğrultusunda alınan sonuçlar canlılık analizlerinde kullanmış olduğumuz hücrelerin mezenkimal kök hücre olduğunu doğrulamaktadır(110).

Bir hücrenin kök hücre potansiyeli olduğunu akım sitometri yanında farklılaşma özelliğinin olması da ayırt eder(111). Çalışmamızda kullanılan insan kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hücrelere farklılaşabildiği histolojik boyamalarla gösterilmiştir (112).

Bölüm 5.4.'de anlatıldığı üzere, etilen oksit ile sterilizasyonu sağlanan doku iskelelerinin, hücrelendirilebilmesi için, tripan mavisi kullanılarak, canlılık oranı %95 olarak hesaplanan hücreler iskele başına 1×10^5 olacak şekilde, eşit miktarlarda her iskeleye ekilmiştir. Çalışmamızda oluşturduğumuz iskelelerin ortalama boyutları; 4mm çap ve 3 mm yükseklik olarak ölçülmüştür. İskele başına ekilecek hücre miktarlarına daha önce yapılan çalışmalardan yola çıkılarak karar verilmiştir(113). Hücre ekimi yapılan doku iskelelerine 7, 14, 21 ve 28. Günlerde ALP, canlılık gibi gerekli analizler gerçekleştirilmiştir.

Kemik iliğinden izole edilen kök hücrelerin canlılık analizi VE ALP aktivitesi analizi sonuçları periosta göre daha yüksek değerlerde görünüyor. Ayrıca çalışmamızda, doku iskelelerinin 7. ve 28. günde alınan SEM görüntülerinde hücrelerin her ikisi için de başarılı bir şekilde yüzeye tutunduğu görülmüştür. Literatürle kıyaslandığında, mezenkimal kök hücrelerin yüzeye tutunarak yayıldığı, doku iskelelerinde 28. günde yüzeyi neredeyse tamamen kapladığı görülmektedir (114).Hücre tutunmasının daha detaylı olarak gösterilebilmesi için Actin- DAPI boyamaları ile floresan mikroskobu görüntüleri de eklenebilir.

HAp + Lif Kabağı+ Kitosan doku iskelelerinin 7, 14 21 ve 28. günlerde iskelelerdeki hücrelerin varlığı, morfolojisi, dağılımı, adezyonu, histokimyasal ve immünohistokimyasal olarak değerlendirilmiştir. Literatüre bakıldığında histolojik değerlendirmelerde, 7, 14, 21ve 28. günler çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır ve özellikle 28. gün değerlendirmelerinin kemik iliği ve periost kökenli hücreleri bakımından önemli olduğu bildirilmektedir(115). Doku iskelesinde 7. güne göre 14 ve 21. günler hücre proliferasyonunda ardışık bir artış olduğu gözlenmiştir.

Doku iskelelerinin yapılan karakterizasyon ve biyouyumluluk testleri sonrası rat femur modelinde kırık iyileşmesi takibinde kullanılması incelenmiştir. Kemik iliği ve periost kökenli kök hücrelerin doku iskeleleri ile kullanımı ile kırık iyileşmesi ve kallus formasyonu yüksek olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda oluşturduğumuz doku iskelelerinin in vivo analizleri için; 48 adet Winstar Albino 48 adet erkek rat ortalama 300 gr ağırlığında gruplara ayrılarak 24 kafeste her kafeste iki rat olacak şekilde ayarlandı. Kırık iyileşmesinin hızlı olması, bakımının 48 rat için daha kolay olması, maliyetinin düşüklüğü, fiksasyon ve kullanacağımız malzeme nedeniyle ratları bu deney için kulladık. Litaratürde tavşan, köpek, koyun, domuz kullanımı da mevcuttur. Deneyler hem izin almanın zorluğu hem de hayvan sayısının fazlalığı, maliyeti, barınma yeri bakımından ratların kullanımı tercih edilmiştir. Litaratürle kıyasladığımızda deney hayvanı sayısı bakımında yeterli deney hayvanı kullanılmıştır(116). Cerrahi işlem için ise sol femur traşlanma sonrası lateral insizyon ve vastus laterlis yanından girilerek femur dan kaslar sıyrıcı yardımıyla ayrılıp spiral elektrikli osteotomla transvers bir kırık hattı oluşturulmuştur. Ardından kırık hattına doku iskelesi oluşturulan boşluğa sıkıştırılıp K teli ile sabitlenmiştir(117). 1 mm lik Kirschner teli ile retrograde femurdan trokanter majore gidecek şekilde gönderilmiştir. Stabilizasyonun kontrolü sonrası cilt altı ve cilt usulüne uygun şekilde kapatılmıştır. Analjezi ve antibiyotiği deney hayvanına cilt altı periton dokusundan enjekte edilmiştir. Bizim çalışmamızda kırık hattını

oluşturmak ve doku iskelesi yerleştirmek için insizyon ile kemik görülmüş retrograde olarak K teli ile stabillenmiştir(118)(119)(120). Deney hayvanlarının operasyon sonrası 8. Hafta yaşatılmaları sağlanarak biyomekanik, radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmiştir. Sakrifikasyon sonrası deney hayvanlarının sol femur kemikleri asetabulum ve diz ekleminden ayrılarak çıkarılmıştır. Ratlarda insanlara göre kemik kırığının iyileşmesinin hızlı olduğu ve 6-14 hafta sürebileceği literatürde belirtilmiştir(121). Yapılan çalışmalarda kırıkların tedavisinde alçılama, atelleme, dışardan sabitleyici eksternal fiksatörler, içerden plak uygulamaları ve intramedüler çivileme gibi methodlar uygulanmıştır. Özellikle uzun kemiklerin fiksasyonunda açık kırık, enfeksiyon gibi bulgular yoksa intramedüler çivi uygulaması normal hayata dönüşü kısaltmakta olup maliyeti de düşürmektedir. Biz de çalışmamızda ratların normal günlük hayata dönüşünü kolaylaştırmak için göreceli stabilizasyonu sağlayarak basarak mobilize olmasını sağladık. Böylece mikro harekete izin vererek ratların kırık kaynamasını kolaylaştırmayı hedefledik.

Doku iskelesinde de biyouyumluluğu olan, osteokondüktif, osteoblastik aktiviteyi artırıcı biyomalzemelerden yararlanılmıştır. Ayrıca kök hücrelerin de bu iskelelerle birlikte kullanılması sayesinde kırık iyileşmesinde daha olumlu sonuçlar verdiği görülmüştür. Kırığın iyileşme evresinde kemik kalitesini artırmak ve iyileşmeyi hızlandırmak amaçlanmıştır. Rat kemiklerinde yapılan bu çalışma ilerde domuz, at, köpek, koyun femurlarında da yapılması iyileşmenin geç olduğu deney hayvanlarında da yapılması gerekliliğini göz önünde tutmuştur.

Gonzalez-Gil ve ark ve polikaprolakton (PCL)' dan yapılan plaklar yardımıyla BM-MSc ve Per-MSc hücrelerinin 4mm rat femur osteotomi modelinde 10 hafta boyunca iyileşme takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Per-MSc' nin bu model için daha uyumlu olduğu ancak tam integrasyonun sağlanmadığını göstermektedir. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada ise kullanılan doku iskelesinin de biyoaktivite üzerine etkisinin olduğunu düşünmekle birlikte BM-MSc doku iskelesinin 8 hafta gibi bir sürede tam iyileşme sağladığı görülmektedir.

Onishi ve ark yapmış olduğu non union femur kırıklarının periostun sıyrılmadan K teli fiksasyonu ve femurun periostunun sıyrılıp koterize edilerek K teli fiksasyonu sonrası 8 hafta sonra üç nokta bending testi ile maksimum eğilme ve kırılma yükü kaydedilmiştir. Deneyin sonucunda periostu sıyrılmayan K teli ile sabitlenen grup periostu koterize edilerek stabillenen gruba göre maksimum eğilme ve kırılma yükü daha yüksek olarak ölçülmüştür(122). Bizim çalışmamızda ise BM-MSc ve Per-MSc' li doku iskelelerinin fikse edildiği femur üç nokta

bending ölçümlerinde kırılma yüklerinin periostu sıyrılmamış ve sadece doku iskelesinin fikse olduğu femurlara göre yüksek ölçülmüş olup en iyi sonuç BM-MSC' li grupta çıkmıştır. Doku iskelesine BM-MSC, ve Per-MSC' nin eklenmesi sağlamlığı ve elastik modulus artırdığını kanıtlamıştır.

Deney hayvanlarından alınan örnekler, mikro CT ve direkt grafi ile radyolojik olarak değerlendirilmiştir. Literatürde doku mühendisliği için oluşturulan hayvan deneyi modellerinin sonuçlarının ayrıntılı analizinde; histolojik, biyokimyasal, mekanik değerlendirmelerle birlikte radyolojik değerlendirmeye de yer verilmesi gerektiği belirtilmiştir(123)(124).

Ratların kemik kırık iyileşmesini değerlendirmek için direkt grafiden yararlanılmıştır. Yapılan sakrifikasyon sonrası alınan femur örnekleri grafileri çekilmesi sonrası değerlendirilmiştir. Periostu bırakılan ve sadece kırık oluşturulan grubun kırık iyileşmesinde kallus formasyonu görülmüştür. Doku iskelesi ile fikse edilen grupta ise kallus dokusunun gelişmediği görülmüştür. Periost ve kemik iliği kökenli doku iskelelerinin fikse edildiği kırıkların grafisinde ise kallus formasyonunun düzenli ve sağlam olduğu görülmüştür. Ancak bu deney açısından kullanılan örneklem açısından yeterli olmadığı düşünülmektedir. Her gruptan birer adet örneğin direkt grafisi çekildiği için değerlendirme tek başına kesin sonuç vermeyecektir. Radyolojik olarak ayrıntılı biçimde değerlendirmek için gelişmiş manyetik rezonans görüntüleme cihazları ile kırık iyileşmesini üç boyutlu olarak ve kırık iyileşmesinin daha sağlıklı olarak değerlendirilmesi sağlanabilir. Wehrle ve ark. yaptığı çalışmada, kırık yeniden şekillenmesi değerlendirmesinde mikro CT kullanılarak önemli değerlendirmelerde bulunmuştur. (125)(126). Kırık tanısında, gözden kaçabilen mikrokırıklarda başka bir çalışmada Guenoun ve ark. radyolojik değerlendirmede yine 7 Tesla manyetik rezonans görüntüleme cihazı kullanmıştır (127).

Çalışmamızda kullanılan mikro CT yöntemi ile femur shaft kırıklarını değerlendirmede görüntünün iyi olması ve iyileşme hatlarının kallus dokusu formasyonunun yüksek çözünürlüğü sayesinde kolaylık sağlamıştır. Mikro CT ile yapılan değerlendirmede ilk grup periostu sıyrılmadan bırakılan femur kırıklarının iyileşmesinde iyileşme dokusu düzensiz ve kallus dokusu olduğu görülmektedir. Periostu sıyrılıp sadece doku iskelesi ile fiksasyonu sağlanan grupta kırık hattında kallus dokusunun oluşmadığı görülmüştür. Kırığın stabilitesi sağlanmamış olup aynı zamanda rijit bir yapısı bulunmamaktadır. Bu sonuç literatür ile uyumludur. Periostun sıyrıldığı takdirde iyileşmenin gözlenmeyeceği beklenmektedir.

Periost kökenli kök hücrelerin olduğu doku iskelesi grubunun kırık hattında ise kallus dokusu nispeten oluşmuş olup rijidite olarak kırık hattı stabil olduğu gözlemlenmiştir. Kemik iliği kökenli hücrelerin olduğu doku iskelesinde kırık hattının düzenli ve kallus formasyonunun olduğu, stabilitesinin ve sertliğinin tam olarak geliştiği görülmüştür. Hücre kullanılan grupların kendi arasında kıyaslanması halinde kemik iliği kökenli kök hücrelerin kullanıldığı grubun iyileşme üzerine daha etkili olduğu görülürken sadece doku iskelesinin metabolik iyileşmenin yeterli olmadığı gözlemlenmiştir.

Doku iskelelerinin in vivo çalışmalarının da radyolojik ve histolojik olarak değerlendirilmesi ve devam ettirilmesi gerekmektedir. Yapılan bu çalışmalarda doku iskelelerinin implantasyonu ile biyouyumluluğu kanıtlanmıştır. Doku iskelelerine eklenecek diğer kompozitlerin de çalışılması ve yeni biyomalzemelere göstereceği etki çalışılmalıdır.

8.SONUÇLAR VE ÖNERİLER:

Bu çalışmada oluşturduğumuz doku iskelesi için; lif kabağı doğal bir selülöz kaynağı olduğundan ve mekanik dayanımı arttırdığı için tercih edilmiştir. Ayrıca hücre tutunmasına ve hücre proliferasyonuna katkı sağladığı görülmektedir. İlerleyen çalışmalarda, farklı malzemeler ve farklı üretim yöntemleri ile bir arada kullanılarak yeni tasarımlar oluşturulabilir. Kitosan ve HAp polimerleri, literatürde doku iskelesi üretiminde sıkça kullanılmaktadır. Fakat literatürde, kullandığımız yöntemlerle oluşturduğumuz doku iskelesi çalışmalarına rastlanılmamaktadır. Elde edilen doku iskeleleri bu açıdan özgün olup, kemik doku mühendisliğinde kullanılabilecek biyouyumlu malzemelerdir.

İn vitro biyouyumluluk testlerinde canlılık ve toksisite testlerine ek olarak; farklı analiz ve testler; histolojik boyamalar ve farklı immünohistokimyasal belirteçler yardımı ile de daha detaylı analizler gerçekleştirilebilir.

İn vivo biyouyumluluk testleri; ratlarda kemik hasarı oluşturularak histolojik, radyolojik ve biyomekanik incelemeler gerçekleştirilmiştir, çalışma farklı hücre tipleri ile hücrelendirilen doku iskeleleri ve farklı kontrol gruplarıyla da denenebilir. Böylece dokularda farklı kimyasal analizler gerçekleştirilebilir. Yine kırık iyileşmesini ardışık haftalarda direkt radyoloji görüntülemesi ve yüksek çözünürlüklü manyetik rezonans ile değerlendirilebilir.

Sonuç olarak üretilen lif kabağı doku iskelesin için, kemik iliği kökenli ve periost kökenli mezenkimal kök hücreler yardımı ile yapılan biyouyumluluk testleri gelecek için umut vadedicidir. Doku iskeleleri toksik olmayıp mezenkimal kök hücrelerin tutunmasını olumlu yönde etkilemiştir. Yapılacak olan ilerleyici çalışmalarla kaynaması gecikmiş, kaynamayan kırıklarda kemik iliği ve periosttan köken alınan hücrelerin doku iskeleleri ile beraber kullanılarak kırığın kaynamasını ve kaynayan kemiğin kalitesini artırabiliriz. Bu çalışmaların klinik çalışmalara da aktarılması ile kök hücre ve doku iskeleri ticari anlamda da kullanılabilir.

9. KAYNAKÇA

1. Zhang Y, Xu J, Ruan YC, Yu MK, O’Laughlin M, Wise H, et al. Implant-derived magnesium induces local neuronal production of CGRP to improve bone-fracture healing in rats. *Nat Med.* 2016;22(10):1160–9.
2. Cheung W, Chin W, Qin L, Leung K. Low intensity pulsed ultrasound enhances fracture healing in both ovariectomy-induced osteoporotic and age-matched normal bones. *J Orthop Res.* 2012;30(1):129–36.
3. Sathyendra V, Darowish M. Basic science of bone healing. *Hand Clin.* 2013 Nov;29(4):473–81.
4. Oryan A, Sahvieh S. Effectiveness of chitosan scaffold in skin, bone and cartilage healing. *Int J Biol Macromol.* 2017 Nov;104(Pt A):1003–11.
5. Schlundt C, El Khassawna T, Serra A, Dienelt A, Wendler S, Schell H, et al. Macrophages in bone fracture healing: Their essential role in endochondral ossification. *Bone.* 2018 Jan;106:78–89.
6. Wang T, Zhang X, Bikle DD. Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing. *J Cell Physiol.* 2017 May;232(5):913–21.
7. Ji W, Kerckhofs G, Geeroms C, Marechal M, Geris L, Luyten FP. Deciphering the combined effect of bone morphogenetic protein 6 and calcium phosphate on bone formation capacity of periosteum derived cells-based tissue engineering constructs. *Acta Biomater.* 2018 Oct;80:97–107.
8. Qiu P, Li M, Chen K, Fang B, Chen P, Tang Z, et al. Periosteal matrix-derived hydrogel promotes bone repair through an early immune regulation coupled with enhanced angio- and osteogenesis. *Biomaterials.* 2020 Jan;227:119552.
9. Lee J-H, Kim J-H, Oh S-H, Kim S-J, Hah Y-S, Park B-W, et al. Tissue-engineered bone formation using periosteal-derived cells and polydioxanone/pluronic F127 scaffold with pre-seeded adipose tissue-derived CD146 positive endothelial-like cells. *Biomaterials.* 2011 Aug;32(22):5033–45.
10. Li Z, Gu Y, Lin Z, Ma H, Zhang S. Cordycepin promotes osteogenesis of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and accelerates fracture healing via hypoxia in a rat model of closed femur fracture. *Biomed Pharmacother.* 2020;125:109991.
11. Zhu C, Sha M, Jiang H, Lin J, Lin W, Li W, et al. Co-culture of the bone and bone

- marrow: a novel way to obtain mesenchymal stem cells with enhanced osteogenic ability for fracture healing in SD rats. *J Orthop Surg Res.* 2019;14(1):293.
12. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect.* 1996;45:387–99.
 13. Datta HK, Ng WF, Walker JA, Tuck SP, Varanasi SS. The cell biology of bone metabolism. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):577–87.
 14. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008 Oct;19(5):459–66.
 15. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014;561:3–12.
 16. Komori T. Regulation of osteoblast and odontoblast differentiation by runx2. *J Oral Biosci.* 2010;52(1):22–5.
 17. Hum JM, Day RN, Bidwell JP, Wang Y, Pavalko FM. Mechanical loading in osteocytes induces formation of a Src/Pyk2/MBD2 complex that suppresses anabolic gene expression. *PLoS One.* 2014;9(5):e97942.
 18. Gooi JH, Chia LY, Walsh NC, Karsdal MA, Quinn JM, Martin TJ, et al. Decline in calcitonin receptor expression in osteocytes with age. *J Endocrinol.* 2014;221(2):181–91.
 19. Roodman GD. Osteoclast differentiation. *Crit Rev oral Biol Med an Off Publ Am Assoc Oral Biol.* 1991;2(3):389–409.
 20. Pereira M, Petretto E, Gordon S, Bassett JHD, Williams GR, Behmoaras J. Common signalling pathways in macrophage and osteoclast multinucleation. *J Cell Sci.* 2018 Jun;131(11).
 21. Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11(4):219–27.
 22. Lin Z, Fateh A, Salem DM, Intini G. Periosteum: biology and applications in craniofacial bone regeneration. *J Dent Res.* 2014 Feb;93(2):109–16.
 23. Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA. Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *J Bone Joint Surg Am.* 1994;76(5):713–21.
 24. Berendsen AD, Olsen BR. Bone development. *Bone.* 2015 Nov;80:14–8.
 25. Zhang H, Shi X, Wang L, Li X, Zheng C, Gao B, et al. Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced

- osteoporosis and estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Sci Rep*. 2018 Mar;8(1):3867.
26. Tanrikulu S, Gönen E. Kırık iyileşmesi. *TOTBID Derg*. 2017;16(6).
 27. Mescher AL. Junqueira's basic histology: text and atlas. Vol. 12. McGraw-Hill Medical 13th ed. New York; 2013.
 28. Seeman E, Delmas PD. Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *N Engl J Med*. 2006;354(21):2250–61.
 29. Aycan A. Sıçan kırık iyileşmesi modelinde koenzim Q10 etkisi. 2018;
 30. Borrelli Jr J, Prickett W, Song E, Becker D, Ricci W. Extraosseous blood supply of the tibia and the effects of different plating techniques: a human cadaveric study. *J Orthop Trauma*. 2002;16(10):691–5.
 31. Tritos NA, Klibanski A. Effects of Growth Hormone on Bone. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2016;138:193–211.
 32. Kemal UA. Kırıklar hakkında genel bilgiler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortop ve Travmatoloji Bölümü Ders Notları. 2005;
 33. O'Keefe RJ, Jacobs JJ, Chu CR, Einhorn TA. Orthopaedic basic science: foundations of clinical practice. Lippincott Williams & Wilkins; 2018.
 34. Rahn BA. Bone healing: histologic and physiologic concepts. *Bone Clin Orthop*. 1982;335–86.
 35. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551–5.
 36. Cho T, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor β superfamily during murine fracture healing. *J bone Miner Res*. 2002;17(3):513–20.
 37. Kon T, Cho T, Aizawa T, Yamazaki M, Nooh N, Graves D, et al. Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF κ B ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res*. 2001;16(6):1004–14.
 38. Racine HL, Serrat MA. The Actions of IGF-1 in the Growth Plate and Its Role in Postnatal Bone Elongation. *Curr Osteoporos Rep*. 2020;18:210–27.
 39. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355:S7–21.
 40. Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering

- bone. *Eur Cell Mater.* 2008;15(2):100–14.
41. 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. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83(Pt 2):S151.
 42. Patil AS, Sable RB, Kothari RM. An update on transforming growth factor $\alpha\beta$ (TGF $\alpha\beta$): Sources, types, functions and clinical applicability for cartilage/bone healing. *J Cell Physiol.* 2011;226(12):3094–103.
 43. Kawaguchi H, Oka H, Jingushi S, Izumi T, Fukunaga M, Sato K, et al. A local application of recombinant human fibroblast growth factor 2 for tibial shaft fractures: A randomized, placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res.* 2010;25(12):2735–43.
 44. DiGiovanni CW, Lin SS, Baumhauer JF, Daniels T, Younger A, Glazebrook M, et al. Recombinant human platelet-derived growth factor-BB and beta-tricalcium phosphate (rhPDGF-BB/ β -TCP): an alternative to autogenous bone graft. *JBJS.* 2013;95(13):1184–92.
 45. Liu H, Su H, Wang X, Hao W. MiR-148a regulates bone marrow mesenchymal stem cells-mediated fracture healing by targeting insulin-like growth factor 1. *J Cell Biochem.* 2018 Oct;
 46. Ellegaard M, Jørgensen NR, Schwarz P. Parathyroid hormone and bone healing. *Calcif Tissue Int.* 2010 Jul;87(1):1–13.
 47. Peichl P, Holzer LA, Maier R, Holzer G. Parathyroid hormone 1-84 accelerates fracture-healing in pubic bones of elderly osteoporotic women. *JBJS.* 2011;93(17):1583–7.
 48. Urban MK. Anesthesia for orthopedic surgery. *Miller's Anesth.* 2010;2:2386–406.
 49. Nyary T, Scammell BE. Principles of bone and joint injuries and their healing. *Surg.* 2018;36(1):7–14.
 50. Taljanovic MS, Jones MD, Ruth JT, Benjamin JB, Sheppard JE, Hunter TB. Fracture fixation. *Radiogr a Rev Publ Radiol Soc North Am Inc.* 2003;23(6):1569–90.
 51. Park SH, Augat P. “Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model” by Peter Augat, Johannes Bugar, Sandra Schorlemmer, Thomas Henke, Manfred Peraus, Lutz Claes| *J Orthop Res* 2003; 21: 1011-17/Reply to letter to the Editor: Shear movemen. *J Orthop Res.* 2004;22(5):1156.

52. Copuroglu C, Calori GM, Giannoudis P V. Fracture non-union: who is at risk? Vol. 44, Injury. Netherlands; 2013. p. 1379–82.
53. Plenert T, Garlichs G, Nolte I, Harder L, Hootak M, Kramer S, et al. Biomechanical comparison of a new expandable intramedullary nail and conventional intramedullary nails for femoral osteosynthesis in dogs. PLoS One. 2020;15(5):e0231823.
54. Horwitz DS, Tawari A, Suk M. Nail Length in the Management of Intertrochanteric Fracture of the Femur. J Am Acad Orthop Surg. 2016 Jun;24(6):e50-8.
55. Bliven EK, Greinwald M, Hackl S, Augat P. External fixation of the lower extremities: Biomechanical perspective and recent innovations. Injury. 2019 Jun;50 Suppl 1:S10–7.
56. Bible JE, Mir HR. External Fixation: Principles and Applications. J Am Acad Orthop Surg. 2015 Nov;23(11):683–90.
57. Castillo RC, Bosse MJ, MacKenzie EJ, Patterson BM, Group LS. Impact of smoking on fracture healing and risk of complications in limb-threatening open tibia fractures. J Orthop Trauma. 2005;19(3):151–7.
58. Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2016 Dec;93(Pt B):1354–65.
59. Li C, Qin W, Lakshmanan S, Ma X, Sun X, Xu B. Hydroxyapatite based biocomposite scaffold: A highly biocompatible material for bone regeneration. Saudi J Biol Sci. 2020 Aug;27(8):2143–8.
60. Brunello G, Panda S, Schiavon L, Sivoletta S, Biasetto L, Del Fabbro M. The Impact of Bioceramic Scaffolds on Bone Regeneration in Preclinical In Vivo Studies: A Systematic Review. Mater (Basel, Switzerland). 2020 Mar;13(7).
61. Gümüşderelioğlu M, Maviş B, Karakeçili A, Kahraman AS, Çakmak S, Tıǧlı S, et al. Doku mühendisliğinde nanoteknoloji. Bilim ve Tek Dergisi, Yeni Ufukl Eki, Ekim Sayısı. 2007;
62. Tıǧlı RS, Karakeçili A, Gümüşderelioğlu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. J Mater Sci Mater Med. 2007;18(9):1665–74.
63. Duarte ARC, Mano JF, Reis RL. Supercritical fluids in biomedical and tissue engineering applications: a review. Int Mater Rev. 2009;54(4):214–22.
64. Kumar MNVR. A review of chitin and chitosan applications. React Funct Polym.

- 2000;46(1):1–27.
65. Chen K-C, Lee T-M, Kuo N-W, Liu C, Huang C-L. Nano/Micro Hierarchical Bioceramic Coatings for Bone Implant Surface Treatments. *Mater (Basel, Switzerland)*. 2020 Mar;13(7).
 66. O'brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater today*. 2011;14(3):88–95.
 67. ARIKAN AY, KARAKEÇİLİ ATD. Doku iskelelerinin süperkritik karbondioksit ortamında hazırlanması ve karakterizasyonu. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı; 2013.
 68. Oyeyemi IT, Yekeen OM, Odusina PO, Ologun TM, Ogbaide OM, Olaleye OI, et al. Genotoxicity and antigenotoxicity study of aqueous and hydro-methanol extracts of *Spondias mombin* L., *Nymphaea lotus* L. and *Luffa cylindrical* L. using animal bioassays. *Interdiscip Toxicol*. 2015 Dec;8(4):184–92.
 69. Ogbonna JC, Tanaka H. Night biomass loss and changes in biochemical composition of cells during light/dark cyclic culture of *Chlorella pyrenoidosa*. *J Ferment Bioeng*. 1996;82(6):558–64.
 70. Mazali IO, Alves OL. Morphosynthesis: high fidelity inorganic replica of the fibrous network of loofa sponge (*Luffa cylindrica*). *An Acad Bras Cienc*. 2005;77(1):25–31.
 71. Singh A, Goswami A, Nain S. Enhanced antibacterial activity and photo-remediation of toxic dyes using Ag/SWCNT/PPy based nanocomposite with core-shell structure. *Appl Nanosci*. 2020;10:2255–68.
 72. Cheng Y, Ndisang JF, Tang G, Cao K, Wang R. Hydrogen sulfide-induced relaxation of resistance mesenteric artery beds of rats. *Am J Physiol Circ Physiol*. 2004;287(5):H2316–23.
 73. Dawson DR, El-Ghannam A, Van Sickels JE, Naung NY. Tissue engineering: what is new? *Dent Clin*. 2019;63(3):433–45.
 74. Gonzalez-Gil L, Krah D, Ghattas A-K, Carballa M, Wick A, Helmholz L, et al. Biotransformation of organic micropollutants by anaerobic sludge enzymes. *Water Res*. 2019;152:202–14.
 75. Tanrıverdi AK, Polat O, Elçin AE, Ahlat O, Gürman G, Günalp M, et al. Mesenchymal stem cell transplantation in polytrauma: evaluation of bone and liver healing response in an

- experimental rat model. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(1):53–64.
76. Achatz FP, Kujat R, Pfeifer CG, Koch M, Nerlich M, Angele P, et al. In vitro testing of scaffolds for mesenchymal stem cell-based meniscus tissue engineering—introducing a new biocompatibility scoring system. *Materials (Basel)*. 2016;9(4):276.
 77. Altman R, Brandt K, Hochberg M, Moskowitz R, Bellamy N, Bloch DA, et al. Design and conduct of clinical trials in patients with osteoarthritis: Recommendations from a task force of the Osteoarthritis Research Society: Results from a workshop. *Osteoarthritis Cartil*. 1996;4(4):217–43.
 78. Broggini N, McManus LM, Hermann JS, Medina RU, Oates TW, Schenk RK, et al. Persistent acute inflammation at the implant-abutment interface. *J Dent Res*. 2003;82(3):232–7.
 79. Mauney JR, Nguyen T, Gillen K, Kirker-Head C, Gimble JM, Kaplan DL. Engineering adipose-like tissue in vitro and in vivo utilizing human bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells with silk fibroin 3D scaffolds. *Biomaterials*. 2007;28(35):5280–90.
 80. Huo MH, Troiano NW, Pelker RR, Gundberg CM, Friedlaender GE. The influence of ibuprofen on fracture repair: biomechanical, biochemical, histologic, and histomorphometric parameters in rats. *J Orthop Res*. 1991;9(3):383–90.
 81. Develioglu H, Ozcan G, Gultekin SE, Senguen B, Yildirim A. The short-term effects of various xenografts on bone healing in rats cranial defects. 2018;
 82. Hamanishi C, Yasuwaki Y, Kikuchi H, Tanaka S, Tamura K. Classification of the callus in limb lengthening. Radiographic study of 35 limbs. *Acta Orthop Scand*. 1992 Aug;63(4):430–3.
 83. Bal KE, Bal Y, Lallam A. Gross morphology and absorption capacity of cell-fibers from the fibrous vascular system of Loofah (*Luffa cylindrica*). *Text Res J*. 2004;74(3):241–7.
 84. Ashby MF, Gibson LJ. The Mechanics of Three-Dimensional Cellular Materials. *Proc R Soc London Ser A*. 1982;382:43.
 85. Chen J-P, Lin T-C. Loofa sponge as a scaffold for culture of rat hepatocytes. *Biotechnol Prog*. 2005;21(1):315–9.
 86. Scott JE. Supramolecular organization of extracellular matrix glycosaminoglycans, in vitro and in the tissues. *FASEB J*. 1992;6(9):2639–45.

87. Shariatnia Z. Carboxymethyl chitosan: Properties and biomedical applications. *Int J Biol Macromol*. 2018 Dec;120(Pt B):1406–19.
88. Xu C, Guan S, Wang S, Gong W, Liu T, Ma X, et al. Biodegradable and electroconductive poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/carboxymethyl chitosan hydrogels for neural tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2018 Mar;84:32–43.
89. Yu H, Liu J, Zhao Y-Y, Jin F, Dong X-Z, Zhao Z-S, et al. Biocompatible Three-Dimensional Hydrogel Cell Scaffold Fabricated by Sodium Hyaluronate and Chitosan Assisted Two-Photon Polymerization. *ACS Appl Bio Mater*. 2019 Jul;2(7):3077–83.
90. Fu X, Huang L, Zhai M, Li W, Liu H. Analysis of natural carbohydrate biopolymer-high molecular chitosan and carboxymethyl chitosan by capillary zone electrophoresis. *Carbohydr Polym*. 2007;68(3):511–6.
91. Liu S-Q, Qiu B, Chen L, Peng H, Du Y-M. The effects of carboxymethylated chitosan on metalloproteinase-1,– 3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression in cartilage of experimental osteoarthritis. *Rheumatol Int*. 2005;26(1):52–7.
92. Ramesh N, Moratti SC, Dias GJ. Hydroxyapatite-polymer biocomposites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2018 Jul;106(5):2046–57.
93. Liao J, Li Y, Li H, Liu J, Xie Y, Wang J, et al. Preparation, bioactivity and mechanism of nano-hydroxyapatite/sodium alginate/chitosan bone repair material. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2018 Jan;16(1):28–35.
94. Du C, Cui FZ, Zhu XD, de Groot K. Three-dimensional nano-HAp/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture. *J Biomed Mater Res An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater*. 1999;44(4):407–15.
95. Webster TJ, Siegel RW, Bizios R. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *Biomaterials*. 1999;20(13):1221–7.
96. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics. *J Biomed Mater Res An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater Korean Soc Biomater*. 2000;51(3):475–83.
97. Yodmuang S, McNamara SL, Nover AB, Mandal BB, Agarwal M, Kelly T-AN, et al. Silk microfiber-reinforced silk hydrogel composites for functional cartilage tissue repair. *Acta*

- Biomater. 2015;11:27–36.
98. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. Elsevier; 2004.
 99. Franco CL, Price J, West JL. Development and optimization of a dual-photoinitiator, emulsion-based technique for rapid generation of cell-laden hydrogel microspheres. *Acta Biomater.* 2011;7(9):3267–76.
 100. Yeh J, Ling Y, Karp JM, Gantz J, Chandawarkar A, Eng G, et al. Micromolding of shape-controlled, harvestable cell-laden hydrogels. *Biomaterials.* 2006;27(31):5391–8.
 101. Yang Y, Liu Y, Chen S, Cheong K-L, Teng B. Carboxymethyl β -cyclodextrin grafted carboxymethyl chitosan hydrogel-based microparticles for oral insulin delivery. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2020;246:116617. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861720307918>
 102. Upadhyaya L, Singh J, Agarwal V, Tewari RP. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;91(1):452–66. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861712007497>
 103. Leceta I, Guerrero P, Ibarburu I, Dueñas MT, De la Caba K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. *J Food Eng.* 2013;116(4):889–99.
 104. Tanobe VOA, Sydenstricker THD, Munaro M, Amico SC. A comprehensive characterization of chemically treated Brazilian sponge-gourds (*Luffa cylindrica*). *Polym Test.* 2005;24(4):474–82.
 105. Browning MB, Cereceres SN, Luong PT, Cosgriff-Hernandez EM. Determination of the in vivo degradation mechanism of PEGDA hydrogels. *J Biomed Mater Res Part A.* 2014;102(12):4244–51.
 106. Dong L, Liu C. Effects of *Loofah cylindrica* extract on learning and memory ability, brain tissue morphology, and immune function of aging mice. *Open Life Sci.* 2021;16(1):399–407.
 107. Iwasaki Y, Kazama JJ, Yamato H, Fukagawa M. Changes in chemical composition of cortical bone associated with bone fragility in rat model with chronic kidney disease. *Bone* [Internet]. 2011;48(6):1260–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S8756328211007745>
 108. Pezeshki-Modaress M, Zandi M, Rajabi S. Tailoring the gelatin/chitosan electrospun

- scaffold for application in skin tissue engineering: an in vitro study. *Prog Biomater.* 2018;7(3):207–18.
109. Rungsiyanont S, Dhanesuan N, Swasdison S, Kasugai S. Evaluation of biomimetic scaffold of gelatin–hydroxyapatite crosslink as a novel scaffold for tissue engineering: Biocompatibility evaluation with human PDL fibroblasts, human mesenchymal stromal cells, and primary bone cells. *J Biomater Appl.* 2012;27(1):47–54.
 110. Castano I, Izquierdo H, Álvarez B, Barreto J, Dolder J van den, Jansen JA, Mikos AG, Sikavitsas VI. Pre-culture period of mesenchymal stem cells in osteogenic media influences their in vivo bone forming potential. *J Biomed Mater Res Part A.* 2007;82(1):129–38.
 111. Zhou W, Lin J, Zhao K, Jin K, He Q, Hu Y, et al. Single-cell profiles and clinically useful properties of human mesenchymal stem cells of adipose and bone marrow origin. *Am J Sports Med.* 2019;47(7):1722–33.
 112. Ding D-C, Shyu W-C, Lin S-Z. Mesenchymal stem cells. *Cell Transplant.* 2011;20(1):5–14.
 113. Holy CE, Shoichet MS, Davies JE. Engineering three-dimensional bone tissue in vitro using biodegradable scaffolds: Investigating initial cell seeding density and culture period. *J Biomed Mater Res An Off J Soc Biomater Japanese Soc Biomater Aust Soc Biomater Korean Soc Biomater.* 2000;51(3):376–82.
 114. Yu R, Zhang Y, Barboiu M, Maumus M, Noël D, Jorgensen C, et al. Biobased pH-responsive and self-healing hydrogels prepared from O-carboxymethyl chitosan and a 3-dimensional dynamer as cartilage engineering scaffold. *Carbohydr Polym.* 2020;244:116471.
 115. Radtke CL, Nino-Fong R, Esparza Gonzalez BP, Stryhn H, McDuffee LA. Characterization and osteogenic potential of equine muscle tissue–and periosteal tissue–derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow–and adipose tissue–derived mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 2013;74(5):790–800.
 116. Gunderson ZJ, Campbell ZR, McKinley TO, Natoli RM, Kacena MA. A comprehensive review of mouse diaphyseal femur fracture models. *Injury.* 2020 Jul;51(7):1439–47.
 117. Shao P, Wei Y, Dass CR, Zhang G, Wu Z. Systemic Delivery of Free Chitosan Accelerates Femur Fracture Healing in Rats. *Curr Drug Targets.* 2018;19(5):460–6.

118. Working ZM, Frederiksen H, Drew A, Loc-Carrillo C, Kubiak EN. Bone penetrance of locally administered vancomycin powder in a rat femur fracture model. *Injury*. 2017 Jul;48(7):1459–65.
119. Helbig L, Guehring T, Titze N, Nurjadi D, Sonntag R, Armbruster J, et al. A new sequential animal model for infection-related non-unions with segmental bone defect. *BMC Musculoskelet Disord*. 2020 May;21(1):329.
120. Chen X, Kidder LS, Lew WD. Osteogenic protein-1 induced bone formation in an infected segmental defect in the rat femur. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2002 Jan;20(1):142–50.
121. Rueff-Barroso CR, Milagres D, do Valle J, Casimiro-Lopes G, Nogueira-Neto JF, Zanier JFC, et al. Bone healing in rats submitted to weight-bearing and non-weight-bearing exercises. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2008 Nov;14(11):BR231-6.
122. Onishi T, Shimizu T, Akahane M, Okuda A, Kira T, Omokawa S, et al. Robust method to create a standardized and reproducible atrophic non-union model in a rat femur. *J Orthop* [Internet]. 2020;21:223–7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0972978X20301240>
123. Fu X, Liu G, Halim A, Ju Y, Luo Q, Song G. Mesenchymal stem cell migration and tissue repair. *Cells*. 2019;8(8):784.
124. Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing. *Biomaterials*. 2019;196:80–9.
125. Wehrle E, Tourolle Né Betts DC, Kuhn GA, Scheuren AC, Hofmann S, Müller R. Evaluation of longitudinal time-lapsed in vivo micro-CT for monitoring fracture healing in mouse femur defect models. *Sci Rep*. 2019 Nov;9(1):17445.
126. Guenoun D, Pithioux M, Souplet J-C, Guis S, Le Corroller T, Fouré A, et al. Assessment of proximal femur microarchitecture using ultra-high field MRI at 7 Tesla. *Diagn Interv Imaging*. 2020 Jan;101(1):45–53.
127. Guenoun D, Fouré A, Pithioux M, Guis S, Le Corroller T, Mattei J-P, et al. Correlative Analysis of Vertebral Trabecular Bone Microarchitecture and Mechanical Properties: A Combined Ultra-high Field (7 Tesla) MRI and Biomechanical Investigation. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2017 Oct;42(20):E1165–72.

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

