



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL DİYABETİK RAT FEMUR NON-UNİON

MODELİNDE LOKAL UYGULANAN KÖK HÜCRE

TEDAVİSİNİN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hacı Ali Olçar

KAYSERİ/2016



T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

DENEYSEL DİYABETİK RAT FEMUR NON-UNİON
MODELİNDE LOKAL UYGULANAN KÖK HÜCRE
TEDAVİSİNİN ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Hacı Ali Olçar

TEZ DANIŞMAN
Prof. Dr. Mehmet HALICI

KAYSERİ/2016

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün TTU-2015-5780 numaralı proje kodu ile desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Kırık iyileşmesi Ortopedi ve Travmatolojinin en ilgi çekici konularından biridir. Kırık iyileşmesine etki eden faktörler ve bunların etki mekanizmaları hakkında literatürde sayısız yayın mevcuttur. İyileşme mekanizmalarındaki bilinmeyenler anlaşıldıkça konunun daha da ilgi çekici hale geleceği şüphesizdir. Biz bu çalışmada kök hücre' nin pseudoartroza etkisini hayvan modeli üzerinde araştırmayı amaçladık.

İhtisas eğitimine başladığım 2010 Nisan ayından bu yana yetişmemde büyük emeği bulunan, bizlerden esirgemediği bilgi ve tecrübelerini taşıyacağım, değerli hocam ve anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Mahmut ARGÜN'e sonsuz şükranlarımı sunarım. Asistanlık eğitimim süresince yardımlarını esirgemeyen Sayın hocalarım Prof. Dr. Cemil Yıldırım TÜRK, Prof. Dr. Mahmut MUTLU, Prof. Dr. Fuat DUYGULU, Doç. Dr. Mithat ÖNER, Doç. Dr. Ahmet GÜNEY, Doç. Dr. İbrahim KAFADAR, Doç. Dr. İbrahim KARAMAN' a ve bu tez çalışmasını bizzat destekleyerek yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Mehmet HALICI' ya teşekkürlerimi sunmayı borç bilirim.

Ayrıca tezimin kök hücre üretimi ve genlerin PCR parametre çalışmalarında Prof. Dr. Yusuf ÖZKUL' a, Yar. Doç. Dr. Zeynep Burçin GÖNEN' e, biyokimyasal çalışmalarında Prof. Dr. Gülden BAŞKOL' a, histoloji çalışmalarında Prof. Dr. Saim ÖZDAMAR' a, istatistik çalışmalarında Doç. Dr. Ahmet ÖZTÜRK' e, radyoloji yorumunda Yar. Doç. Dr. Serap DOĞAN' a ve beraber çalışmaktan zevk duyduğum hastanemiz klinikleri ve ameliyathanelerinde görevli doktor ve diğer çalışanlarına, bu çalışmanın gerçekleşmesinde laboratuvar imkânlarını ve yardımlarını esirgemeyen DEKAM çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca hayatım boyunca her zaman desteklerini arkamda hissettiğim aileme ve sıkıntılara katlanan biricik eşim Zehra OLÇAR 'a şükranlarımı sunarım.

Dr. Hacı Ali OLÇAR / KAYSERİ

2016

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER	II
KISALTMALAR	V
TABLO LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	X
ABSTRACT	XII
1. GİRİŞ AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER... ..	4
2.1.1. Kemiğin Organik ve Mineral Bileşimi.....	4
2.1.2. Kemiğin Mimari Şekillenmesi	5
2.1.2.1. Kortikal (kompakt) Kemik Dokusu:	5
2.1.2.2. Trabeküler (spongiyoz) Kemik Dokusu:.....	6
2.2. KIRIK İYİLEŞMESİ	6
2.2.1. Kırık İyileşmesinin Dönemleri.....	7
2.2.1.1. Yangı (enflamasyon) Evresi (1-4 gün):	7
2.2.1.2. Onarım (reperasyon) Evresi (2-40 gün):	8
2.2.2. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler.....	9
2.2.2.1. Lokal faktörler:.....	9
2.2.2.2. Sistemik faktörler:	9
2.3. NON-UNİON VE PSEUDOARTROZ TANIMI.....	12
2.3.1. Non-union Sınıflaması	14
2.3.1.1. Canlı (Vasküler) Kaynamamalar.....	14
2.3.1.2. Cansız (Avasküler) Kaynamamalar	15
2.3.2. Deneyisel Hayvan Non-union Modeli.....	16
2.4. DİABETES MELLİTUS	17
2.4.1. Diyabetes Mellitus'un Sınıflandırılması	17

2.4.1.1. Tip 1 Diyabetes Mellitus	17
2.4.1.2. Tip 2 Diyabetes Mellitus	18
2.4.2. Diyabetes Mellitus' un Tanısı	18
2.4.3. Deneysel Hayvan Diyabet Modeli	19
2.5. KÖK HÜCRE	19
2.5.1. Kök Hücre Kaynakları	20
2.5.1.1. Embriyonel Kök Hücre	20
2.5.1.2. Fetus Kök Hücresi	20
2.5.1.3. Erişkin Kök Hücre	20
2.5.1.4. Erişkin Kök Hücre İzolasyonu	21
2.5.2. Kök Hücre Kemik Doku Üzerine Etkisi	21
2.6. RANK, RANKL, OPG GENİ	22
2.6.1. Osteoprotegerin Geni	23
2.6.2. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Geni	24
2.6.3. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand Geni	24
2.6.4. Kemik Doku Üzerine Etkileri	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	26
3.1. DENEY HAYVANLARI VE ÇALIŞMA GRUPLARI	26
3.2. HAZIRLIK VE OPERASYON.....	28
3.2.1. Diyabet Modelinin Oluşturulması.....	34
3.2.2. Kök Hücre Hazırlanışı ve Uygulanması	35
3.2.2.1. Rat Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu	35
3.2.2.2. Akım Sitometri ile AD-MKH' lerin Karakterizasyonu	38
3.2.2.3 Mezenkimal Kök Hücre Bulguları	38
3.2.2.4 Mezenkimal Kök Hücre Uygulanması.....	40
3.3. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME	40
3.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME	41
3.5. GENETİK DEĞERLENDİRME	42
3.5.1 RANK, RANKL, OPG gen PCR analizi.....	42
3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ	43
4. BULGULAR.....	44
4.1. RADYOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	44
4.2. HİSTOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....	52
4.3. GENETİK PARAMETRELERİN KARŞILAŞTIRILMASI.....	59
4.3.1. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Değerlerinin Karşılaştırılması	60
4.3.2. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand Değerlerinin Karşılaştırılması	61
4.3.3. Osteoprotegerin Değerlerinin Karşılaştırılması	62

5. TARTIŞMA...	64
6. SONUÇLAR..	74
7.KAYNAKLAR ..	76

KISALTMALAR

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium besiyeri
PBS	Phosphate Buffered Saline
FBS	Fetal Bovine Serum
GATA	Gülhane Askeri Tıp Akademisi
TGF	Transforming growth faktor
OPG	Osteoprotegerin
RANK	Reseptör aktivator nükleer kappa B
RANKL	Nükleer faktör-KB ligand reseptör aktivatr
TNFa	Tümör nekroz faktör alfa
TFNR	Tümör nekroz faktörü reseptrleri
ORO	Otozomal resesif osteopetrozis
DEXA	Dual enerji x-ray absorpsiyometri
Kr teli	Kirschner Teli
İ.P	İntraperitoneal
HE	Hemotoksilen eozin
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
STZ	Streptozosin
PCR	Polimeraz Chain Reaction
m RNA	Messenger Ribonucleic Acid
SF	Serum Fizyolojik
DM	Diabetes Mellitus
MKH	Mezenkimal kök hücre
DMB	Demineralized bone matrix
KMY	Kemik mineral yoğunluğu
HLA	Human leukocyte antigen
PGE2	Prostaglandin E2
NSAİ	Non-steroid anti-inflamatuar

KCl	Potasyum klorür
DNA	Deoksiribo Nükleik asit
ALP	Alkalen fosfataz
BMP	Kemik morfojenik proteini
Ca ²⁺	Kalsiyum
c AMP	Siklik adenzin monofosfat
Mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
χ^2	Ki kare testi
ss	Standart sapma
PG	Prostoglandin
PO ₄	Fofat
PTH	Paratiroid hormonu
TNF- α	Tümör nekrozis faktör-alfa
vb	ve benzeri
K	Kontrol grubu
FDA	United States Food and Drug Administration
GFP	Green Fluorescent Protein
ADMKH	Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre
EZ-PZR	Eşzamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulanması

TABLO LİSTESİ

	Sayfa
Tablo1.Radyoloji skarlama sistemi	46
Tablo2.Histoloji skarlama sistemi	47
Tablo3.A1 grubu radyoloji skoru	50
Tablo4.A2 grubu radyoloji skoru	51
Tablo5.A3 grubu radyolojik skoru	51
Tablo6.A4 grubu radyolojik skoru	52
Tablo7.B1 grubu radyolojik skoru	52
Tablo8.B2 grubu radyolojik skoru	53
Tablo9.Radyoloji istatistik sonuçları	53
Tablo10.Histoloji skarlama	58
Tablo11.Histoloji skarlama	58
Tablo12.Histoloji skarlama	59
Tablo 13.Gruplar arasında histolojik skorların karşılaştırılması.....	59
Tablo 14. Gruplar arasında genetik bulguların karşılaştırılması.....	65

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 1. Bir tibianın kalın bileme kesiti	6
Şekil 2. Enflamasyon evresi görünümü.....	8
Şekil 3. Reperasyon evresi görünümü.....	9
Şekil 4. Remodelizasyon evresi görünümü.....	10
Şekil 5. RANK, RANKL, OPG etki şeması.....	28
Şekil 6. Deneklerin traş edilmesi	36
Şekil 7. Deneklerin ameliyat masasına alınışı.....	36
Şekil 8. Deneklerin boyanması ve steril örtülmesi	37
Şekil 9. Cilt insizyonu	37
Şekil 10. Kır teli ile femurun tesbiti.....	38
Şekil 11. Femurda gap korunacak şekilde staple çivisi ile tesbit.....	38
Şekil 12. Kasın dikilmesi.....	39
Şekil 13. Postoperatif uyanmaya alınmaları.....	39
Şekil 14. Kan glikoz düzeyinin ölçülmesi.....	40
Şekil 15. İdrar glikozunun gösterilmesi.....	41
Şekil 16 Adipoz dokudan kök hücre elde edilmesi.	42
Şekil 17 Adipoz dokudan kök hücre elde edilmesi.	43
Şekil 18 Kök hücrelerin 37°C’de ve 5% CO2 içeren ortamda inkübe edilmesi....	43
Şekil 19 Kök hücrelerin mikroskop altında incelenmesi.....	44
Şekil 20 AD-MKH morfolojik görüntüsü, ışık mikroskop.....	45

Şekil 21 Akım sitometri’de AD-MKH’ler CD29, CD 44, CD73, ve CD90 pozitif iken CD 11b/c ve CD45 negatif olarak tespit edildi.....	45
Şekil 22 Grupların radyolojik skorlarının karşılaştırılmasında onuncu ve onsekizinci hafta gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.....	54
Şekil 23 A2 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi.....	56
Şekil 24 A3 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi.....	56
Şekil 25 A4 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi.....	57
Şekil 26 B1 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi.....	57
Şekil 27 B2 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi.....	57
Şekil 28 Gruplar arasında histoloji karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.($p<0.05$).....	59
Şekil 29 A1 grubundan alınan preparatta Alcian blue boyama.....	61
Şekil 30 A1 grubundan alınan preparatta hemotoksilen eozin boyama.....	61
Şekil 31 A2 grubundan alınan preparatta Alcian blue boyama	62
Şekil 32 A3 grubundan alınan femur non-union alanı.....	62
Şekil 33 A4 grubundan alınan preparatta non-union alanı.....	63
Şekil 34 B1 grubundan alınan preparatta alcian blue ile boyama.....	63
Şekil 35. B1 grubundan alınan preparatta alcian blue ile boyama.....	64
Şekil 36. B2 grubundan alınan preparatta non-union sahası.....	64
Şekil 37. OPG, RANK, RANKL genleri için üretilen c DNA miktarları.....	65
Şekil 38: RANK geni ekspresyon görüntüsü.....	67
Şekil 39. RANKL geni ekspresyonu görüntüsü.....	68
Şekil 40. OPG geni ekspresyon görüntüsü.....	69

ÖZET

DENEYSEL DİYABETİK RAT FEMUR NON-UNION MODELİNDE LOKAL UYGULANAN KÖK HÜCRE TEDAVİSİNİN ETKİLERİ

Amaç: Bu çalışmanın amacı, Diyabetes Mellitus (DM) oluşturulan dişi rat femurunda non-union modeli üzerine lokal uygulanan adipoz doku kaynaklı mezenkimal rat kök hücre tedavisinin kaynamaya olan etkilerini radyolojik, histopatolojik ve Reseptör aktivator nükleer kappa B (RANK), Reseptör aktivator nükleer kappa B Ligand (RANKL), Osteoprotegerin (OPG) gen aktivasyon düzeyleri ile korelasyonunu değerlendirmektir.

Materyal ve metod: Kırksekiz adet dişi Wistar-Albino türü rat bu çalışmaya dahil edildi. Ratlar rastgele ve eşit olarak 6 gruba ayrıldı: Grup A1, Grup A2, Grup A3, Grup A4 (kontrol grupları), Grup B1, Grup B2 (çalışma grupları). A4 ve B2 nolu gruplar Streptozocin (STZ) yardımı ile diyabet yapıldı. A2 nolu gruba anestezi altında sol femurları osteotomize edildi, distrakte edilmeden Kirschner teli (Kr) ile kırık tesbiti yapıldı. A3, A4, B1, B2 nolu gruplara anestezi yardımı ile sol femurları osteotomize edildi. Elektronik kumpas yardımı ile 1,8 mm gap kalacak şekilde ayarlandıktan sonra femurlar intramedüler Kr teli ve staple çivisi ile tesbit edildi. On haftalık bekleme süresi sonunda, A2 nolu grupta kaynama A3, A4, B1, B2 nolu gruplarda non-union oluşumu radyolojik olarak doğrulandı. Kontrol grubuna 2 ml serum fizyolojik (SF), çalışma grubuna ise 2×10^6 adet erkek kök hücre içeren 2ml besin solüsyonu non-union sahasına lokal olarak uygulandı. Bütün gruplar kök hücre uygulandıktan 8 hafta sonra sakrifiye edildi. Sakrifikasyon öncesi biyokimyasal çalışmalar için intrakardiak kan örnekleri alındı ve radyografileri çekildi. Sakrifikasyon sonrası histopatolojik ve genetik değerlendirme için ratların sol femurları çevre yumuşak dokudan ayrılarak formole konuldu.

Bulgular: İyileşme radyolojik olarak değerlendirildiğinde, distraksiyonun non-union oluşumuna etkisi kontrol ve çalışma grubu arasında anlamlı fark olarak izlendi. Diyabetin kırık kaynamasını yavaşlatıcı etkisi ile kök hücrenin tedavi edici etkisi radyolojik olarak gösterildi. Histopatolojik değerlendirmede, çalışma grubuna göre

anlamly iyileşme tesbit edildi. Kök hücre tedavisinin diyabetli ve diyabetli olmayan ratlardaki kaynamaya etkisinde RANK, RANKL ve OPG gen ekspresyon değerlerinde farklılık saptandı.

Sonuç: Bu bulgulara göre, diyabetik ratlardaki non-union modelinde, lokal uygulanan kök hücre tedavisinin sonuçları radyoloji ve histopatoloji skorları için anlamlydı. RANK, RANKL, OPG gen aktivasyon değerleri farklı bulunmasına karşılık istatistiksel anlamly sonuca ulaşılamadı.

Anahtar kelimeler: K k hücre, DM, non-union, RANK, RANKL, OPG geni

ABSTRACT

THE EFFECTS OF LOCALLY APPLIED STEM CELL ON THE EXPERIMENTAL RAT FEMUR NON-UNION MODEL

Purpose: The aim of this study was to assess the effects of locally applied stem cell on non-union that performed experimentally on diabetic rat femur in terms of radiology, histopatology and RANK, RANKL, OPG genes.

Materials and Methods: Fourtyeight female Wistar-Albino rats were included in this study. Rats were randomly divided into six equal groups as follows: Group A1, Group A2, Group A3, Group A4 (control groups), Group B1 and Group B2 (study group). A4 and B2 groups were made diabetic rats with streptozocin (STZ). Left femurs of A2 group were osteotomized after anaesthesia was given. Osteotomized femurs of rats were fixed by Kirschner wire without gap. Left femurs of A3, A4, B1, B2 groups were osteotomized after anaesthesia was given. Osteotomized femurs of rats were fixed by Kirschner wires and staple nail after 1,8 mm gap was performed for each rat by checking with electronical compass. At the end of 10th week, Bone union was seen in A2 group and bone non-union of each femur was confirmed in A3, A4, B1, B2 groups radiographically. 2ml physiological serum was locally applied to the osteotomized area of control groups and 2×10^6 stem cell was locally applied to the non-union area of study groups. All of the groups were sacrificed eight week after the end of the local treatment. Before the sacrifice, intracardiac blood samples were taken for biochemical analysis, and radiography were taken. After the sacrifice, left femurs of rats were taken for histopathological evaluation.

Results: There were significant differences between the control and study groups when evaluated radiologically and histopathologically. Systemic efficiency of stem cell was shown by measuring RANK, RANKL and OPG levels. Different level of bone specific RANK, RANKL, OPG values were found but not statistical different. There was significant healing in study groups when compared with the controls histopathologically.

Conclusion: These results show that local application of stem cell produces beneficial effects radiologically and histopathologically on rat femur non-union model. Genetic effects were indicated but values were not statistically different.

Keywords: Non-union, stem cell, Diabetes Mellitus, RANK, RANKL, OPG genes

1. GİRİŞ AMAÇ

Kırık, kemiğin iç veya dış kuvvetlere bağlı olarak anatomik bütünlüğünün bozulması olarak tarif edilebilir. Kırık iyileşmesi birçok etkenin karmaşık bir sıra ile çalışmasıyla başarılı bir şekilde gerçekleşir (1,2). Günümüzde cerrahi teknik ve kırık onarımında kullanılan materyallerde gelişmeler olmasına karşın, bazı kırıklarda kaynamama problemleri devam etmektedir. Özellikle geniş yumuşak doku, kemik doku ve periosteal hasarı olan kırıklarda iyileşmenin gecikmesi veya kaynamama beklenen bir durumdur (2,3,4). Artan trafik ve iş kazalarının yanı sıra, yaşlı nüfusun ve diyabetin artması nedeniyle kırıkların sık görülmesi, kırıkta non-union oluşması önemli bir sağlık problemi haline gelmiştir. Bu konudaki çalışmalar kırık ve non-union arasındaki ilişkiyi saptamaya ve non-union sürecinde iyileşmenin hızlandırılması üzerine yoğunlaşmaktadır. Günümüzde hızla artan diyabetin kırık hastalarında oluşturduğu komplikasyonlardan dolayı çalışmamızda diyabet non-union ilişkisini ve olası tedavilerini amaçladık.

Diyabet ile bozulmuş kemik iyileşmesi arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için çeşitli hayvan deneyleri ve klinik çalışmalar yapılmıştır.

Macey ve ark. Çalışmaların da kapalı kırık oluşturulduktan 2 hafta sonra tedavi verilmemiş DM' li sıçanların kırık kalluslarında DM' li olmayanlara kıyasla gerilme gücünde %29, katılıkta da %50 azalma olduğunu gösterirken Herbsman ve ark. alloksan ile tetiklenmiş diabetik sıçan modelinde fibula kırığı sonrası 4 hafta sonunda gerilme gücünde anlamlı azalma geliştiğini bildirmiştir (5). Geriye dönük bazı çalışmalarda gecikmiş kaynamanın yanı sıra DM' li hastalarda seçilmiş artrodez sonrası kaynamama ve psödoartroz gelişimi anlamlı olarak yüksek bulunmuştur (5). Farklı risk gruplarında

ayak bileği artrodezi sonrası DM' li hastalarda DM' li olmayan hastalara oranla daha fazla kaynamama görülmüştür (5).

Kırık iyileşmesinin gerçekleşmediği veya kaynama yönünden problem olabilecek durumlar için otolog kemik greftleri altın standart olarak kabul edilmesine rağmen otolog greftlerin alındığı vücut bölgesinde hasara yol açması ve alınan miktarın sınırlı olması gibi olumsuz yönleri mevcuttur. Bu nedenle değişik zamanlarda yapılan çalışmalarda, araştırmacılar kırık iyileşmesini hızlandırmak, kaynama gecikmesini ve kaynamama durumlarını ortadan kaldırmak için alternatif çeşitli çalışmalar ortaya koymuşlardır. Bunlardan biri de kök hücrenin kemik doku üzerinde kullanılmasıdır (6). Kök hücre tedavisinin farklı organ ve sistemler için kullanımının artması kemik doku için kullanımının araştırılmasını arttırmıştır. Bu çalışmada da daha önce yapılmış olan yayınlar göz önünde bulundurup non-union modelinde kök hücre etkinliği gösterilmeyi amaçlandı.

Canlılarda kendilerini yenileme ve farklılaşma (plastisite) kabiliyeti bulunan hücelere kök hücre denir. Kök hücreler çoğalabilen ve ihtiyaç duyulduğunda görev yapacak olan hücelere farklılaşarak olgunlaşmasını sağlayabilen hücrelerdir. Bunlar içinde kök hücreler adipositler, osteoblastlar, kondrositler, tenositler, iskelet kas hücreleri ve visseral stromal hücelere differansiye olabilmektedirler. İn vitro ve in vivo diferansiasyon özellikleri olan bu hücreler için elbetteki tedavi edici bir bakış da oluşacaktır. Özellikle ve öncelikle tedavisinde güçlük çekilen konular, dejeneratif ve progressif hastalıklarda kullanımı akla gelmektedir. Bu amaçla otojenik yada allojenik kök hücreler lokal yada sistemik infüzyon tarzında uygulanmaktadır. Kök hücre ile ilgili çeşitli alanlarda oldukça çok tedavi uygulamaları görülmektedir. Bu geniş uygulama alanları içerisinde kardivasküler sistem hastalıkları, miyokart infarktı , periferik arter hastalıkları (7), dermatolojik hastalıklar, kas iskelet sistemi ve periferik sinirlerle ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

Kök hücrelerin osteoblastik aktivitesini ve kemik formasyonuna katkısını gösteren çok sayıda yayın vardır. Çalışmalarda kök hücrelerin invitro osteogenik potansiyelleri ortaya koyduktan sonra, in vivo potansiyellerini ortaya koyan çalışmalarda yapılmaktadır (8,9). Kültüre edilmiş kök hücre veya yoğunlaştırılmış kemik iliği aspiratları kullanarak yapılan bu çalışmalardan olumlu sonuçlar alınmaktadır. Taguchi ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada kemik iliği hücrelerinin in vivo

migrasyonu ve kemik tamirine olan katkısını değerlendirilmiştir (10). Bu çalışmada Green Fluorescent Protein (GFP) şimerik farelerin femurlarında oluşturulan kırıklardan sonra kuyruk veninden kemik iliği hücreleri verilerek incelenmiştir. Kırık bölgesindeki kallus dokusu içinde ve kemiğin çevresindeki hücrelerin hepsinin GFP pozitif olduğu yani osteoblastlara dönüştüğü ve Mezenkimal Kök Hücre (MKH)'lerin kemik iyileşmesiyle kesin olarak ilgili olduğu gösterilmiştir (10,11).

Son yüzyılda ise özellikle genetik tedavi ve tanı araçlarının tıbbı girmesiyle her bir doku, hastalık ve tedavi yeniden ele alındı ve genlerle olan ilişkileri ortaya konulmaya başlandı. Kemik doku için özellikle bilinen genler ise RANK, RANKL ve OPG genleri olmuştur. Bu genlerin kemik doku ve kırık iyileşmesi ile olan ilişkisini gösteren bir çok yayın yapılmıştır (12,13).

Çalışmada bu bilgiler ışığında diyabetik ratlarda oluşturulan non-union modellerinde RANK, RANKL ve OPG' nin ekspresyon seviyesini görmek, genlerin non-union modeli ile iyileşmiş kırıktaki ekspresyon seviyelerini karşılaştırmak ve kök hücre tedavisi ile oluşabilecek değişimin görülmesi amaçlandı.

Bilgileri topladığımızda çalışmadaki amaçlananlar;

- . Diyabetik rat modeli oluşturmak
- . Ratlarda non-union modeli oluşturmak
- . Non-union modelinde kök hücre tedavisinin etkinliğini göstermek
- . Diyabetik modeldeki non-union modelinde kök hücre etkinliğini göstermek
- . Oluşan non-union modeli ile RANK, RANKL, OPG gen ekspresyon düzeyi ile korelasyonunu göstererek non-union oluşumunda bir marker olarak kullanılabilirliğini tartışmak
- . Uygulanan kök hücre tedavisinin non-union modelindeki RANK, RANKL, OPG gen ekspresyon düzeyindeki oluşturduğu değişikliği göstermek
- . Diabetes Mellitus' un RANK, RANKL, OPG üzerine olan etkisini göstermek

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİĞİN OLUŞUMU VE YAPISI

Organizmanın en büyük organlarından biri olan kemik, durağan görünmesine rağmen, metabolik açıdan ömür boyu aktif olan bir dokudur. Vücut için destek oluşturur, hemopoetik sistem ile pelvis, kraniyum, toraks içindeki yapıları korur, eklemler ve kaslara destek ve yapışma yeri sağlar. Kalsiyum (Ca^{+2}), fosfor (PO_4), magnezyum, sodyum gibi iyonlar için depo vazifesi görür (14).

Kemik doku, sürekli dönüşüm halinde olan, yüksek yapısal stabiliteye sahip, karmaşık bir bağ dokusundan meydana gelir. Kemik insan vücudunun en sert dokularından birisi olup gerilme ve basınca karşı dirençlidir. İskelet sistemini meydana getiren kemikler, kasların mekanik hareketlerini gerçekleştirmelerine olanak sağlar. Kemik, yapısında kemik iliğini barındırır ve hemopoetik sistem içinde rol alır. Histolojik açıdan kemik, büyük kısmı mineralize olmuş olan yoğun ve homojen ekstraselüler matriks ile kemik oluşumu ve yeniden yapılanmasından sorumlu olan kemik hücrelerinden (osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar) meydana gelir (14).

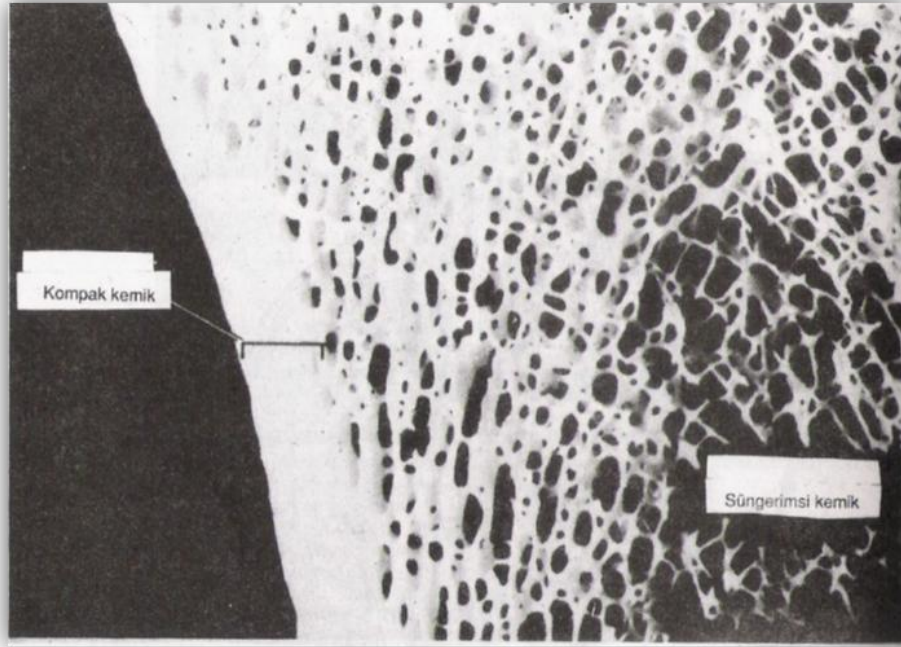
2.1.1. Kemikğin Organik ve Mineral Bileşimi

Kemikğin mineral kısmı, %70'lik bölümünü oluştururken, organik kısmı, %30' unu oluşturmaktadır. Kemikğin organik bileşimi, hücre ve matriks kısımlarından oluşur. Hücreler; organik bileşimin %2'lik kısmını oluşturur. Bunlar; osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır.

Kemik matriksi, organik kısmın, %98' lik bölümünü oluşturur. %95' lik kısmını kollajen (özellikle kollajen Tip 1), %5' lik kısmını, kollajen olmayan proteinler (Osteokalsin, osteonektin, kemik proteoglikanı, kemik siyaloproteini, kemik morfojenik proteini, kemik proteolipidi, kemik fosfoprotein) oluşturur (15).

2.1.2. Kemğin Mimari Şekillenmesi

Kemik dokusu, mimari şekillenmesi göz önüne alındığında, kompakt veya spongiyoz yapıda olabilir. Kemik kütlesinin %80' i kortikal kemikten, %20' si trabeküler kemikten oluşur. Kortikal kemik, kemik gövdesinin duvarını oluştururken, trabeküler kemik her iki uçta yoğunlaşmıştır (15).



Şekil 1: Bir tibianın kalın bileme kesiti: Kortikal kompakt kemik ve trabekülalardan oluşmuş süngerimsi kemik görülmektedir (Jungueira, 1992).

2.1.2.1. Kortikal (kompakt) Kemik Dokusu:

Uzun kemiklerin dış tabakasını oluşturur, çok yoğun ve serttir, metabolik hızı yavaştır. Esas fonksiyonel ünitesi, osteon veya haversian sistemidir. Haversian kanallar, kemiği besleyen damar ve sinirleri içerir. Volkmann kanalları olarak adlandırılan lateral dalları, bir osteondan diğerine kan damarlarını taşır. Kortikal kemik remodolizasyonu, periosteal, endosteal ve haversian kanal yüzeyindeki kemik hücreleri tarafından yapılır.

Kortikal kemik, eğici, bükücü, torsiyonel kuvvetlere karşı dirençlidir. Kemik korteksinin kalınlığını, periosteum ve endosteum belirler. Periosteum, kemik dokunun beslenebilmesi, büyüyebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları aralıksız sağlar. Bu nedenle kemik cerrahisinde bu yapıların korunmasına dikkat edilir (15).

2.1.2.2. Trabeküler (spongiyöz) Kemik Dokusu:

Kesişen kavisli tabaka ve tüplerden oluşur. Osteositler, burada konsantrik olarak yerleşmiştir ve kanalikül bağlantıları iyi gelişmiştir. Trabeküler kemik, tipik olarak kemik uç kısmında yerleşir ve mekanik stresi uygun şekilde dağıtır. Trabeküler kemiğin metabolik aktivitesi, kortikal kemikten 8 kat fazladır. Trabeküldeki bir dizi osteoblastlar, yeni kemik birikimi oluştururken, karşı kenardaki osteoklastlar tarafından remodeling sağlanır (15).

2.2. KIRIK İYİLEŞMESİ

Kemik iyileşmesi basamaklarındaki önemli tanımlar

1. Osteogenezis; kemik iyileşmesinin tüm aşamalarına katılır ve hücre tranferi ile kemik oluşturma kapasitesini ifade eder.
2. Osteoindüksiyon; Kemik formasyonun indüklemeye kapasitesinde olan materyaldir. En iyi bilineni demineralized bone matrix (DBM)'dir. Ancak DBM yalnız başına değil biyolojik aktif sitokinler, RANK, RANKL, OPG gibi genler (16) ve bunların etkileşime girdiği kök hücreleri osteoblastik ve kondroblastik farklılaşmaya veya çoğalmaya yönlendirir.
3. Osteokondüksiyon; kemik yapıcı hücreler (kök hücre ve onların ürünleri) için skafold (destek yapı) sağlanmasıdır.
4. Osteopromosyon; biyolojik ve mekanik kolaylaştırıcı faktörlerin etkisi ile kemik iyileşmesi ve rejenerasyonunun sağlanmasıdır.

Kırık kemiğin tamiri, kırık oluşuktan hemen sonra başlar. Kırık iyileşmesi, 2 ana grupta incelenir: Primer kırık iyileşmesi; ayrılmamış ve rijit osteosentez uygulanan kırıklarda görülür. Radyolojik olarak kallus dokusu görülmez. Kırık bölgesindeki nekrozu osteoklastlar rezorbe eder ve yeni kemik doku oluşur. Sekonder kırık iyileşmesi ise,

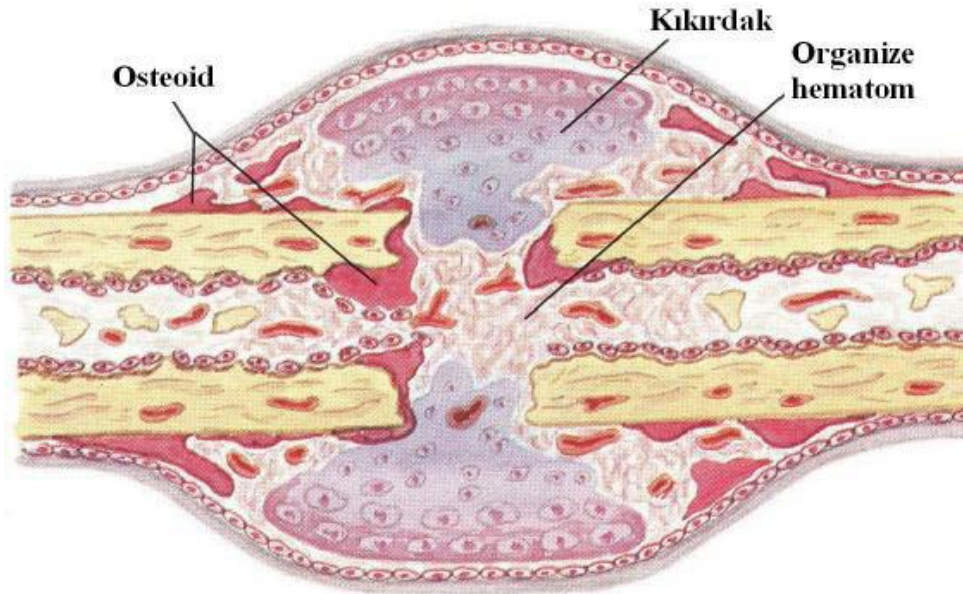
tabii iyileşmedir. Kallus radyolojik olarak gözlenir, birbirinden keskin sınırlarla ayrılmamakla beraber üç ana dönemde incelenir.

2.2.1. Kırık İyileşmesinin Dönemleri

Kırıkların çoğu intramembranöz ve endokondral kemikleşmenin birleşimi ile onarılırlar. Kaynama sürecinin %10' u enflamasyon, %40' ı tamir ve %70' i yeniden şekillenme sürecidir;

2.2.1.1. Yangı (enflamasyon) Evresi (1-4 gün):

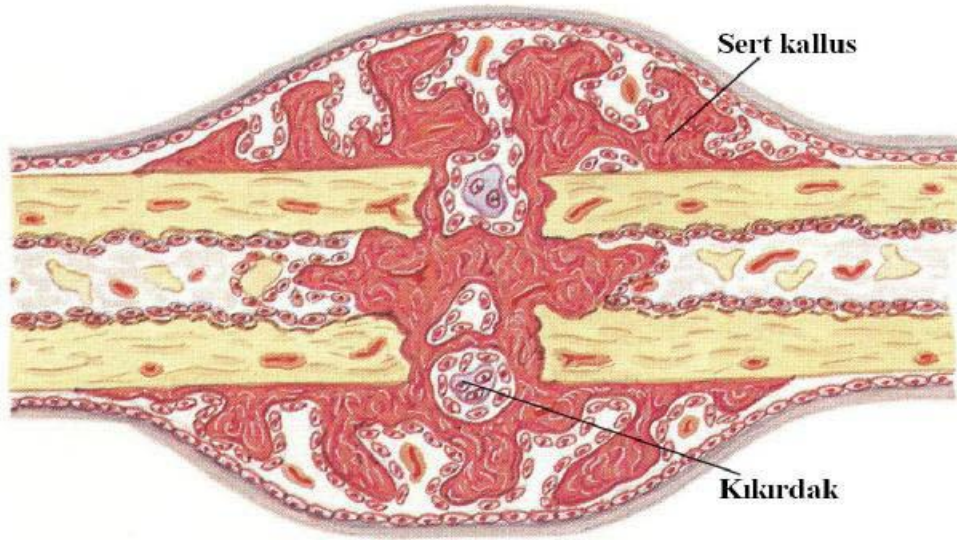
Kemik kırıldığında, endosteum, periost ve çevre yumuşak dokulardaki kan ve lenf damarları parçalanır, dokular arasına kan ve lenf sıvısı ile eksuda birikir, buna kırık hematomu denir. Deneysel çalışmalarda kırık hematomu kaybolursa, kırık iyileşmesinin bozulduğu görülmüştür. Kırık tamirinde, kırık bölgesi hematomu oluşumu ve organizasyonu ilk basamaktır. Kırık uçlarında, 48 saat içinde nekroz sahası gelişir ve nekrotik hücrelere karşı akut enflamatuvar yanıt oluşur ve polimorfonükleer lökositler olaya katılırlar. Bu dönemde oluşan yumuşak kallus, osteoid, kırıkta ve kollajenden oluşmaktadır (15).



Şekil 2: Enflamasyon evresi görünümü

2.2.1.2. Onarım (reperasyon) Evresi (2-40 gün):

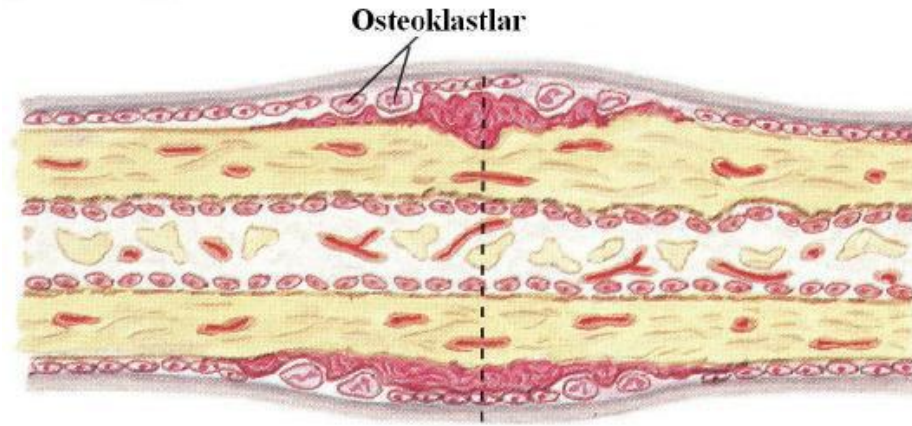
Kırık hematomu, ilk 48 saat içinde organize olarak tamir dönemini başlatır. Hematomun çevresindeki damarlardan hematoma içine fibroblast infiltrasyonu gelişir ve immatür vaskülerize kallus dokusunu oluşturur. Bu dönem, fibröz kallus dönemi adını alır ve ilk 7 günlük süreyi içerir. Fibröz doku, kırıkta ve olgunlaşmış genç kemik fibrillerinden oluşur. Ortamda yeterli oksijen varsa, kemik gelişimi ve iyileşme olur. Zamanla kırıkta doku belirginleşir, kırıkta kallus oluşur. Kalsiyum hidroksiapatit kristallerinin olaya katılmasıyla, sert kallus meydana gelir. Klinik kaynama, kırık uçları stabil ve ağrısızsa gerçekleşir. Radyolojik kaynama, direkt grafide kemik trabeküllerinin görülmesi ve kırık hattında kortikal kemik atlaması olarak değerlendirilir (15).



Şekil 3: Reperasyon evresi görünümü

2.2.1.3. Yeniden Şekillenme (remodelizasyon) Evresi (25-100 gün):

Bu dönemde, bir taraftan kemikleşme oluşurken, diğer taraftan osteoklastik faaliyetle rezorbsiyon devam eder. Oluşan kallus, bazı düzenleyici mekanizmaların uyarımı ile yeniden şekillenerek yeni kemik dokuyu oluşturur. Kemik yeniden şekillenmesi, uzun eksen yönünde etkileyen stres kuvvetlerinin ortaya çıkardığı elektromanyetik alan sayesinde olur ve ortalama bir yıl sürer. Bu süre sonunda, kemik iliği ve kemik korteksleri yeniden devamlılık kazanır (15).



Şekil 4: Remodelizasyon evresi görünümü

2.2.2. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler, lokal ve sistemik etkenler olarak iki grupta toplanırlar;

2.2.2.1. Lokal faktörler:

Kırık alanındaki etkenler, kırığın iyileşme kalitesini ve süresini etkilerler. Kırık iyileşmesini kötü yönde etkileyen faktörler arasında; kırığın dışarı ile bağlantısı olması, parçalı olması, travma sırasında kemik doku kaybı olması sayılabilir. Spongios yapıdaki kemiklerin kırıkları, kortikal kemik kırıklarına göre daha kolay kaynar. Kırık uçları birbirinden uzaksa, kaynama gecikmesi veya kaynamama görülebilir. Eklem içi kırıklar, sinovyal sıvının taşıdığı fibrinolizin nedeniyle daha geç kaynarlar. Malign hastalıklar, metabolik hastalıklar (Diabetes mellitus, rikets), radyasyon, kırık iyileşmesini kötü yönde etkiler. Enfeksiyonlar, kırık iyileşmesini geciktirir.

2.2.2.2. Sistemik faktörler:

Sistemik faktörler arasında; beslenme, hormonal faktörler, sistemik hastalıklar, ilaçlar, yaş ve alışkanlıklar sayılabilir.

Beslenme: Kırık iyileşmesinde matriks sentezi, hücre migrasyonu ve proliferasyonu, kollajen, proteoglikan ve diğer makromoleküllerin sentezlenmesi için yüksek düzeyde protein ve karbonhidrata ihtiyaç duyulur.

Travma ve major cerrahi, immun direnci azaltmakta ve malnutrisyona neden olabilmektedir. Bu hastalarda beslenmeye özen gösterilmelidir. Kemik özellikle büyüme çağında beslenme faktörlerine hassastır. Yetersiz protein alımı sonucunda, osteoblastların kollajen sentezi azalır (17). Kalsiyum ve D vitamini kırık iyileşmesinde önemli role sahiptir. Ca^{+2} eksikliği organik kemik matriksinin yetersiz kalsifikasyonuna neden olur. Postmenapoz osteoporotik bayanlarda, kalsiyum tedavisi ile kemik mineral yoğunluğunda (KMY) artış olduğu gösterilmiştir. D vitamini, Ca^{+2} ve PO_4 'un, gastrointestinal sistemden emilimini artırır, osteoidin olgunlaşmasını ve minerilizasyonunu uyayarak, kemik yapımını stimüle eder.

A vitamini, normal dozda mezanşimal hücre farklılaşmasını uyararak kırık iyileşmesine yardımcı olur. Eksikliğinde, osteoblast regülasyonunda ve osteoklast aktivitesinde bozulma olur ve kemik oluşum aktivitesi azalır. A vitamini fazlalığında ise, kırık kolonlarında erozyon meydana gelir, osteoklastlara dönüşüm fazla uyarılır ve kırık iyileşmesi gecikir (18).

C vitamini, osteoblast ve osteositlerin ürünü olan kollajenin sentezinde rol alır ve iyileşmeyi dolaylı yoldan etkiler. Eksikliğinde kemiğin büyümesi ve onarımı kötü yönde etkilenir (19).

Hormonal faktörler

Melatonin, tibia kırığı oluşturulan 80 ratda; 3,7,14 ve 28. Gün miyeloperoksidaz, superoksit dismutaz ve malondialdehid düzeylerine bakılmış melatonin verilen grupta değerlerin düşük çıktığı görülmüş. Bu sonucun melatoninin serbest oksijen radikallerini baskılayıp antioksidan enzim regülasyonun sağlayarak kırık iyileşme sürecine olumlu etkileyebileceği düşünülmüştür. Bu durumun, kırık alanındaki serbest oksijen radikalleri üzerinden, antioksidan etki sonucu olduğu düşünülmüştür (20).

Parathormon (PTH), paratiroid bezinin esas hücrelerinden salınan bir polipeptiddir. PTH, kemikte osteoklast sayısını yükseltir. Kalsitriol varlığında, kemik rezorbsiyonunu tetikleyip, serum Ca^{+2} ve PO_4 seviyesini artırır. Osteoblastların sayı ve fonksiyonunu artırarak kemik formasyonunu artırır. Osteoblastların üzerine dolaylı etkisi olsada, net sonuç kemik kaybı ve kırık iyileşmesinin yavaşlamasıdır. Düşük dozlarda, trabeküler kemik oluşumunu arttırdığı gözlenmiştir (21).

Kalsitonin, tiroid bezinin parafoliküler hücreleri tarafından salgılanan polipeptid bir hormondur. Plazmadaki Ca^{+2} ve PO_4 düzeylerini düşürür, kemik rezorpsiyonunu azaltır, osteoblastik aktiviteyi artırır. Kalsitonin, PTH' nin antagonistidir. Kompakt ve trabeküler kemik yapımını artırır. Kalsitonin dozu ile yeni kemik oluşumu arasında korelasyon vardır fakat iyileşmeyi olumlu yönde etkileme mekanizması henüz açıklık kazanmamıştır (22).

Ovaryumdan salgılanan östrojen, kemik rezorpsiyonunu önleyerek kemik kaybını önler. Eksikliğinde, osteoporoz riski artar. Overektomi yapılmış hayvanlarda, kırık iyileşmesinin kötü yönde etkilendiği gösterilmiştir (23).

Tiroid hormonu, paratiroid hormonu gibi kemiğin yeniden şekillenmesine yardım eder. Kırık iyileşmesine yardım ettiği ileri sürülmüştür (24). Hipotiroidi tedavisinde verilen, tiroid hormonu, uzun dönem kullanımında osteoporoz ve kırık riskini arttırabilir (25).

Kortikosteroidler, ilacın miktarı ve kullanım süresine de bağlı olarak, kırık iyileşmesini yavaşlatırlar. Mezanşimal hücrelerden osteoblast gelişimi ve matriks oluşumu için gerekli yapı taşlarının sentezini yavaşlattıklarından dolayı, kırık iyileşmesini geciktirip, kallus oluşumunu azaltırlar. Prednizolon uygulaması gereken hastalara, sigarayı bırakması, Ca^{+2} ve D vitamini alması önerilir (25). Kortikosteroidler, fibroblast kaynaklı büyüme faktörü ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü üzerine antagonist etki yaparlar (26).

İnsülin ve büyüme hormonu gibi anabolizan hormonlar kırık iyileşmesini hızlandırmaktadır. Büyüme hormonu ve diğer anabolizan hormonlar, proteine bağlı Ca^{+2} etkileyerek kırık iyileşmesine yardımcı olurlar. Büyüme hormonu, hipofiz ön lobundan sentezlenir ve kallus hacminde artışa sebep olur. Kırık iyileşmesini hızlandırdığı klinik çalışmalarda gösterilmiştir (27).

Sistemik hastalıklar

Diyabet, anemi, tüberküloz, raşitizm gibi hastalıklar ve beslenme bozukluklarına neden olan nontropikal sprue gibi gastrointestinal hastalıklar, kırık iyileşmesini geciktirir. Diyabette, osteoblast aktivasyonundan sorumlu faktörlerin salgılanmasının azalması ve buna bağlı olarak kemik iyileşmesinin bozulmasının etken olduğu ileri sürülmüştür.

İlaçlar

Kondroitin sülfat ve hiyalüronidaz, kırık iyileşmesine olumlu yönde etki ederler. Deneysel çalışmalarda, L-Dopa ve klonidinin büyüme hormonunu arttırarak, kırık iyileşmesini olumlu yönde etkilediği gösterilmiştir (28).

İndometazinin, yüksek dozlarda kırık iyileşmesini durdurduğu bilinmektedir(29).

Uzun süre kortikosteroid kullanımını gerektiren, romatoid artrit gibi romatizmal eklem hastalıkları, otoimmün deri hastalıkları, cushing sendromu, sistemik lupus eritematozus gibi durumlarda da kırık iyileşmesi olumsuz yönde etkilenmektedir (30).

Yapılan bazı çalışmalar, Non-Steroid Anti-İnflamatuvar (NSAI)' ların, kırık iyileşmesini yavaşlattığını göstermektedir. NSAI'ların, prostaglandinlerin osteoblastik aktiviteyi arttırıcı etkisini önleyerek kırık iyileşmesini geciktirdiği düşünülmektedir (31). Yapılan çalışmalarda, heparinin kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkiler gösterdiği tespit edilmiştir.

Heparinin osteoblast yapımını azaltıp, osteoklastları arttırmasının bu etkiye neden olduğu düşünülmektedir (32).

Simvastatinin kırık kaynaması üzerine olumlu etkileri gösterilmiştir (33).

Kinolon grubu antibiyotikler, gentamisin de kırık iyileşmesini engellediğine dair yayınlar mevcuttur (34).

Nitrik oksit ile yapılan bir çalışmada, kemik iyileşmesinde radyolojik ve histolojik olarak iyi sonuçlar gösterilmiştir (35).

Alışkanlıklar: Klinik çalışmalar, sigara içmenin kırık iyileşmesini inhibe ettiğini göstermiştir. Tibial osteotomi uygulanan tavşanlarda, nikotin verilen grupta kontrol grubuna göre kırık iyileşmesinin geciktiği gösterilmiştir. Kemik grefti uygulanan tavşanlarda, nikotinin otojen kemik greftinin vasküleritesini inhibe ettiği gösterilmiştir (36).

2.3. NON-UNİON VE PSEUDOARTROZ TANIMI

Bir kırığın kaynamadığını söyleyebilmek için genel kabul görmüş bir tanım henüz mevcut değildir. Eğer bir kırık beklenen sürede kaynamazsa bir kaynama gecikmesinden bahsedilir. Birçok araştırmacı beklenen kaynama sürenin üzerinden 2-3 ay

geçmesine rağmen kırıkta klinik ve radyolojik ilerleme sağlanamıyorsa bu durumu kaynamama olarak kabul etmektedir (37).

Cave' nin 1960 yılında tanımladığı non-union, kaynama durması olarak tarif edilmektedir (38). Kaynamamış kemiğin tanısı, klinik veya radyolojik olarak kanıtlanması gerekir. Bir kemik için non-uniondan bahsetmek, iyileşmenin durduğunu veya kaynamanın büyük olasılıkla olmayacağını ifade etmektir. 1986' da United States Food and Drug Administration (FDA) panelinde “yaralanmadan sonra minimum 9 ay geçmesi ve bu süreçte kırığın 3 ay boyunca herhangi görülebilir kaynama belirtisi göstermemesi durumu” kaynamamış kırık olarak tarif edilmektedir. Fakat bu kriter her kırıkta uygulanamaz. Örnek olarak uzun bir kemiğin diafiz kırığı 6 ay boyunca kaynamamış kabul edilmemelidir. Buna karşın femur boyun kırıkları 3 ay sonrasında kaynamamış olarak kabul edilebilir. Kaynamamış bir kırığın en son durumu psödoartroz oluşumu olarak gözlenir. Pseudoartrozda kırık uçlarının skleroze olduğu ve yalancı bir eklem olduğu görülür (39). Bir kırığın kaynamaması hem kişinin hayat standartına yapmış olduğu zorluklar hemde her ülke ekonomisi için oluşturduğu iş gücü kayıplarından dolayı çalışmaların bu alanda artması gerekliliği ortaya koyulmuştur. Bu amaçla üzerinde çalışılmak için birçok deneysel non-union modeli tanımlanmıştır.

Garcia ve ark. (40)'nın farelerle yapılan çalışmasında, fare femurunda kırık oluşturulmuş ve kırık hattında gap aralığı 0,8 mm ve 1,8 mm olacak şekilde intramedüller çivi ve staple çivisi ile tespit yapılmış. Kırık hattı tespit edildikten sonra 10 hafta beklenmiş ve radyolojik olarak non-union gelişimi değerlendirilmiş. Radyolojik olarak 0,8 mm ve 1,8 mm gap bırakılan ve periosta zarar verilmeyen grupta non-union gelişimi sırayla % 33,3 ve % 50 iken, kırık hattında 1,8 mm gap bırakılan ve periostu çıkarılan grupta non-union gelişimi % 100 bulunmuş. Kemik kaybı ve periost zararı ile sonuçlanan kırıkların non-union ile sonuçlanma risklerinin çok yüksek olduğu sonucuna varılmıştır. Bu model ayrıca çalışmalarda hayvan deneylerinde non-union modeli olarakta kullanılmaktadır.

Kaynamama durumlarının gerçek sebepleri bilinmemekle birlikte, hem sistemik hem de lokal faktörlerin etkili olduğu düşünülmektedir.

Sistemik faktörler arasında hastanın metabolik ve nutrisyonel durumu, genel sağlık ve aktivite düzeyi sayılabilir. Sistemik etkiye sahip sigara ve alkolün, kırık iyileşmesi üzerine olumsuz etkisi kanıtlanmıştır (41).

Lokal faktörler arasında kırığın açık, segmental, enfekte ve ciddi bir travma sonucu oluşu, yetersiz tesbit edilmesi, plak ve vida kullanılması veya traksiyon uygulanarak fragmanların distrakte edilmesi, radyasyon uygulanması gibi durumlar sayılabilir (41).

Parçalar arası kemik teması kırık iyileşmesi için önemli bir gerekliliktir. Yumuşak dokunun kırık parçalarının arasına girmesi, kemik kaybı, parçalar arası kötü dizilim, ya da ayrılma sonucu defektler ortaya çıkabilir. Oluşan bu defektlerin kırık iyileşmesi sürecinde köprülenmesi gerekir. Osteonal iyileşmede kortikal bir defektin köprülenebileceği mesafe hayvan deneylerinde en fazla 1 mm olarak bulunmuştur. Defektin büyüklüğü arttıkça, kırığın kaynamama ihtimalide artmaktadır. İnternal atellemede ise bu mesafe 2 cm' i geçmemelidir (42).

2.3.1. Non-Union Sınıflaması

Kaynamamaları temel olarak biyolojik olarak aktif olanlar (canlı/vasküler) ve biyolojik olarak aktif olmayanlar (cansız/avasküler) olarak iki ana gruba ayıran Weber ve Cech'in 1976 da yaptığı sınıflama hala geçerliliğini korumaktadır (43). Genel olarak bakıldığında, avasküler kaynamamalar kırık iyileşmesinin erken aşamaları üzerine etki eden olumsuz faktörler sonucu oluşurken, vasküler kaynamamalar sıklıkla kırık iyileşmesinin yeniden şekillenme (reorganizasyon) dönemine etki eden faktörler sonucu oluşmaktadırlar (44).

2.3.1.1. Canlı (Vasküler) Kaynamamalar

Kallus yanıtının iyi olduğu yani kırık parçalarının biyolojisinin iyi olduğu kaynamamalardır. Burada sorunun çoğu mekanik denge kaynaklıdır. İyi kanlanan bir dokudaki hareket periostu uyarak yeni kemik oluşumunu tetiklemektedir. Yeterli denge olsa kemik kaynamaya hazırdır. Dolayısıyla mikro ya da makro-hareketin kırık iyileşmesi ile uyumlu kritik eşik seviyenin altına indirilmesi gerekmektedir. Sintigrafik olarak kanlanmalarının iyi olması nedeniyle yüksek aktivite gösterirler. Olgular genellikle uzuvlarını kullanabilirler ancak yorulma ya da yüklenme ile ağrı oluşması önemli bir bulgudur. Radyolojik görünümüne göre fil ayağı, at ayağı ve oligotrofik olarak üç alt gruba ayrılırlar (43).

Fil ayağı kaynamamaların özelliği hipertrofik ve zengin bir kallus oluşumudur. Sıklıkla yetersiz tespit ya da erken yük verme nedeniyle oluşurlar.

At ayağı kaynamamalarda ise kallus birinciye göre daha azdır. Sebep çoğunlukla başarısız plak–vida tespittir. Metalin dayanabileceği sürede kaynama gerçekleşmez ise tespit materyali kırılır.

Bu tip kaynamamaların tedavisinde biyolojiyi iyileştirici bir ek tedaviye ihtiyaç duyulmaz asıl gerekli olan mekanik olarak varsa şekil bozukluğunun düzeltilmesi ve kaynamama sahasındaki dengenin arttırılmasıdır. Bu da kompresyon plaklama ya da oymalı kilitli intramedüller çivileme gibi internal ya da ilizarov gibi fiksatorlerle eksternal olarak sağlanabilir. Ancak yeterli denge sağlandıktan sonra fibröz kıkırdak kalsifiye olabilir ve yeni damarların penetrasyonu sonucu remodelasyon süreci işleyebilir. Kırık uçlarında rezeksiyon yapılması, canlı kemik dokuda kayıplara sebep olacağı için hatadır (46).

Oligotrofik kaynamamalarda ise kallus görülmez. Kırık uçları canlı olmasına rağmen kaynamamanın sebebi tespitin kırık uçları arasında kabul edilemez boşluklar bırakacak şekilde yapılmış olmasıdır. Kallusun yokluğu kaynamama sahasında hareketliliği arttırarak kemik iyileşmesi için uygunsuz bir ortam yarattığından dengenin arttırılması tedavi için şarttır. Vasküler olmalarına rağmen kemik oluşturamadıkları için kemik oluşumunu uyaran osteoprogenitor hücrelerin, osteoindüktif proteinlerin ve osteokondüktif matriksin elde edilebilmesi amacıyla dekortikasyon ve otojen kansellöz greft uygulanması önerilmektedir.

2.3.1.2. Cansız (Avasküler) Kaynamamalar

Bu kaynamama tipinde kemik parçaları cansızdır dolayısıyla biyolojik herhangi bir reaksiyon oluşturma kapasitesine sahip değildirler. Sintigrafik olarak zayıf kanlanmaları nedeniyle düşük aktivite gösterirler. Direkt grafilerde kallus görülmez.

Cansız kaynamamalar 4 alt tipe ayrılır.

Kama şeklindeki cansız kaynamamalarda kanlanması bozuk bir ara parça mevcuttur. Bu parça ana parçalardan birine kaynarken diğerine kaynamaz.

İkinci tip olan parçalı kaynamamalarda nekrotik parça sayısı birden fazladır.

Üçüncü tip kayıplı (defekt) kaynamamalardır. Açık kırık ya da enfeksiyona ikincil olarak bir parça kaybı söz konusudur. Başlangıçta kırık uçları canlı olsada kaybın

büyüklüğü kırık iyileşmesinin köprüleyebileceği mesafenin üstündedir. Zamanla bu uçlar da canlılıklarını yitirirler.

Dördüncü tip olan atrofik kaynamamalar ise aslında ilk üç tipin zaman içinde geldiği noktadır. Kırık uçlarının uzun süre içinde kısmen incelendiği, uzuvda da kullanılmamaya bağlı kas atrofileri ve osteoporozun geliştiği genel bir tablodur.

Oluşum sebebi esas olarak kırık hattına komşu kemik parçalarının yaralanmanın şiddeti yada kötü cerrahi teknikler neticesinde cansız hale gelmesidir. Kaynamanın sağlanabilmesi için sadece tespitin dengelenmesi yeterli değildir. Cansız kemiklerin uzaklaştırılması, kırık uçları arasındaki fibrotik dokuların temizlenmesi, canlı kemik uçlarının temasının sağlanması ve ilave olarak greftleme ile biyolojik canlandırmada tedaviye eklenmelidir.

Cansız bir kemik de canlı bir kemiğe kaynayabilir ancak bunun olmasını sağlayan, nekrotik parçaları uzaklaştıran yeniden şekillenme sürecinin zaman içinde kısalık ve distal parçada osteopeniye yol açacağı unutulmamalıdır.

Tedavi seçenekleri içinde seçim kemik kaybının büyüklüğüne göre yapılmalıdır. Bunlar basit kısaltma, karşılıklı kısaltma, kısaltma ve uzatma (kallus distraksiyon) ya da defektli sahanın canlı kemikle köprülenmesi (tibia pro fibula) olabilir.

2.3.2. Deneysel Hayvan Non-Union Modeli

Non-union tedavisinin başarılı bir şekilde yapılabilmesi için öncelikle non-union modeli oluşturmak gerekir. Bu amaçla birçok araştırmacı deneysel non-union oluşturmak için çalışmalar yapmıştır.

Oetgen ve ark. (47)' nın 48 fareyle yapılan çalışmasında, 24 farede kapalı standart femur kırığı oluşturulmuş (kontrol grubu) ve geriye kalan 24 fareye de açık osteotomi (çalışma grubu) uygulanmıştır. Çalışma grubunda osteotomi hattının 2 mm distaline ve proksimaline koter uygulayarak periost ortadan kaldırılmıştır. Yapılan histopatolojik değerlendirmede kontrol grubu normal kırık iyileşme bulguları gösterirken, çalışma grubunda gecikmiş iyileşme veya hiçbir iyileşme bulgusunun olmadığı tesbit edilmiştir.

Harrison ve ark (48)' nın yapılan çalışmasında, mid-diyafizel femoral osteotomi oluşturulduktan sonra mini eksternal fiksatör kullanılarak bir grupta 0,5 mm ve diğer grupta 3 mm gap kalacak şekilde femoral tesbit yapılmıştır. Beş hafta sonra yapılan

radyolojik değerlendirmede 0,5 mm gap bırakılan grupta kaynama görölürken, 3 mm gap bırakılan grupta non-union oluştuğu ifade edilmiştir. Dual enerji x-ray absorpsiyometri (DEXA) ile yapılan değerlendirmede 0,5mm gap bırakılan grupta verilerde artış görölürken, 3 mm gap bırakılan grupta ilk haftalarda artış sonraki haftalarda azalma olduğu görölmüştür. Histopatolojik çalışmada ise 0,5 mm gap bırakılan grupta non-union bulgularının izlendiği rapor edilmiştir.

Garcia ve ark. (40)' nın farelerle yapılan çalışmasında, fare femurunda kırık oluşturulmuş ve kırık hattında gap aralığı 0,8 ve 1,8 mm olacak şekilde intramedüller çivi ve staple çivisi ile tesbit yapılmıştır. Kırık hattı tesbit edildikten sonra 10 hafta beklenmiş ve radyolojik olarak non-union gelişimi değerlendirilmiştir. Radyolojik olarak 0,8 mm ve 1,8 mm gap bırakılan ve periosta zarar verilmeyen grupta non-union gelişimi sırasıyla % 33,3 ve % 50 iken, kırık hattında 1,8 mm gap bırakılan ve periostu çıkarılan grupta non-union gelişiminin % 100 olduğu tesbit edilmiştir.

2.4. DİABETES MELİTUS

Diabetes melitus, insülin salgısının mutlak veya göreceli eksikliği yada insülin rezistansı ile kendini belli eden, karbonhidrat, yağ ve protein metabolizması bozuklukları ile karakterize bir hastalıktır (49). Karbonhidrat metabolizmasına etkili hormonlar, insülin, glukagon, böbreküstü bezi hormonları, büyüme hormonu, adrenokortikotropik hormon, tiroid hormonlarıdır. Kan glukoz düzeyinin ortalama 115-75 mg/dl arasında bulunur, yemek sonrası kan glukozu düzeyi 120-140 mg/dl' ye kadar artar. Artan bu glukoz düzeyi insülin salgılanmasını uyararak en geç iki saat içersinde kan glukoz düzeyinin normale dönmesini sağlar. Açlık hallerinde ise oluşan hipoglisemi sonucu glukagon salgılanması uyarılır. Glukagon da karaciğerde glikojenoliz ve glikoneogenezisi artırarak kana glukoz verilmesini sağlar sonuçta kan glukoz düzeyini normale getirir (49).

2.4.1. Diabetes Mellitus' un Sınıflandırılması

2.4.1.1. Tip 1 Diabetes Mellitus

Pankreatik insülin salgısının mutlak eksikliği veya yokluğu sonucu gelişen bir hastalıktır. Karaciğerden glukojenolizis ve glukoneogenezis ile glukoz, yağ dokusundan lipoliz ile serbest yağ asitleri, kas dokusundan da proteoliz ile aminoasitler dolaşıma

geçerler. Yağ asitlerinden kaynaklanan keton cisimcikleri kanda birikerek ketozis ve ketonüri oluşturmaktadır. Periferik glukoz kullanımının duraklaması, glikojen sentezinin durması ve intestinal glukoz emiliminin devam etmesi ile ağır bir hiperglisemi oluşmakta, bunların sonucunda poliüri, polidipsi, polifaji, kilo kaybı gibi belirtiler ortaya çıkmaktadır. Glukozun böbrekten geri emilim eşiği aşıldıktan sonra ise glukozüri oluşmaktadır. Bu da ozmotik etki ile poliüriye yol açmaktadır (49).

Tip 1 DM' un en önemli nedeni otoimmün olaylar sonucu pankreas beta hücrelerinin tahrip olmasıdır. Ayrıca otoimmün antikorlar, bazı HLA tipleri de nedenler olarak sayılabilmektedir (49).

2.4.1.2. Tip 2 Diabetes Mellitus

Genel diabet popülasyonunun % 80-90' ını oluşturmaktadır. Hastalık, insülin rezistansı ve rölatif insülin eksikliği sonucu oluşmaktadır. Asemptomatik bir dönemi takiben klasik diabet semptomları başlar. Bazı hastalarda tesadüfen glukozüri veya hiperglisemi bulunması ile tanısı konur. Spontan ketoasidoz tip 2 DM' da gelişmez. Ancak ağır enfeksiyonlar ve ağır stres yapan durumlarda ketoasidoz ve koma görülebilir (49).

2.4.2. Diabetes Mellitus' un Tanısı

Diabetes Mellitus' un tanısı, klasik semptomlar ve biyokimyasal bulgularla konulmaktadır. Plazma glukoz düzeyinde yükselmeye eşlik eden susuzluk hissi, poliüri, polifaji ve kilo kaybı olması patognomoniktir. Asemptomatik hastalarda ise yeğane tanı yöntemi açlık plazma glukoz yönteminin ölçülmesidir (49).

Diabetes mellitusun tanı kriterleri (49):

- . En az 8 saatlik kalori alımının engellendiği açlık sonrası açlık plazma glukozunun 126 mg/dl(7.0 mmol/l)' ye eşit veya yüksek olması
- . Diabetin semptomları (poliüri, polidipsi, açıklanamayan kilo kaybı) ile herhangi bir zamanda alınan plazma glukozunun 200 mg/dl (11.1 mmol/l)' ye eşit veya fazla olması
- . Oral Glukoz Tolerans Testi (OGTT) sırasında 2. Saatte plazma glukozunun 200 mg/dl' ye eşit veya fazla olması,

2.4.3. Deneysel Hayvan Diyabet Modeli

Yaşam kalitesine olan olumsuz etkileri yanında, yüksek morbidite ve mortaliteye sahip diyabet hastalığı ve komplikasyonlarının patogenezi için yapılan çalışmalarda hayvan modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

Deneysel diyabet hayvan modelleri için günümüzde en çok tercih edilen pankreas beta hücre spesifik toksinleri STZ(streptozocin) ve alloksandır (50). Alloksanın tavşanlarda pankreasın beta hücrelerini tahrip etmek suretiyle kalıcı diyabet oluşturduğu ilk kez Dunn ve ark. tarafından 1943’ te bulunmuştur (51). STZ’ nin benzer etkileri ise 1963’ te Rakieten ve ark. tarafından sıçan ve köpeklerde kalıcı diyabet oluşturulmasıyla gösterilmiştir (52). STZ’ nin alloksana göre beta hücreleri dışındaki yapılara daha az zarar verdiği; alloksan ile daha yüksek kan şekeri değerlerine ulaşıldığı ve ketozisin daha sık olduğu bildirilmiştir (53).

Streptozotocin neoplastik, antineoplastik, nitrozüre analogu ve diyabetojenik özellikleri olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (54). Ph’ ı 4 olan sitrat tampon içerisinde çözeltisi hazırlanmalı ve ışıktan korunarak hemen uygulanmalıdır. Etkisini hücre içinde nitrozüre gruplarının dekompozisyonu ile oluşan reaktif karbonyum iyonları Deoksiribo Nükleik Asit (DNA) bazlarında alkilasyona neden olur. Hücresel enerji depolarının tüketimine bağlı ATP içeriğini azaltır ve beta hücresinde nekroza yol açar (53). Diyabet oluşturmak için genellikle yetişkin sıçanlarda i.v yoldan 40-60 mg/kg arasındaki bir değerin tek doz kullanımı tercih edilmekle birlikte (50), daha geniş bir aralıktaki dozlar da (35-80 mg/kg) kullanılabilmektedir (55).

2.5. KÖK HÜCRE

Canlılarda kendilerini yenileme ve farklılaşma kabiliyeti bulunan hücrelere kök hücre denir. Bu konuda ilk önemli öngörü Alman bilim adamı Carl Rudolph Virchow’ un 1800’ lü yılların başındaki “Omnis cellula e cellula = tüm hücreler başka hücrelerden gelişir“ yaklaşımıdır (56). Bugünkü manada ilk kök hücre tanımlaması ise 1999 yılında Pittenger ve ark tarafından yapılan, “Kemik iliğinden köken alan ve uygun uyarılarla üç temel seri; osteoblastik, adipositik ve kondrositik seriye farklılaşabilen fibroblastoid hücrelerdir“ tanımıdır (57). MKHlerin farklı hücrelere dönüşebilmeleri (plastisite) son yıllarda yapılan bir çok çalışmada gösterilmiştir (57). MKH plastisitesi özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için dikkat çekicidir.

2.5.1. Kök Hücre Kaynakları

2.5.1.1. Embriyonel Kök Hücre

İnsanı oluşturan ilk hücre, babadan gelen sperm ile anneden gelen yumurtanın birleşmesiyle meydana gelir. Bu ilk hücreye yani döllenmiş yumurtaya “zigot” denilir. Daha sonra bu hücre bölünüp 2, 4, 8 hücre oluşturarak her 36 saatte bir sayısını ikiye katlar. İlk dört gün içerisindeki hücrelerin her biri tek başlarına bir insan oluşturabilecek potansiyele sahiptir yani “totipotent” dir. Anne karnındaki gelişimin 5’ inci günlerinde oluşan hücre topluluğuna “blastosit” denilir. Bu hücreler tek başlarına insan oluşturamaz ama insan vücudunda 200 ‘ den fazla sayıda bulunan tüm hücre türlerine dönüşebilir yani bu hücreler “pluripotent” yapıdadır. Blastosit adı verilen bu hücre kümesinden alınan hücrelerin her birine “embriyonel kök hücre” denilir.

2.5.1.2. Fetus Kök Hücresi

Kök hücreler düşük yapan kadınlardan alınan hücrelerden de elde edilebilir. Bu kök hücreler sınırsız sayıda bölünme ve kendilerini yenileme özelliğine sahiptir. Bölünerek çoğalan bu hücreler aynı genetik yapıdadır. Yani çoğalarak aynı kendileri gibi hücreler oluşturur. Embriyolardan elde edilen bu hücreler “pluripotent” yapıda, yani gerekli koşullar sağlandığında kas, sinir, karaciğer gibi her hücre türüne dönüşebilir. Ancak tek başlarına yeni bir organizma oluşturamazlar, yani “totipotent” değildirler.

2.5.1.3. Erişkin Kök Hücre

Erişkin kök hücreler, farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmış hücrelerdir. Her yaştaki insanda bulunan bu hücreler kendilerini yenileyebilir ve ihtiyaç duyulduğunda bulundukları dokulardaki değişik hücre türlerine dönüşür yani “multipotent” hücrelerdir. Erişkin kök hücreler, organizma yaşadığı süre boyunca kendilerinin kopyalarını üreterek çoğalır. Bu hücreler bulundukları dokulardaki eskiyen, hastalanan veya ölen hücrelerin yerine yenilerini üreten yedek parça kaynakları olarak görev yapar. Erişkin kök hücreler kemik iliği, kas göz, sinir karaciğer ve deri gibi dokularda bulunur. İnsan vücudunda en fazla erişkin kök hücresinin bulunduğu yer ise kemik iliğidir. Bu tür hücreler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır. Halen erişkin kök hücrelerinden tüm hücreler elde edilemez. Ait oldukları dokuların hücre türleri dışında

bir iki hücre türüne dönüşebilseler de vücuttaki tüm hücreler erişkin kök hücresinden elde edilemez.

Biz de çalışmamızda kök hücrelerin tedavide kullanımını araştırmak üzere rattan elde edilen erişkin tip adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre kullanmayı planladık.

2.5.1.4. Erişkin Kök Hücre İzolasyonu

Heparinize edilmiş enjektöre alınan doku aspiratı serum fizyolojik veya Phosphate Buffered Saline (PBS) ile seyreltilerek fikol dansite gradiyent yöntemi ile mononükleer hücre ayrımı yapılır. Fikol süpernatantından ayrılan hücre çökeltisi %20-30 Fetal Bovine Serum (FBS) içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) besiyerinde süspanse edilir. Hücre kültür flasklarında 48-72 saat 37 °C sıcaklıkta, %5 CO₂ içeren humidifiye inkübitörlerde inkübe edilir. Bu süre sonunda süpernatant ve plastiğe yapışmayan hücreler aspire edilerek uzaklaştırılır. Geriye kalan plastiğe yapışmış hücreler kültüre edilmeye devam edilir. Hücreler flask tabanının %75'ini kaplayınca tripsinasyon işlemi yapılarak yapışan hücrelerin tabandan ayrılması sağlanır. Daha sonra hücreler bölünerek taze besiyerlerine ekilir. Ortalama 2-6 pasaj sonra yeterli sayıda hücre elde edilmiş olur. Kullanıma hazır hale gelen hücreler daha sonra çalışılmak üzere dondurularak -80°C ile -196°C de saklanır (58,59).

2.5.2. Kök Hücre Kemik Doku Üzerine Etkisi

Son yıllarda kök hücrelerin potansiyel klinik kullanımları ile ilgili çok sayıda çalışama yapılmıştır. Özellikle kemik dokuya yönelik bu çalışmalar büyük defektlerin kapatılmasındaki sorunların aşılması için olmuştur.

Kırık kemiğin iyileşmesindeki esas hücreler puliripotent etkiye sahip mezenkimal kök hücrelerdir. Kemik uçlarının temas ettiği, kırık bölgesinin kanlanmasının bozulmadığı koşullarda kırık oluşmasından itibaren gelişen hematoma ve yangısal cevap mezenkimal hücrelerin bölgeye göç etmesini, çoğalmasını, farklılaşarak osteoblastlara dönüşmesini sağlamaktadır (60). Mezenkimal kök hücreler kas dokusu, yağ dokusu ve sinoviyumdan da elde edilebilmektedir (60). Ancak kemik iliği mezenkimal kök hücre yönünden daha yoğun bir içeriğe sahiptir ve elde edilmesi daha kolaydır. Çeşitli olgularda elde edilen kemik iliği hücrelerinin herhangi bir farklılaştırma işlemine tabi tutulmadan ve

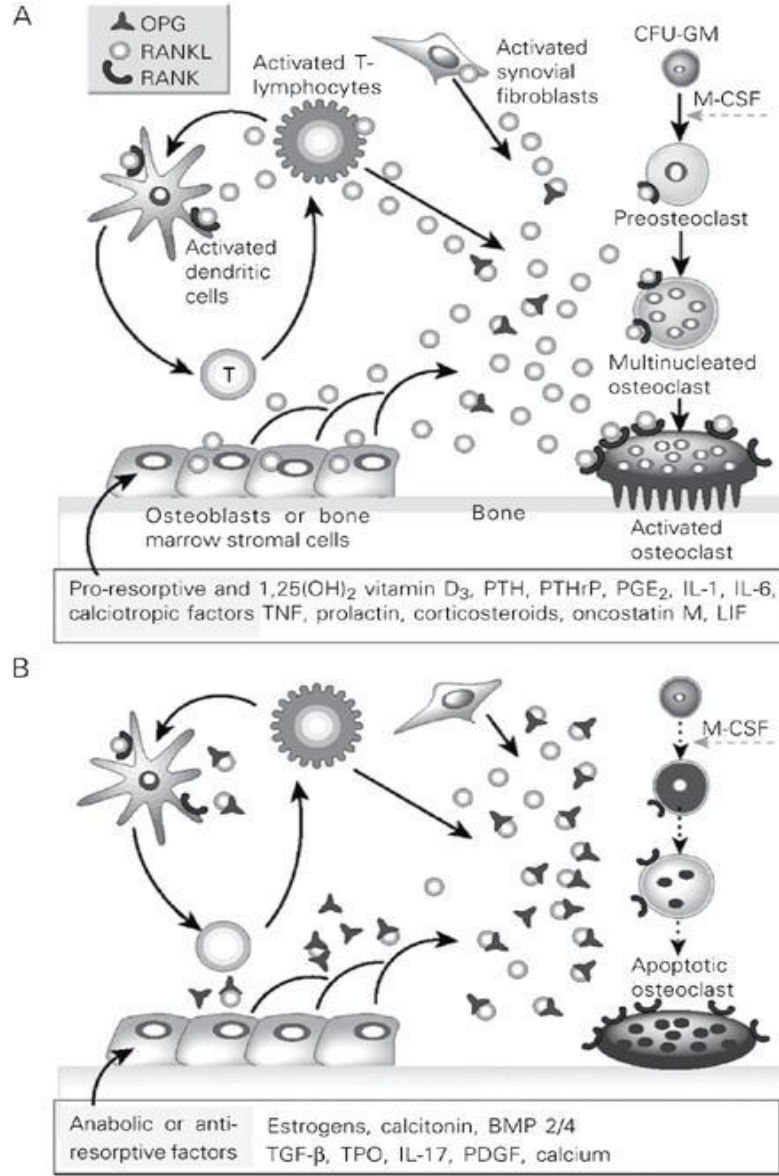
osteokondüktif destek yapı kullanmadan uygulanması sonucu başarılı sonuçlar bildirilmektedir (61).

Ural ve ark.'nın Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA)' da yaptıkları çalışmada da tavşanların her iki tibialarında defekt oluşturularak eksternal fiksator uygulanmıştır (62). Tibialardan birinde defekt bölgesine MKH lokal olarak verilmiş diğer tibia kontrol grubu olarak kullanılmış ve hiçbirşey verilmemiştir. Uygulamanın 15. günü ve bir ay sonra radyolojik olarak ve birinci ay sonunda histokimyasal olarak MKH uygulanan tarafta daha hızlı iyileşme sağlandığı ve eksternal fiksatorün tutulma süresinin kısaldığı gösterilmiştir (62). Bu gün için kemik iyileşmesinde ve defektlerin kapatılmasında osteoindüktif ve osteopromotif materyallerin gen ekspresyonu ile MKH' lerle kombine kullanımları ve defektlerin kapatılmasında skafoldlar ile MKH' lerin kombine edildiği çalışmalar yapılmaktadır. Çalışmalar göstermektedir ki bu da klinik olarak zaman içinde bu uygulamaların kansellöz otogreftlere alternatif olabileceğini göstermektedir (63,64).

Ahn ve arkadaşları ise tavşanlarda proksimal tibiada fizis defekti oluşturmuşlar. Defekt bölgelerine Tümör growth faktör (TGF) $\beta 3$ ile kültüre edilmiş MKH implante etmişler (65). Altı hafta sonra kontrol gruplarında 28-30°angulasyon gözlenirken MKH verilen tavşanlarda önemli bir angulasyon oluşmadığı gözlenmiştir. Fizis yaralanmalarının tedavisinde MKH uygulamaları yapılacak yeni çalışmalar ışığında alternatif bir tedavi olarak görünmektedir.

2.6. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B, Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand, Osteoprotegerin Geni

1997' de, birbirinden bağımsız iki araştırma grubu tarafından, kemik yıkımını engelleyen ve OPG olarak isimlendirilen yeni bir protein bulunmuştur (66,67). Daha sonra bu konudaki çalışmalar hızlanarak fizyolojik ve patolojik kemik rezorpsiyonunu kontrol eden iki farklı protein daha keşfedilmiştir. Bunlardan, RANK osteoklastlarda bulunan ve RANKL ile uyarılarak kemik yıkımına neden olan reseptördür (68,69).



Şekil 5. RANK, RANKL, OPG etki şeması

Reseptör aktivator nükleer kappa B ligand, osteoklastın aktivitesini artıran fiziksel ajandır. Ayrıca RANK ile etkileşime girerek preosteoklastları osteoklastik aktiviteye dönüşümünü sağlar ve onları aktive eder.

Osteoprotegerin, glikoprotein yapıda olup daha çok osteoblastlar tarafından sentezlenir. RANKL ile yarış içerisinde olup RANKL inhibitörü gibi davranır. Böylece kemik doku için yıkımı azaltarak kemik kütlesini arttırıcı işlev görür(70).

2.6.1. Osteoprotegerin geni

Osteoprotegerin başlangıçta 401 aminoasit olarak sentezlenen bir polipeptiddir. 21 amino asitlik propeptid kısmı ayrıldıktan sonra 380 amino asitlik olgun protein oluşur. Hücre dışına 60 kDa' luk monomerik ve 120 kDa' luk disülfid bağı içeren homodimerik, çözünür bir glikoprotein olarak salgılanır. OPG, tümör nekroz faktörü reseptörleri (TNFR) süper ailesinin bir üyesi olup TNFR süper ailesinin diğer reseptörlerinden farklı olarak transmembran ve sitoplazmik kısımlar içermez.

Osteoprotegerin osteoklastların yaptığı kemik yıkımını inhibe eder. Hipokalsemik ve antiresorptif etkilidir. Onun kemik dokudaki biyolojik etkileri, aşağıda anlatıldığı gibi, RANK/RANKL' ın etkisi ile terstir. OPG, RANKL' a bağlanarak bir tuzak reseptör gibi fonksiyon görür ve RANK' a bağlanmasını engeller. Sonuç olarak osteoklast farklılaşması ve aktivasyonu inhibe olur ve RANKL kemik rezorpsiyonu oluşturmaz (71).

2.6.2. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand Geni

Normal ve patolojik durumlarda kemik rezorpsiyonunun anahtar mediyatörü olan RANKL, TNF ligand ailesinin bir üyesidir. 40-45 kDa' luk membrana bağlı hücresel ve 32 kDa' luk biyolojik olarak aktif, çözünür iki formdan oluşmuş 317 amino asitlik bir peptiddir. Lenf nodları, timus ve akciğerde daha fazla olmak üzere dalak ve kemik iliği gibi dokularda ve osteoblastlarda sentezlenir.

RANKL; öncül ve olgun osteoklastlar, uyarılmış T ve dendritik hücrelerin yüzeyinde bulunan kendine ait reseptörü RANK' a bağlanarak bu hücreleri uyarır.

RANKL' ın kemikteki ana görevi osteoklast oluşumunu ve apoptozun inhibisyonunu sağlayarak kemik kaybı ve rezorpsiyonunu artırmaktır (72).

2.6.3. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Geni

Hücre dışı kısmı 28 amino asitlik sinyal peptid olan RANK, 21 amino asitlik kısa transmembran ve geniş sitoplazmik kısımları ile toplam 616 amino asitlik bir transmembran proteinidir (73). Preosteoklastlara RANKL' ın bağlanmasını sağlayan tek reseptördür. Osteoklastojenez ve kalsiyum metabolizmasını kontrol eden bu reseptörün; makrofaj/monositik hücreler, T ve B lenfositleri, fibroblastlar, dendritik hücreler ve öncül ve olgun osteoklastların yüzeyinde bulunduğu belirlenmiştir (73). RANK' ın aktivasyonu veya OPG' nin inhibisyonu yolu ile RANK sinyalinin artması ile

sonuçlanan RANK ve OPG genindeki mutasyonlar sırası ile ailesel ekspansil osteoliz (74) ve ailesel Paget hastalığında (75) saptanmıştır. RANK ve RANKL nakavt farede osteoklastların olmamasına bağlı olarak ağır osteopetrozis geliştiği belirtilmiştir (76).

2.6.4. Kemik Doku Üzerine Etkileri

RANK-RANKL-OPG sistemi de kemik düzenlenmesinde önemli bir role sahiptir. Bu sistem aracılığı ile osteoblast sinyalleri osteoklast üretimini stimüle eder.

Östrojen eksikliği durumunda OPG salgısı düşüktür ve bu sebeple osteoklast öncülleri RANKL' ye güçlü yanıt verirler. Yeteri kadar östrojenin olduğu durumda ise RANKL' ye bağlanmış OPG konsantrasyonu artar ve osteoklast üretimi azalır, böylece kemik döngüsü azalmış olur (77).

Otozomal resesif osteopetrozis (ORO) genellikle infant veya çocukluk çağında ölüme yol açan ciddi bir hastalıktır. TNFSF11 geni tarafından kodlanan RANKL ve TNFRSF11A geni tarafından kodlanan RANK proteinleri osteoklast olgunlaşması için önemli olup bu genlerdeki mutasyonların ORO gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir (78).

OPG/RANKL oranının kemik kütlesini belirleyen esas faktör olduğu belirtilmiştir (79). Osteoblastlar sentezledikleri RANKL miktarını değiştirebilirler ve RANKL sentezini indükleyen pek çok faktör osteoblastlarda OPG sentezini de düzenler. Genellikle RANKL seviyesindeki artma OPG seviyesindeki azalma ile birliktedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Histoloji Anabilim Dalı, Radyodiagnostik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı ve Biyokimya Anabilim Dalı imkanları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Çalışma, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 12.11.2014 tarih 14/138 karar no ile yapılmıştır.

3.1. DENEY HAYVANLARI VE ÇALIŞMA GRUPLARI

Bu çalışmada, Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik Araştırmalar Merkezinden temin edilen, 8 haftalık ve ortalama ağırlığı 200 gr olan 48 adet Wistar-albino cinsi dişi rat kullanıldı. Deney süresince aydınlık/karanlık (10/14 saat) ışık döngüsünde normal oda sıcaklığı ve neminde tutulan ratlar, standart pellet yem ve musluk suyu ile beslendi. Ratlar, her grupta 8 denek olacak şekilde 6 gruba ayrıldı.

GRUPLAR

GRUP A: Kontrol Grubu

Bu gruptaki 32 rat kontrol grubunu oluşturacak şekilde düzenlendi. Kontrol grubu 4'e ayrıldı.

Grup A1: Bu gruptaki 8 rata hiçbir cerrahi işlem yapılmadı ve diyabetik bir ajan verilmedi. 8 rattan oluşan grup diğer ratlarla beraber takip edildi. Onlarla beraber 18 haftalık takip sonrası iki yönlü radyografi çekildi ve sakrifiye edildi.

Grup A2: Bu gruptaki 8 rata osteotomi uygulanıp Kr teli ile fiksasyon sağlandı. Pseudoartroz prosedürü uygulanmadı. Kırık kaynaması için 10 hafta beklendi. Kaynama radyografi ile teyit edildi. 8 hafta takip edildi iki yönlü radyografi çekildi ve sakrifiye edildi.

Grup A3: Bu gruptaki 8 rata non-union prosedürüne uygun olarak osteotomi sonrası gap oluşturulup Kr teli ve staple ile fiksasyon sağlandı. 10 haftalık takip sonrası radyografi ile pseudoartroz doğrulandı. 8 haftalık takip sonrası iki yönlü radyografi çekildi ve sakrifiye edildi.

Grup A4: Bu gruptaki 8 rata öncelikle diyabet oluşturuldu ikinci aşamada non-union prosedürüne uygun olarak osteotomi sonrası gap oluşturulup Kr teli ve staple ile fiksasyon sağlandı. 10 haftalık takip sonrası non-union radyografi ile doğrulandı. 8 haftalık takip sonrası iki yönlü röntgen çekildi ve sakrifiye edildi.

GRUP B: Kök hücre Grubu

Bu gruptaki 16 rat çalışma grubunu oluşturacak şekilde düzenlendi. Çalışma grubu 2'ye ayrıldı.

Grup B1: Bu gruptaki 8 rata non-union prosedürüne uygun olarak osteotomi sonrası gap oluşturulup Kr teli ve staple ile fiksasyon sağlandı. 10 haftalık takip sonrası radyografi ile pseudoartroz doğrulandı. Non-union sahasına kök hücre uygulandı. 8 haftalık takip sonrası iki yönlü röntgen çekildi ve sakrifiye edildi.

Grup B2: Bu gruptaki 8 rata öncelikle diyabet oluşturuldu ikinci aşamada pseudoartroz prosedürüne uygun olarak osteotomi sonrası gap oluşturulup Kr teli ve staple ile fiksasyon sağlandı. 10 haftalık takip sonrası pseudoartroz radyografi ile doğrulandı. Pseudoartroz sahasına kök hücre uygulandı. 8 haftalık takip sonrası iki yönlü radyografi çekildi ve sakrifiye edildi.

3.2. HAZIRLIK VE OPERASYON

Deneklerden altışar adetlik gruplar rastgele ayrıldı. Öncelikle açlık kan şekerlerine bakılıp normal oldukları teyit edildi.

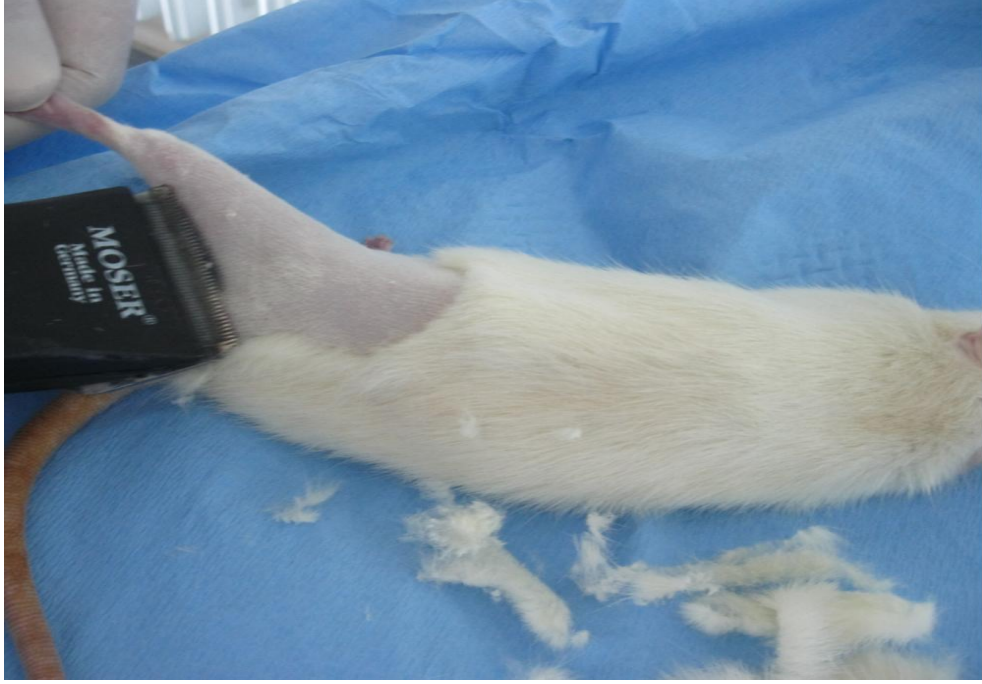
A4 ve B2 gruplarında Diyabet oluşturmak amaçlı 60 mg/kg dozunda STZ 0,1 mol/L sitrat tampon (Ph 4,4) çözeltisi içinde periton içi uygulandı (80). Hipoglisemiden korumak için denekler STZ uygulanmasını takiben ilk 24 saatte su yerine %5'lik glukoz çözeltisi ile beslendi. 3. Gün kan glukoz düzeyi > 200 olması ve idrar analizinde glikozüri varlığı ile diyabet tanısı konuldu ve diyabetik gruba alındı (81).

A2 nolu gruba 3 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 90 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Deneklerin sol alt ekstremiteleri kasığa kadar traş edildi ve operasyon masasına alındı. Operasyon sahası polivinil pirolidon-iyot (Batticon, Adeka, Samsun, Türkiye) ile dezenfekte edildi ve operasyon sahası açıkta kalacak şekilde steril kompreslerle örtüldü. Tüm ratlarda diz ve distal femur orta hat insizyonu ile artrotomi yapıldı. Cilt-cilt altı doku geçildikten sonra median parapatellar insizyonla diz eklemine girildi. Femur 1/3 orta-distal kısımları ortaya konuldu. Periost soyularak mini elektrikli testere (Medtronic, Triton, Microsagittal saw, USA) yardımıyla sol femurlar middiafizer bölgeden osteotomize edildi. Osteotomi sonrası ratların femurları matkap kullanılarak diz ekleminden retrograd olarak 1,5 mm' lik Kr telleri ile tesbit edildi. Tespit sonrası Kr tellerinin proksimal ve distalden femur içerisinde kalmasına özen gösterildi. Tespit sonrası osteotomi hattı ve insizyon sahası SF ile yıkandı. Yıkama sonrası kas doku ve cilt 3/0 keskin iğneli Vicryl (Johnson & Johnson, Brüksel, Belçika) ile usulüne uygun olarak kapatıldı. Ratlar anestezi sonrası derlenme süresi boyunca ayrı ortamlarda tutuldu ve derlenme sonrasında operasyon yerlerine konuldu. Operasyondan 10 hafta sonra Erciyes Üniversitesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı röntgen cihazında sol femur 2 yönlü radyografileri alındı. Radyoloji öğretim görevlisi Yrd.Doç.Dr. Serap Doğan tarafından kaynama teyit edildi.

A3, A4, B1, B2 nolu gruplara pseudortroz oluşturmak için 3 mg/kg ksilazin hidroklorid (Rompun, Bayer, Türkiye) ve 90 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) intraperitoneal olarak uygulandı. Deneklerin sol alt ekstremiteleri kasığa kadar traş edildi ve operasyon masasına alındı. Operasyon sahası polivinil pirolidon-iyot (Batticon, Adeka, Türkiye) ile dezenfekte edildi ve operasyon sahası açıkta

kalacak şekilde steril kompreslerle örtüldü. Tüm ratlarda diz ve distal femur orta hat insizyonu ile artrotomi yapıldı. Cilt-cilt altı doku geçildikten sonra median parapatellar insizyonla diz eklemine girildi. Femur 1/3 orta-distal kısımları ortaya konuldu. Periost soyularak mini elektrikli testere (Medtronic, Triton, Microsagittal saw, USA) yardımıyla sol femurlar middiafizer bölgeden osteotomize edildi. Osteotomi sonrası ratların femurları matkap kullanılarak diz ekleminden retrograd olarak 1,5 mm'lik Kr telleri ile tesbit edildi. Tespit sonrası Kr tellerinin proksimal ve distalden femur içerisinde kalmasına özen gösterildi. Kr telleri ile tespit işleminden sonra non-union oluşturmak için Garcia ve ark. (40)'nın tariflediği gibi osteotomi hattında 1,8 mm gap kalacak şekilde elektronik kumpas ile ölçüldü ve staple çivisiyle tespit yapıldı. Tespit sonrası osteotomi hattı ve insizyon sahası SF ile yıkandı. Yıkama sonrası kas doku ve cilt 3/0 keskin iğneli Vicryl (Johnson & Johnson, Belçika) ile usulüne uygun olarak kapatıldı. Ratlar anestezi sonrası derlenme süresi boyunca ayrı ortamlarda tutuldu ve derlenme sonrasında operasyon yerlerine konuldu. Operasyondan 10 hafta sonra Erciyes Üniversitesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı röntgen cihazında sol femur 2 yönlü radyografileri alındı. Radyoloji öğretim görevlisi Yrd.Doç.Dr. Serap Doğan tarafından non-union teyit edildi.

Non-union teyit edildikten sonra B1 ve B2 nolu gruplara daha önce Tıbbi genetik Anabilim Dalı'nda hazırlanmış olan kök hücreler yine tanımlanan anestezi eşliğinde non-union hattına deneklerin femur lateralinden yaklaşık açılan 2cm lik insizyonla ulaşarak 0,2 cc besin solüsyonunda 2×10^6 kök hücre non-union alanına verildi. Cilt altı-cilt kapatılarak denekler operasyon öncesi yerlerine yerleştirildi. Tüm gruplar bu işlemi takiben 8 haftalık takip sonrası önce iki yönlü röntgenleri çekildi. Sonrasında sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası deneklerin sol femurları yumuşak dokudan disseke edilerek tespit için formol çözeltisine konuldu.



Şekil 6. Deneklerin traş edilmesi



Şekil 7. Deneklerin ameliyat masasına alınışı



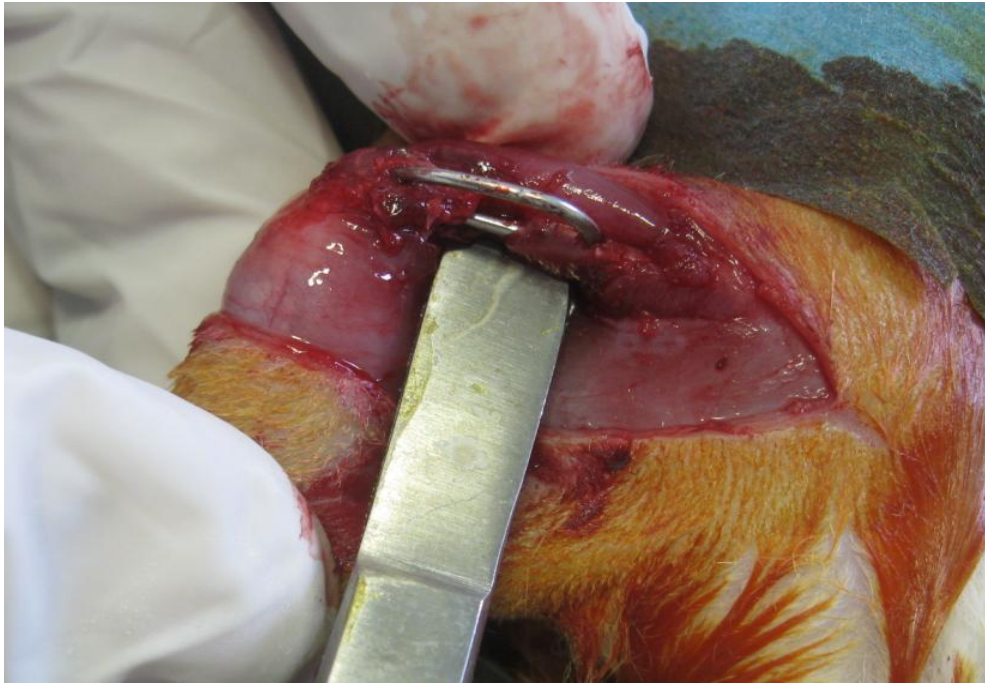
Şekil 8. Deneklerin boyanması ve steril örtülmesi.



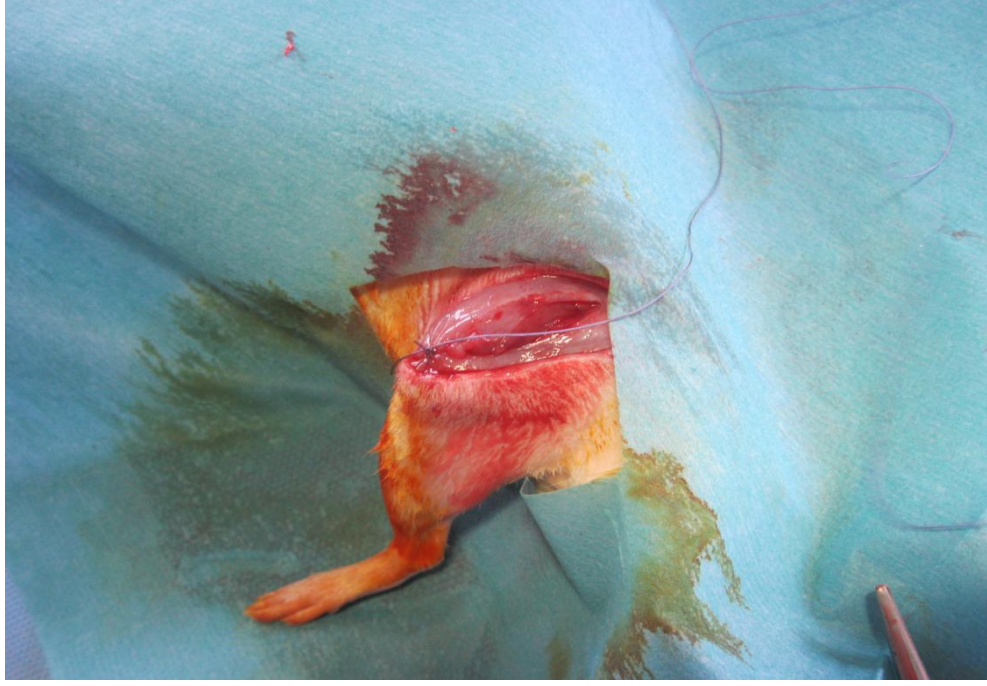
Şekil 9. Cilt insizyonu



Şekil 10. Kr teli ile femurun tesbiti



Şekil 11. Femurdaki gap korunacak şekilde staple çivisi ile tesbit.



Şekil 12. Kasın dikilmesi



Şekil 13. Postoperatif uyanmaya alınmaları

3.2.1. Diyabet Modelinin Oluşturulması

Diyabet modeli streptozotosinin intraperitoneal (İ.P) yolla verilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Deneklere 60 mg/kg (30 mg/ml yoğunluğunda çözelti) dozundaki streptozotosinin sitrat buffer içersindeki özeltisi Ph derecesi 4.4 olacak şekilde ayarlandıktan sonra tek doz olarak uygulandı(80).

Ratların her birinin enjeksiyondan önce (0.gün), enjeksiyondan sonra 1. Ve 10. Günlerde idrar ve kan glukozları lld.

İdrarda glukoz tayini, temiz fayans üzerine idrar yapması sağlanan ratların idrarına Stik(Medi-Test Combi 11) değdirilip renk skalasından okunarak yapılmıştır. Renk skalasında ++ veya +++ olan değerler glikozüri kriteri olarak kabul edildi (82).

Kan glukozu ölçümleri ise rat kuyruğundan alınan kan glukometreye damlatılarak aletin dijital ekranından mg/dl cinsinden kan glukozu değeri okunarak saptandı.



şekil 14. Kan glukoz düzeyinin ölçülmesi



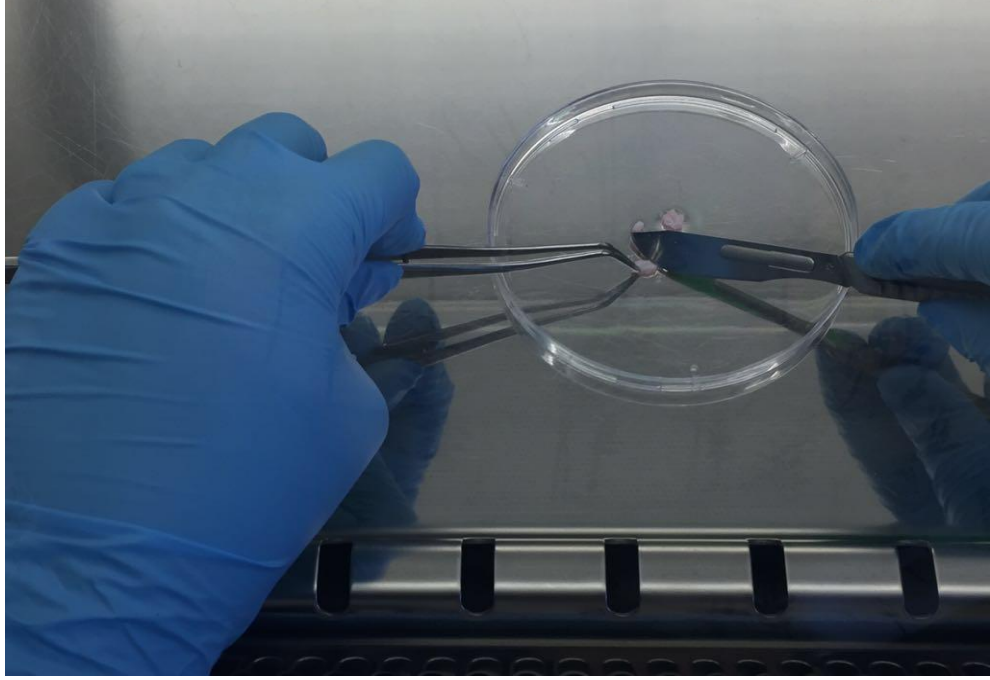
Şekil 15. İdrar glukozunun gösterilmesi

3.2.2. Kök Hücre Hazırlanışı ve Uygulanması

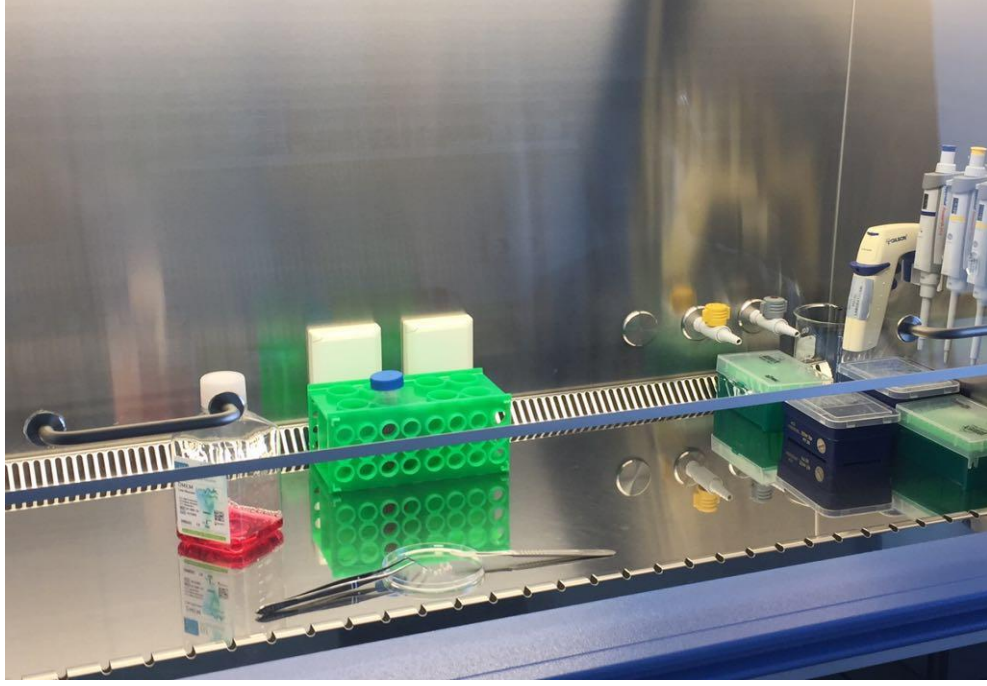
3.2.2.1. Rat Adipoz Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre İzolasyonu

İki adet erkek rattan yaklaşık olarak $1 \times 1 \text{ cm}^3$ periton çevresinden adipoz doku toplandı. Toplanan adipoz doku taşıma solüsyonu içerisinde Erciyes Üniversitesi, Genom ve Kök Hücre Merkezi, Kök Hücre AR-GE laboratuvarına taşındı. Getirilen doku, 1% penisilin- streptomisin solüsyonu (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) içeren phosphate-buffered saline (PBS) içinde üç defa yıkandı. Ardından doku parçaları PBS (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) içinde 2.5 mg/ml kollojenaz tip 2 (Sigma–Aldrich, Taufkirchen, Germany) ile 37°C 'de 30 dakika enzimatik parçalamaya tabii tutuldu. Bu işlem sonunda elde edilen tek hücre süspansiyonu, $70 \mu\text{m}$ 'lık hücre filtresinden (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA) geçirildi. Böylece debris ve parçalanmayan adipoz doku ayrıldı. Elde edilen hücre süspansiyonu 25 cm^2 'lık kültür flasklarına ekildi. Kültür için kullanılan besiyerinin içeriği: %10 fetal sığır serumu (FBS) içeren düşük glikozlu DMEM (L-DMEM medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ve 1% penicillin streptomycin solüsyonu ve 1% glutamin (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel)'dir. Hücreler 37°C 'de ve 5% CO_2 içeren ortamda inkübe edildiler. İlk olarak üç gün sonra

ve ardından haftada iki defa besiyeri değiştirilerek idamesi sağlandı. Adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücre (AD-MKH)' ler kültür kabına yapışma zellikne göre izole edildiler. 70-80% hücre yoğunluğa ulaşıldığında primer hücre kültürünün 0.025% trypsin-EDTA ile deataçmanı sağlandı. Hücreler PBS (Biological Industries, Kibbutz Beit Haemek, Israel) ile yıkandıktan sonra pasajlama işlemi gerçekleştirilerek 1:4 oranında alt kültürlere geçildi. Bu alışmada 3. Pasaj sayısındaki AD-MKH'ler kullanıldı.



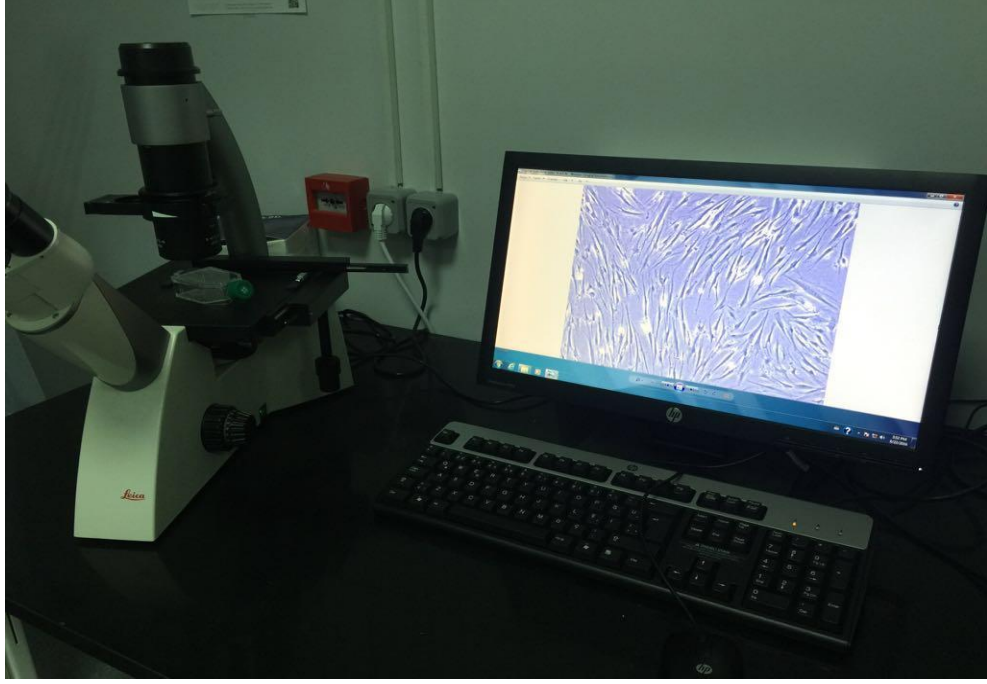
şekil 16. Adipoz dokudan kök hücre elde edilmesi



Şekil 17. Adipoz dokudan kök hücre elde edilmesi



Şekil 18. Kök hücrelerin 37°C’de ve 5% CO2 içeren ortamda inkübe edilmesi



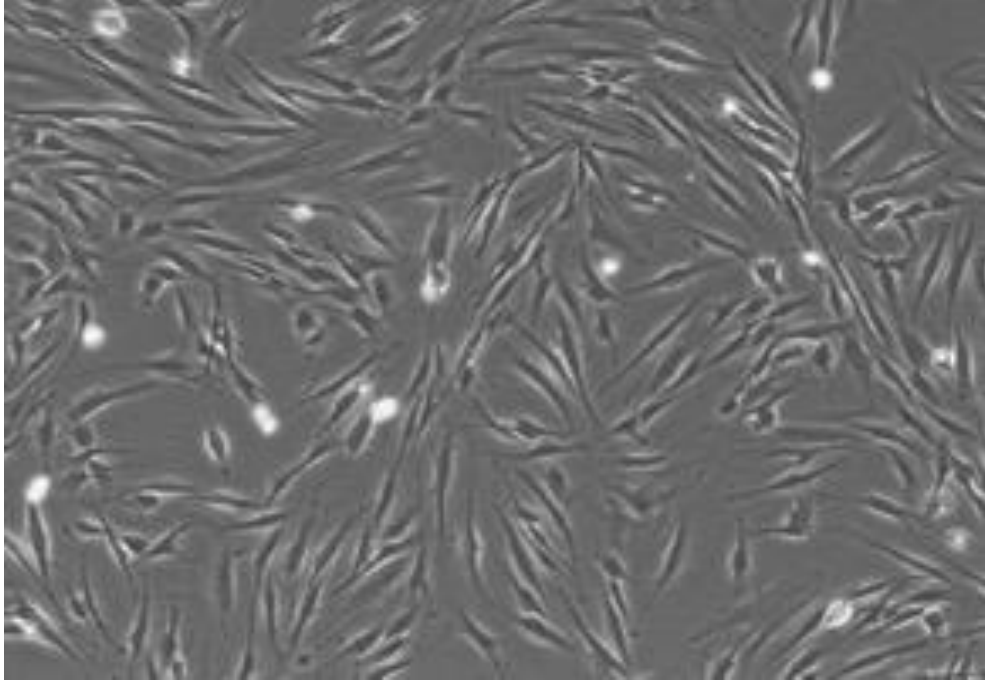
Şekil 19. Kök hücrelerin mikroskop altında incelenmesi

3.2.2.2. Akım sitometri ile AD-MKH' lerin karakterizasyonu

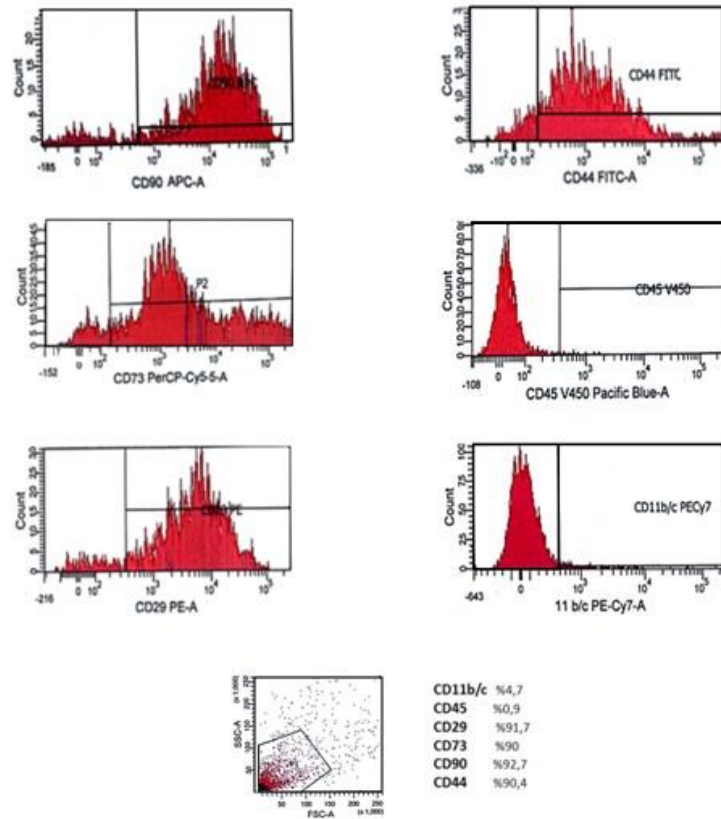
Farklılaştırılmamış AD-MKH'lerin fenotipik özelliklerini göstermek için akım sitometri gerçekleştirildi. 3. Pasaj sonu hücreler toplandı ve santrifüj edildi. Ardından 10^6 hücre /mL olacak şekilde PBS ile resüspansiyonu yapıldı. AD-MKH'lerin immunfenotiplendirilmesi için CD11b/c, CD29, CD44, CD45, CD73, CD90 (BD Biosciences) kullanıldı. Akım sitometri Navios (BeckmanCoulter, USA) cihazında gerçekleştirildi. Veriler KALUZA software (Beckman Coulter, USA) kullanılarak değerlendirildi. 50%'den fazla boyanma pozitif olarak değerlendirildi.

3.2.2.3 Mezenkimal Kök Hücre Bulguları

MKH'ların tipik iğsi görünümde olduğu tespit edildi (Şekil 20). Herhangi bir komplikasyon olmadan hücre kültür gerçekleştirildi. Morfolojilerinin tipik iğsi, fibroblast benzeri MKH karakteri taşıdığı tespit edildi. Pasajlama esnasında morfolojik değişiklik tespit edilmedi. İstenilen sayıda hücreye 3. pasajda kolaylıkla ulaşılabildi. Akım sitometri ile yapılan karakterizasyon sonucunda AD- MKH' ların mezenkimal kök hücre belirteçlerini eksprese ettikleri bulundu. CD11b/c %4,7; CD45 %0,9; CD29 %91,7; CD73 %90; CD90 %92,7; CD44 %90,4 olarak tespit edildi (Şekil 21).



Şekil 20. AD-MKH morfolojik görüntüsü, ışık mikroskop



Şekil 21. Akım sitometri’de AD-MKH’ler CD29, CD 44, CD73, ve CD90 pozitif iken CD 11b/c ve CD45 negatif olarak tespit edildi.

3.2.2.4 Mezenkimal Kök Hücre Uygulanması

On haftalık bekleme sonrası radyolojik olarak Non-union kanıtlanan B1 ve B2 grublarına üretilen adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücreler ketamin-ksilazin anestezisi altında rat femurundaki non-union hattı ve çevresine yaklaşık 1 cm' lik insizyonla girilerek 0,1 ml'de 2 milyon kök hücre olacak şekilde enjekte edildi. Kontrol grublarına ise 0,1 ml serum fizyolojik rat femurundaki non-union hattı ve çevresine verildi. Daha önceki yöntemde olduğu gibi kas ve derinin suturasyonu sonrası işleme son verildi.

3.2.3. Deney Hayvanlarının Sakrifiye Edilmesi

Deneklere ketamin-ksilazin anestezisi uygulandıktan sonra radyolojik değerlendirme için sol femurlarının yan grafileri çekildi. Biyokimyasal çalışma için intrakardiyak 3 ml kan alındıktan sonra intrakardiyak potasyum klorür enjeksiyonu (% 75 KCl, Galen A.Ş. Türkiye) ile tüm ratlar sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası tüm deneklerin sol femurlarına iki yönlü grafi çekilerek % 10 formalin içerisinde histopatolojik çalışma için ayrıldı.

3.3. RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME

Tüm deneklerde ameliyat sonrası 10 hafta beklendi. Non-union gelişimini göstermek amacıyla ketamin-ksilazin anestezisi altında Erciyes Üniversitesi Radyodiagnostik Anabilim Dalı'nda Siemens Multix C (Japonya) marka röntgen cihazı ile sol femurlarının ön-arka grafileri çekildi. Yine tüm ratlarda sakrifikasyon öncesi anestezisi altında non-union iyileşmesini değerlendirmek amacıyla sol femurlarının ön-arka grafileri çekildi. Daha sonra 1 ortopedi ve travmatoloji ve 1 radyoloji uzmanı tarafından farklı zamanlarda birbirinden bağımsız olarak 2 kez değerlendirildi. Değerlendirmede Lane-Sandhu sınıflaması kullanıldı (83).

Tablo 1. Radyoloji skorum sistemi

Radyolojik verileri değerlendirmek için Lane-Sandhu sınıflaması(83)	
0	Kallus yok
1	Kallus formasyonu var
2	Kemiksel kaynama başlangıcı
3	Kırık hattının görülmemesi
4	Tam kemiksel kaynama

Kök hücre uygulanan gruplarla beraber bütün gruplar uygulama sonrası 8 hafta beklenilerek röntgenleri çekildi kaynama dereceleri yine aynı şekilde 1 ortopedi ve travmatoloji ve 1 radyoloji uzmanı tarafından farklı zamanlarda birbirinden bağımsız olarak 2 kez değerlendirildi. Değerlendirmede Lane-Sandhu sınıflaması kullanıldı.

3.4. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Histopatolojik inceleme için pseudoartroz sahasını içeren kemik doku örnekleri % 10'luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonunda tesbit edildi. Kemik doku örnekleri daha sonra asetik asit ve formik asit içeren asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında osteotomi sahasını ortalayacak şekilde kemik parçası kesilerek ayrıldı. Daha sonra bu kemik parçası sagittal düzlemde 2'ye ayrıldı. Elde edilen parçalar giderek artan derecelerde etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde şeffaflaştırılan dokular son olarak parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 4-6 mikron kalınlığında kesitler hemotoksilen eozin (HE), nuclear fast red ve alcian blue ile boyandıktan sonra Nikon Optiphot-2 marka ışık mikroskopunda Hua ve ark. (84)'nın tarif ettiği histolojik skorum sistemi kullanılarak değerlendirildi .

Tablo 2. Histoloji skorum sistemi

Histolojik verileri değerlendirmek için Huo ve ark.(84)'nın kullandığı skorum sistemi
Derece 1 fibröz doku
Derece 2 ağırlıklı fibröz doku, az miktarda kıkırdak
Derece 3 eşit oranda fibröz ve kıkırdak doku
Derece 4 ağırlıklı kıkırdak, az miktarda fibröz doku
Derece 5 kıkırdak doku
Derece 6 ağırlıklı kıkırdak, az miktarda immatür kemik
Derece 7 eşit oranda kıkırdak ve immatür kemik doku
Derece 8 ağırlıklı immatür kemik, az miktarda kıkırdak doku
Derece 9 immatür kemik ve kırık iyileşmesi
Derece 10 matür kemik ile kırık iyileşmesi

3.5. GENETİK DEĞERLENDİRME

Genetik değerlendirme için non-union sahasını içeren kemik doku örnekleri % 10'luk tamponlanmış nötral formaldehit solüsyonunda tesbit edildi. Kemik doku örnekleri daha sonra asetik asit ve formik asit içeren asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında osteotomi sahasını ortalayacak şekilde kemik parçası kesilerek ayrıldı. Daha sonra bu kemik parçası sagittal düzlemde 2' ye ayrıldı. Elde edilen parçalar giderek artan derecelerde etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Ksilolde şeffaflaştırılan dokular son olarak parafin içine gömülerek bloklandı. Parafin bloklardan alınan 4-6 mikron kalınlığında kesitler alındı. Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı' nda RANK, RANKL, OPG gen analizleri yapıldı.

3.5.1 RANK, RANKL, OPG gen PCR analizi

Gen miktar ölçümü, Polimeraz Chain Reaction (PCR) tekniği kullanılarak mRNA miktarını arttırarak ölçülmesi esasına dayanılarak yapıldı.

Prensip: Eşzamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Uygulanması (EZ-PZR)

Tüm olgulara ait H&E kesitlerde kırık iyileşmesinden sorumlu hücrelerinden zengin, stromadan fakir alana uyan doku örneği EZ-PZR değerlendirilmesi için bloktan çıkarıldı. RNA izolasyonu yapabilmek için Qiagen miRNeasy FFPG Kiti (Qiagen, Penzberg, Germany) kullanıldı. Önerilen prosedüre göre önce dokudaki parafin kimyasal (Ksilen) yolla uzaklaştırıldı, daha sonra örnek sırasıyla santrifüj, ethanol, trizol, lyzis solusyonu, mercapta ethanol ve tissue lyser işlemlerinden geçirilerek DNA ve RNA açığa çıkarıldı. RNA izolasyonu için sırasıyla kloroform, santrifüj, ethanol işlemlerini takiben örnek RNeasy spinkolonda bir dizi işleminden geçirildi ve RNA izolasyonu sağlandı. RNA izolasyonunun yeterliliği nanodropta ölçüm yapılarak (A260/A280 ve A260/A230 değerleri>10 ng/ul) değerlendirildi. m-RNA'ların, c-DNA'ya dönüştürme işleminde, içinde 4 ayrı reaktif içeren (revers transkriptaz enzimi, RNAaz inhibitörü, nükleotidler, tampon) Roche Transcriptor High Fidelity cDNA synthesis kiti (Roche, Penzberg, Germany) kullanıldı. m-RNA içeren c-DNA'ların yeterliliğinde kontrol geni olarak "beta-aktin" ile çalışıldı. Ct değerleri 20-30 arasında ise uygun, Ct değerleri >30 ise bu değer RANK, RANKL, OPG çalışması için uygun

değil olarak kabul edildi. Her denek örneği için elde edilen m-RNA, c-DNA'ya dönüştürüldü. Hazırlanan c-DNA'lardan da RANK, RANKL, OPG/referans gen konsantrasyonu EZ-PZR yöntemi ile saptandı. Bu oransal değer 2 ve üzerinde ise EZ-PZR pozitif olarak kabul edildi.

3.6. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Veriler SPSS (Statistical Package for Social Science) istatistik paket programı (SPSS for Windows 17.0) ile değerlendirildi. Nicel verilerin normal dağılımına uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov Testi, Mann-Whitney Test ve T-Test ile bakıldı. Normal dağılıma uyan verilerin istatistikleri $\bar{x} \pm$ standart sapma (ss) olarak tanımlandı. Gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığına Tek Yönlü Varyans Analizi ile bakıldı. Varyans analizi sonucu fark çıkan grupların çoklu grupların karşılaştırmalarında Tukey Testi'nden yararlanıldı.

Nitel değişkenler için frekans ve yüzde değerler verildi. Nitel değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki kare (χ^2) testi, Mann-Whitney Test ve T-Test kullanıldı. $P < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. RADYOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Çalışmada Lane-Sandhu skarlama (83) sistemi kullanılarak oluşturulan altı gruptaki sekiz rat radyolojik kaynama açısından bir radyolog ve bir ortopedist tarafından skorlandı. Skarlama sonuçları her grup için aşağıda verildi.

Tablo 3. A1 grubu radyoloji skoru

Kontrol	10. hafta		18. hafta			
	Radyolojik skor		Radyolojik skor			
A1	Ort.	Rad.	Ort.	Ort.	Rad.	Ort.
1	4	4	4	4	4	4
2	4	4	4	4	4	4
3	4	4	4	4	4	4
4	4	4	4	4	4	4
5	4	4	4	4	4	4
6	4	4	4	4	4	4
38	4	4	4	4	4	4
39	4	4	4	4	4	4
Toplam	32	32	32	32	32	32

Tablo 4. A2 grubu radyoloji skoru

	10. hafta			18. hafta		
Kontrol	Radyolojik skor			Radyolojik skor		
A2	Ort.	Rad.	Ort.	Ort.	Rad.	Ort.
7	4	4	4	4	4	4
8	2	2	2	4	4	4
9	2	2	2	4	4	4
10	4	4	4	4	4	4
11	2	2	2	4	4	4
16	2	2	2	2	2	2
40	3	3	3	3	3	3
41	3	3	3	3	3	3
Toplam	22	22	22	28	28	28

Tablo 5. A3 grubu radyolojik skoru

	10. hafta			18. hafta		
Kontrol	Radyolojik skor			Radyolojik skor		
A3	Ort.	Rad.	Ort.	Ort.	Rad.	Ort.
12	0	0	0	1	1	1
13	0	0	0	1	1	1
14	0	0	0	1	1	1
15	0	0	0	2	2	2
17	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0
42	0	0	0	1	1	1
43	0	0	0	2	2	2
Toplam	0	0	0	8	8	8

Tablo 6. A4 grubu radyolojik skoru

	10. hafta			18. hafta		
Kontrol	Radyolojik skor			Radyolojik skor		
A4	Ort.	Rad.	Ort.	Ort.	Rad.	Ort.
21	0	0	0	0	0	0
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	1	1	1
44	0	0	0	1	1	1
45	0	0	0	1	1	1
46	0	0	0	0	0	0
47	0	0	0	0	0	0
Toplam	0	0	0	3	3	3

Tablo 7. B1 grubu radyolojik skoru

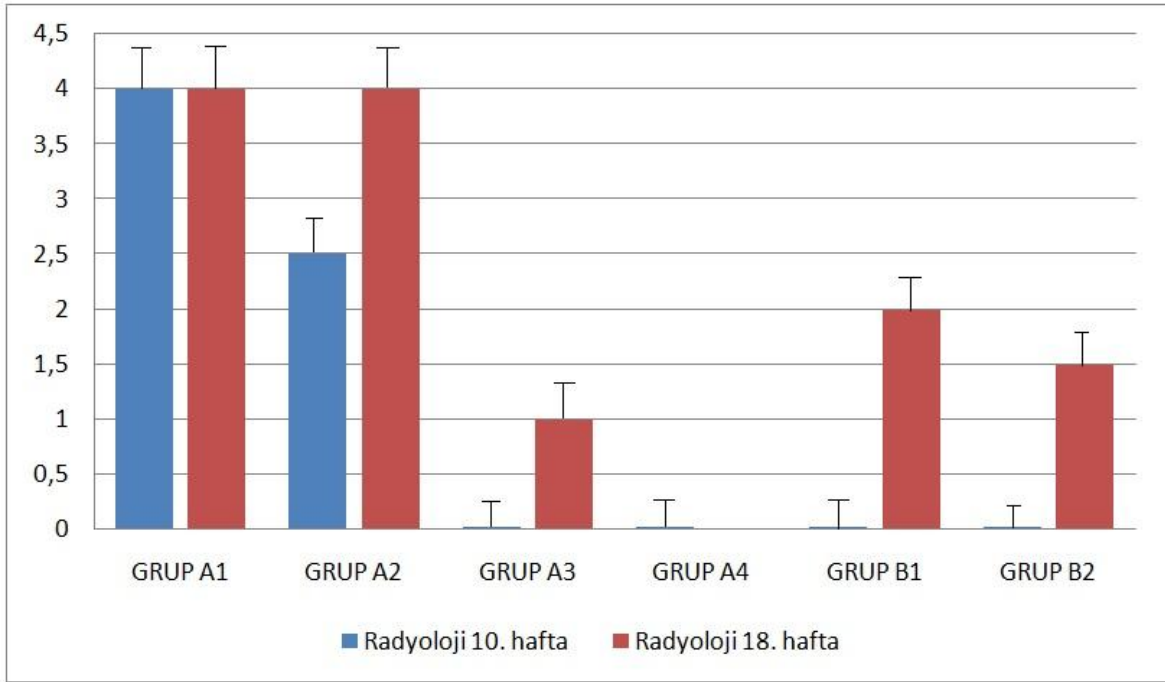
	10. hafta			18. hafta		
Kontrol	Radyolojik skor			Radyolojik skor		
B1	Ort.	Rad.	Ort.	Ort.	Rad.	Ort.
25	0	0	0	4	4	4
26	0	0	0	3	3	3
28	0	0	0	2	2	2
29	0	0	0	2	2	2
30	0	0	0	2	2	2
48	0	0	0	2	2	2
49	0	0	0	2	2	2
50	0	0	0	2	2	2
Toplam	0	0	0	19	19	19

Tablo 8. B2 grubu radyolojik skoru

	10. hafta			18. hafta		
Kontrol	Radyolojik skor			Radyolojik skor		
B2	Ort.	Rad.	Ort.	Ort.	Rad.	Ort.
19	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	2	2	2
32	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	2	2	2
34	0	0	0	1	1	1
35	0	0	0	2	2	2
36	0	0	0	1	1	1
37	0	0	0	2	2	2
Toplam	0	0	0	10	10	10

Tablo 9. Grupların radyolojik skorlarının 10. ve 18.haftada karşılaştırılması

	A1 GRUP	A2 GRUP	A3 GRUP	A4 GRUP	B1 GRUP	B2 GRUP	P
10.Hafta Radyoloji	4 (4-4) n 8	2,5 (2-4) n 8	0 (0-0) n 8	0 (0 -0) n 8	0 (0-0) n 8	0 (0-0) n 8	<0,001
18.Hafta Radyoloji	4 (4-4) n 8	4 (2-4) n 8	1 (0-2) n 8	0 (0-1) n 8	2 (2-4) n 8	1,5 (0-2) n 8	<0,001



Şekil 22. Grupların radyolojik skorlarının karşılaştırılmasında onuncu ve onsekizinci hafta gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı.

Radyolojik sonuçlar karşılaştırıldığında kontrol grupları (A3, A4) ile çalışma grupları (B1, B2) arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$)(Tablo 10,Şekil 18). Tüm grupların kaynama durumlarına göre almış oldukları puanlar (Tablo 10,Şekil 18) verildi. Kontrol grubundan A1 grubu 32 puan, A2 grubu 28 puan, A3 grubu 8 puan, A4 grubu 4 puan iken çalışma grubundan B1 grubu 19 puan, B2 grubu 10 puan aldı.

Kırık sonrası distraksiyon uygulanmayan A2 grubunda 5 ratta tam kemiksel kaynama (% 62,5) 2 ratta kırık hattının görülmemesi (% 25) 1 ratta kaynama başlangıcı (%12,5) distraksiyon uygulanan A3 grubunda 4 ratta kallus (%50) 2 ratta kaynama başlangıcı (% 25) göre kaynama anlamlı olarak görüldü.A2 ve A3 grupları karşılaştırıldıklarında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Böylece Garcia ve ark. (60) tariflediği distraksiyonun ve periost harabiyetinin kaynamaya negatif etkisi ve non-union oluşumundaki etkisi gösterildi.

Non-unionun sonrası kaynamamanın en fazla görüldüğü grup A4 iken, non-union sonrası en fazla kaynama B1 grubunda görüldü. Bu iki grup arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı ($p<0,05$).

Gruplar aralasında kök hücrenin etkinliğine bakıldığında, diyabet olmayan ve non-union alanına kök hücre uygulanmayan A3 grubunda 2 ratta kaynama başlangıcı (%25) 4 ratta kallus (%50) izlenirken diyabet olmayan ve non-union alanına kök hücre verilen B1 grubunda 1 ratta tam kemiksel kaynama (% 12,5) 1 ratta kırık hattının izlenmemesi (% 12,5) 6 ratta kaynama başlangıcı (% 75) görüldü. A3 ile B1 grubu karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı sonuca ulaşıldı ($p<0,05$). Bu sonuç kök hücre tedavisinin etkinliğinin non-union iyileşmesine radyoloji açısından olumlu olduğunu gösterdi.

Diyabet olan ve non-union alanına kök hücre uygulanmayan A4 grubunda 4 ratta kallus (% 50) izlenirken diyabet olan non-union alanına kök hücre uygulanan B2 grubunda ise 2 ratta kallus (% 25) 4 ratta kaynama başlangıcı (% 50) izlendi. Diyabetli olan A4 ve B2 gruplarının karşılaştırmasında tek değişkenin kök hücre uygulanması olduğu ve bu değişkeninde anlamlı fark oluşturduğu ($p<0,05$) izlendi. Her iki gruptaki kaynama gecikmesinin bu grublardaki diyabetin olumsuz etkisine bağlı olabileceği düşünüldü. Aynı zamanda kök hücre tedavisinin olumlu etkisinin diyabetin olumsuz etkisiyle sınırlı kaldığı düşünüldü.

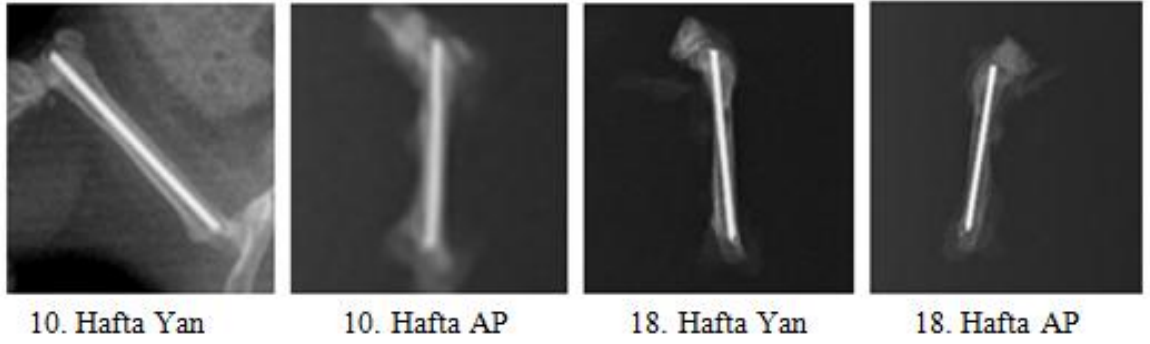
Diabetin non-union iyileşmesindeki rolüne bakıldığında, A3 ile A4 grubu her ikisinde de on haftalık bekleme süresinden sonra non-union kanıtlandı. Sonrasında çalışma bitimine kadar sekiz haftalık takip süreci yapıldı. İki grup arasında çalışma esnasındaki fark A4 grubunun çalışma başlangıç aşamasında yapılmış olan diyabet oldu. 10. Haftada A3 ve A4 grubu puanları non-unionla uyumlu olarak 0 olarak saptandı. Her iki grupta 8 haftalık takip sonrası A3 grubunda 2 ratta kemiksel kaynama başlangıcı (% 25) 4 ratta kallus (% 50) iken A4 grubunda 4 ratta kallus (%50) olarak izlendi. İki grub arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Sonuç olarak kırık sonrası radyolojik non-unionun en fazla görüldüğü grup A4 olurken, A2 grubu da en fazla kaynamanın görüldüğü grup oldu ve bu iki grup arasında istatistiksel anlamlı sonuca ulaşıldı ($p<0,05$). Bu kırık sonrası non-union oluşumunda kırık uçları arasındaki mesafenin non-union oluşumunda temel faktör olduğunu ve diyabetin iyileşmeye negatif etkisini doğruladı.

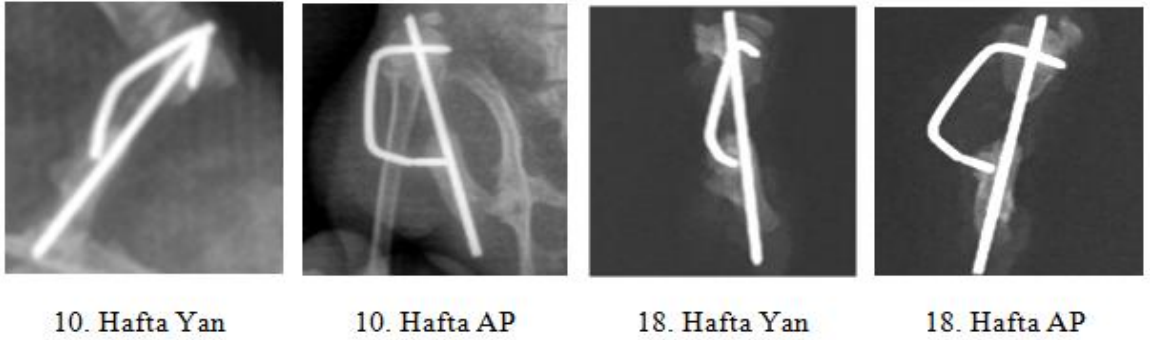
Onuncu hafta radyolojik değerlendirmenin istatistiksel sonuçlarına bakıldığında (A2, A3) grupları arasında, (A1, A3) grupları arasında, (A2, A4) grupları arasında , (A2, B1) grupları arasında , (A1, B1) grupları arasında, (A2, B2) grupları arasında,

(A1, B2) grupları arasında ve (A1, A4) grupları arasında anlamlı fark izlenmesi non-unionun A3, A4, B1 ve B2 gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde oluşturulduğunu gösterdi.

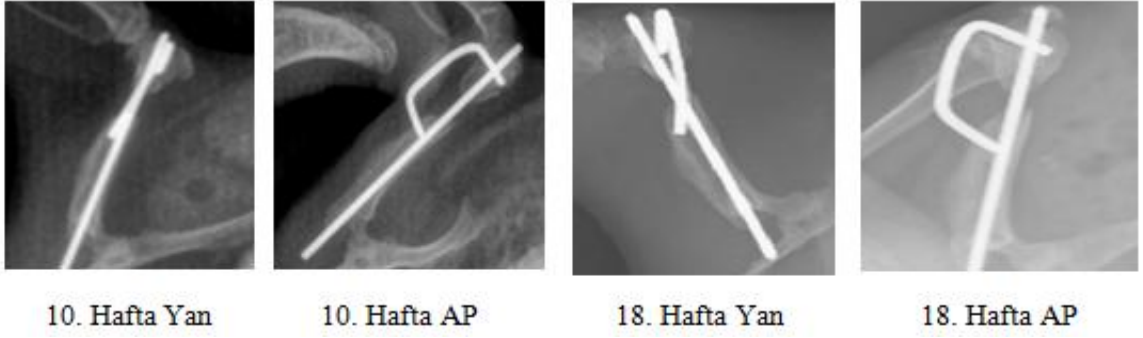
Onsekizinci hafta radyolojik değerlendirmenin istatistiksel sonuçlarına bakıldığında (A2, A4) grupları arasında, (A1, A4) grupları arasında, (A2, A3) grupları arasında, (A1, A3) grupları arasında, (A2, B2) grupları arasında, (A1, B2) grupları arasında, (A3, B1) grupları arasında, (A4, B2) grupları arasında anlamlı fark izlendi.



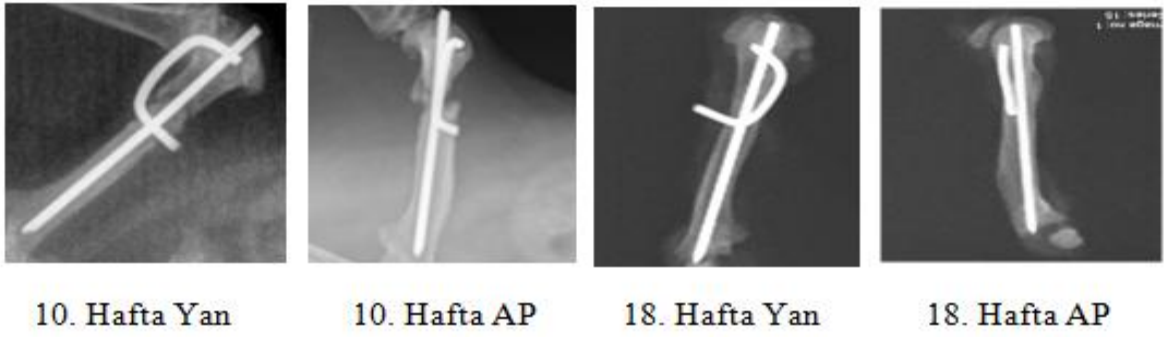
Şekil 23. A2 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi



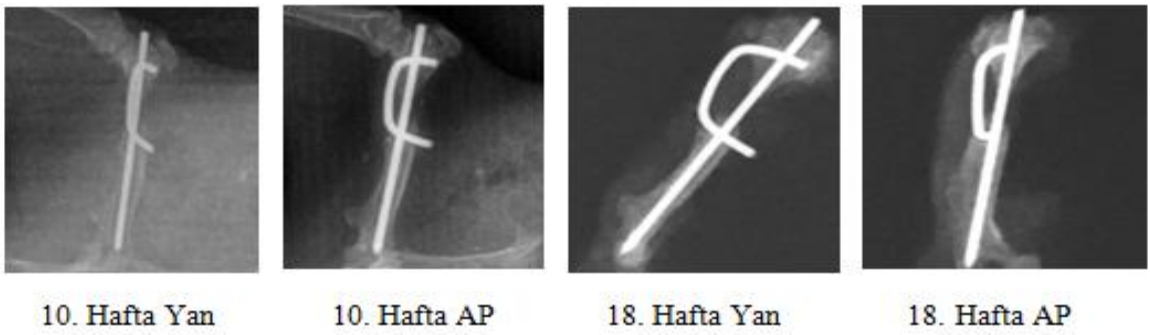
Şekil 24. A3 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi



Şekil 25. A4 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi



Şekil 26. B1 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi



Şekil 27. B2 grubundan seçilen bir deneğin radyografisi

4.2. HİSTOPATOLOJİ SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Histolojik inceleme Huo ve ark. (84)'nın daha önce tanımladığı skarlama sistemi kullanılarak gruplar skorlandı ve karşılaştırıldı. Aşağıda her grubun aldığı skor değerleri verildi.

Tablo 10. A1, A2 grubunun histolojik skorları

Grup A1	Histopatoloji skoru	Grup A2	Histopatoloji skoru
1	10	7	10
2	10	8	10
3	10	9	9
4	10	10	9
5	10	11	10
6	10	16	6
38	10	40	10
39	10	41	10
Toplam : 80		Toplam : 74	

Tablo 11. A3, A4 grubunun histolojik skorları

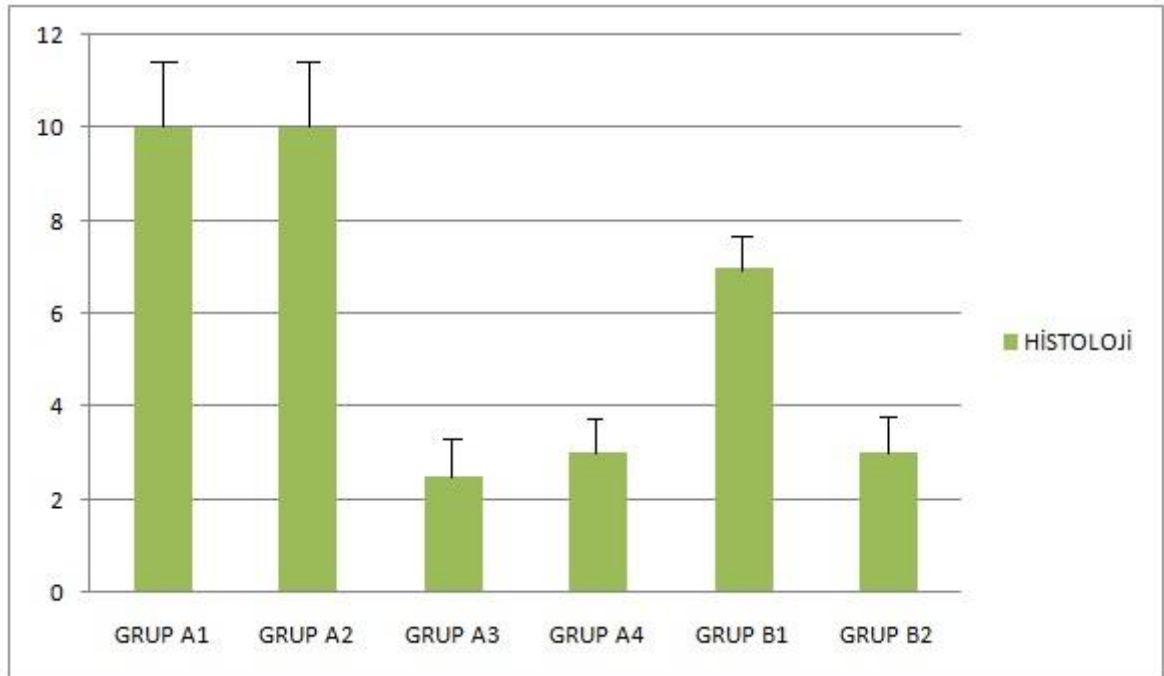
Grup A3	Histopatoloji skoru	Grup A4	Histopatoloji skoru
12	1	21	4
13	2	22	1
14	2	23	1
15	6	24	7
17	4	44	3
18	2	45	2
42	6	46	3
43	3	47	3
Toplam : 26		Toplam : 24	

Tablo 12. B1, B2 grubunun histolojik skorları

Grup B1	Histopatoloji skoru	Grup B2	Histopatoloji skoru
25	8	31	3
26	7	32	4
28	7	33	3
29	6	34	0
30	7	35	8
48	7	36	3
49	8	37	3
50	8	19	3
Toplam : 58		Toplam: 27	

Tablo 13. Gruplar arasında histolojik skorların karşılaştırılması

	A1 GRUP	A2 GRUP	A3 GRUP	A4 GRUP	B1 GRUP	B2 GRUP	P
Histoloji	10 (10-10) n 8	10 (6-10) n 8	2,5 (1-6) n 8	3 (1-7) n 8	7 (6-8) n 8	3 (0-8) n 8	<0,001

**Şekil 28.** Gruplar arasında histoloji karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$).

Histopatoloji inceleme sonuçları değerlendirildiğinde kontrol (A1, A2, A3, A4) ve çalışma (B1, B2) grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,05$) (Tablo 13, Şekil 28).

Yapılan mikroskopik incelemede A1 kontrol grubu hiçbir işlem yapılmayan grup olduğu için histolojisinde matür kemik dokusu izlendi.

A2 kontrol grubunda ise kırık oluşturulup tesbit edilmiş ve radyolojide kaynaması izlenmişti. Histolojik değerlendirmesi de bu işlemlerle uyumlu olarak sekiz ratın hepsinde osteotomi hattında matür-immatür kemik ile iyileşme görüldü.

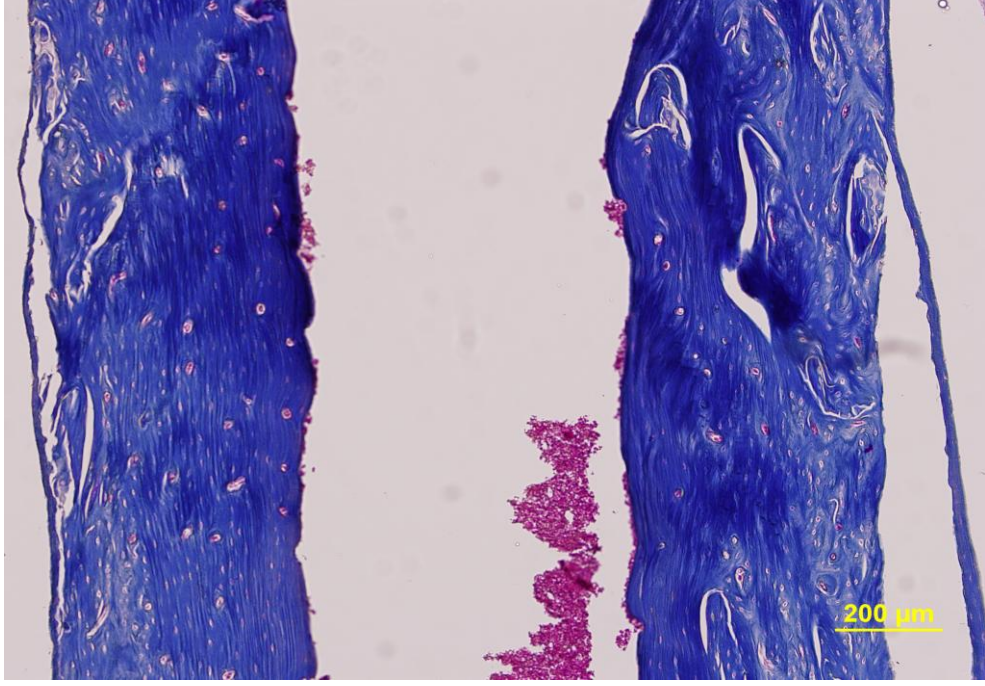
A3 kontrol grubunda non-union oluşturulmuş ve sekiz haftalık takip süresi sonrası sakrifiye edilmişti. Bu gruptaki mikroskopik değerlendirmede 4 ratta az miktarda fibröz doku, 3 ratta ağırlıklı olarak kıkırdak doku ve az miktarda fibröz doku, 1 ratta immatür kemik iyileşmesi görüldü.

Diyabetik olan A4 grubunun mikroskopik değerlendirmesinde 5 ratta az miktarda fibröz doku, 3 ratta ağırlıklı olarak kıkırdak doku ve az miktarda fibröz doku görüldü.

Kök hücre uygulanan B1 gruptaki mikroskopik değerlendirmede 2 ratta ağırlıklı olarak kıkırdak doku ve az miktarda fibröz doku, 2 ratta immatür kemik iyileşmesi ve 4 ratta matür kemik iyileşmesi görüldü.

Kök hücre uygulanan diyabetik B2 gruptaki mikroskopik değerlendirmede 3 ratta ağırlıklı olarak kıkırdak doku ve az miktarda fibröz doku, 5 ratta immatür kemik iyileşmesi görüldü.

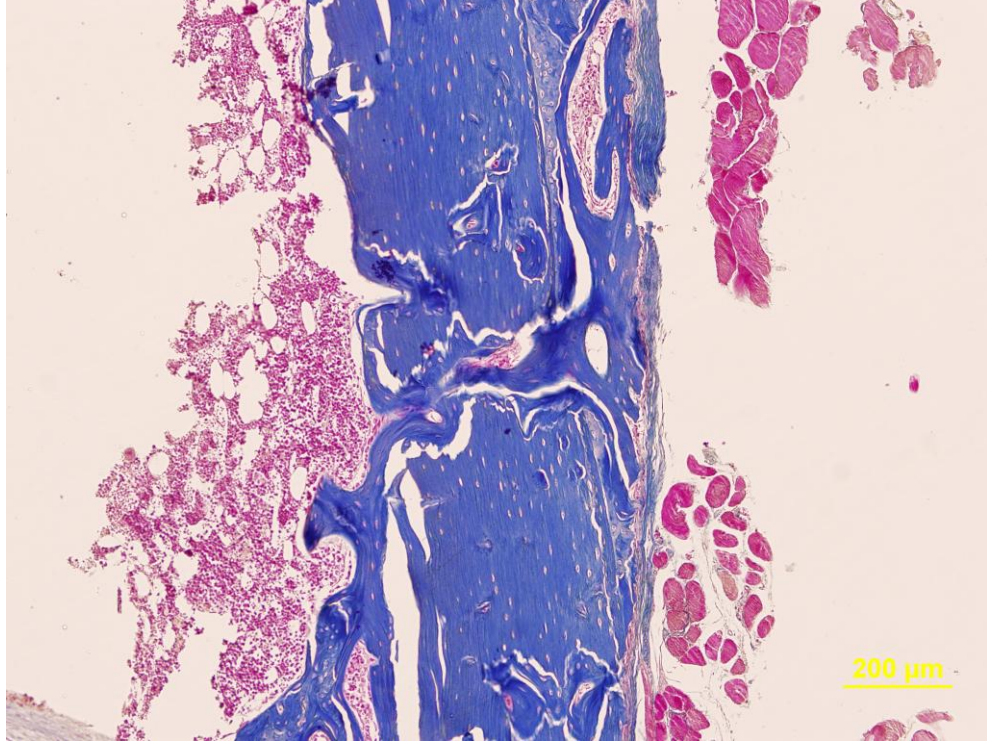
A2 ve A4 grupları arasında, A1 ve A4 grupları arasında, A1 ve A3 grupları arasında, A2 ve A3 grupları arasında, A2 ve B2 grupları arasında, A1 ve B2 grupları arasında, A4 ve B1 grupları arasında, A1 ve A5 grupları arasında, A3 ve B1 grupları arasında histolojik skorlar arasında istatistiksel anlamlı fark saptandı.



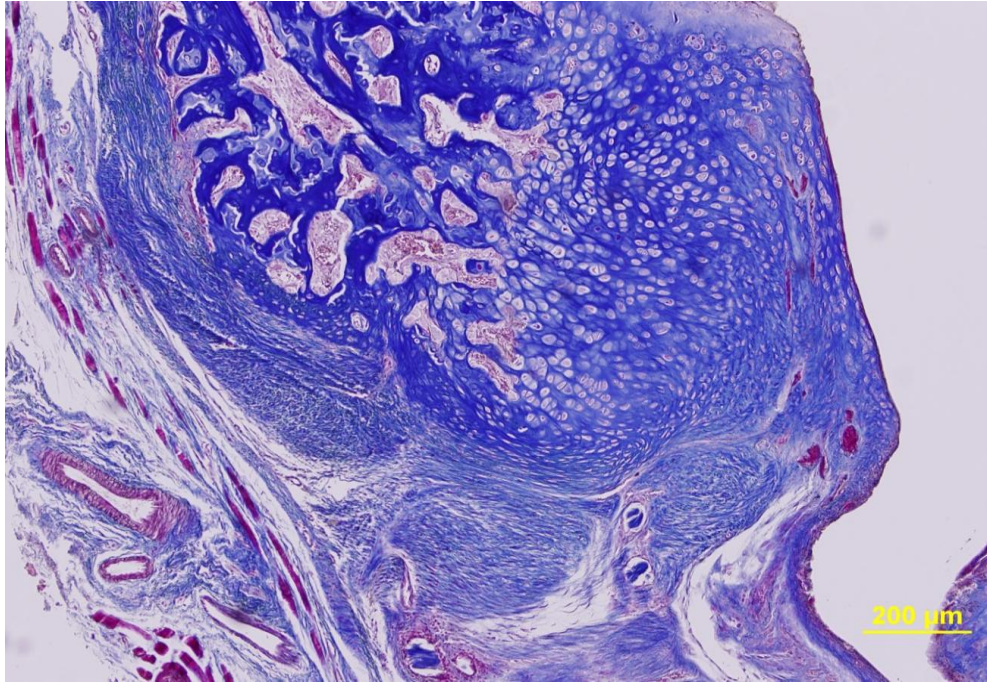
Şekil 29. A1 grubundan alınan preparatta Alcian blue boyamada herhangi bir cerrahi işlem görmeyen femurun diafiz bölgesi matür kemik doku. Alcian blue, X10.



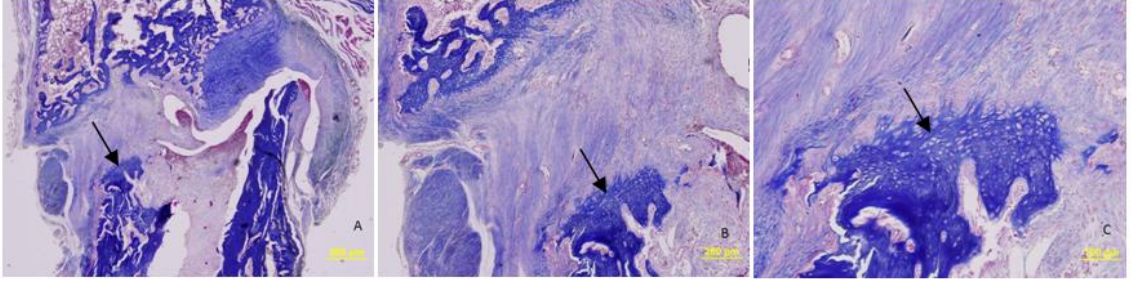
Şekil 30. A1 grubundan alınan preparatta hemotoksilen eozin boyamada femur diafizinin mikroskopik olarak matür kemik doku. Hemotoksilen Eozin, X4



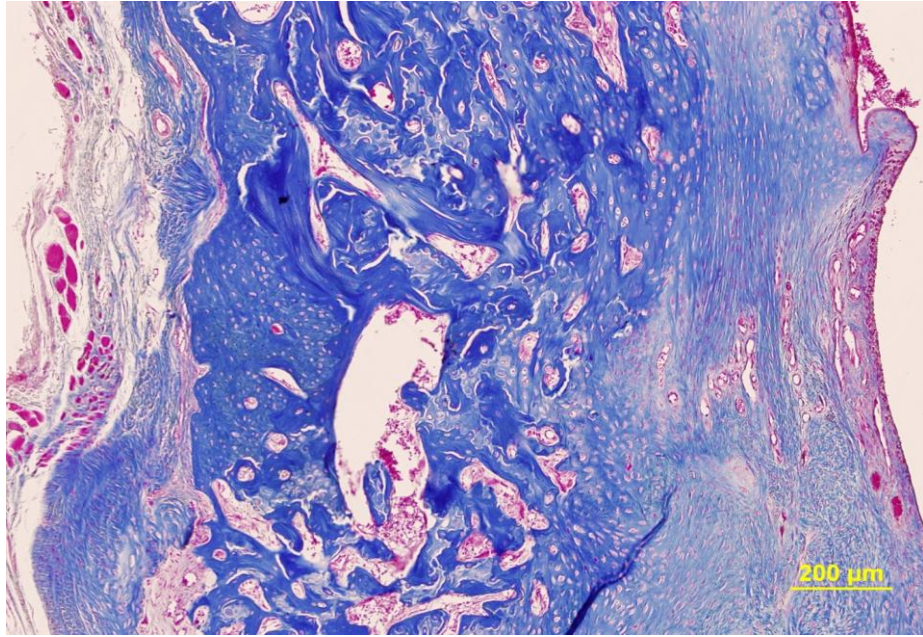
Şekil 31. A2 grubundan alınan preparatta Alcian blue boyamada mikroskopik olarak femur diafiz kırığı sonrası matür, immatür kemik doku ile iyileşme görülmektedir. Alcian blue, X10.



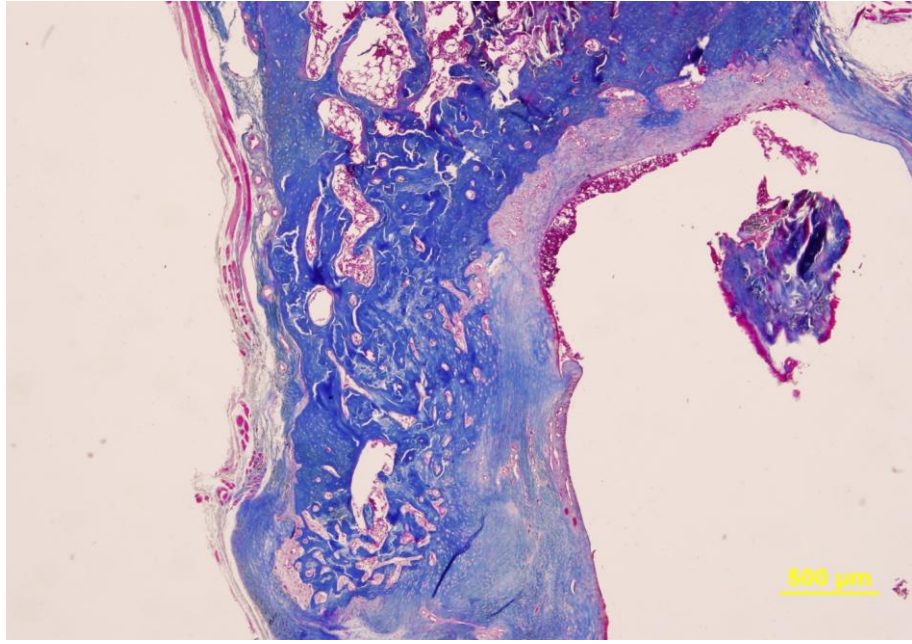
Şekil 32. A3 grubundan alınan femur non-union alanında immatür kemik doku, iyileşme alanındaki kıkırdak dokudaki kondrositler, non-union alanını dolduran fibroz doku görülmektedir. Alcian blue, X10.



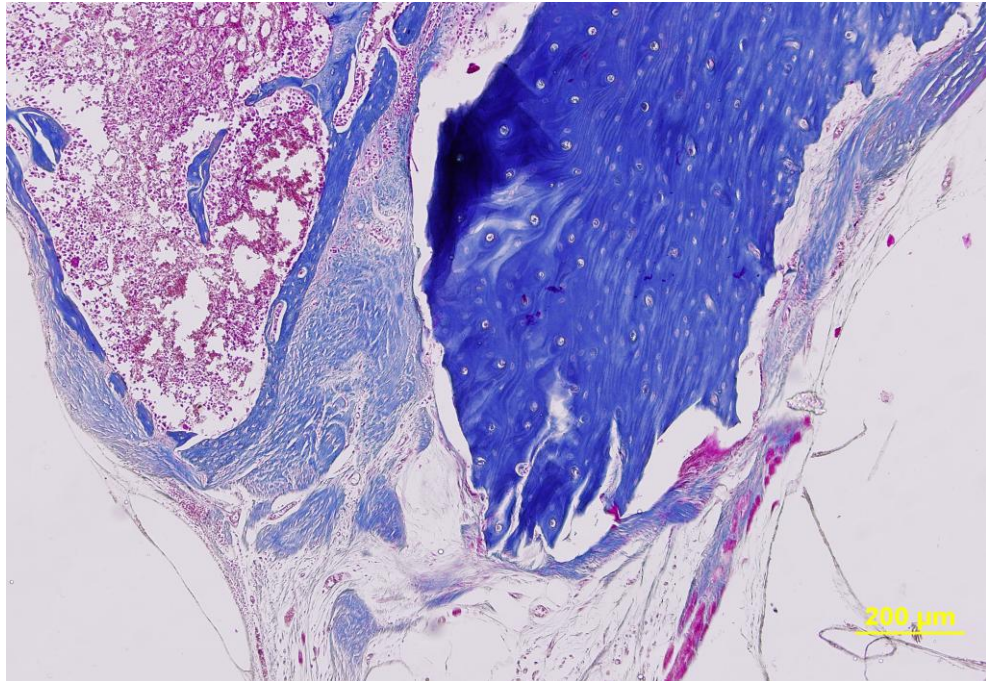
Şekil 33. A4 grubundan alınan preparatta non-union sahasını dolduran mikroskopik olarak fibröz dokunun görünümü, non-union alanındaki az miktarda kıkırdak dokudaki kondrosiler, kıkırdak dokudan immatür kemik dokuya dönüşüm alanları. Alcian blue, X4, X10, X20.



Şekil 34. B1 grubundan alınan preparatta alcian blue ile boyamada immatür kemik doku alanlarında osteositler, kıkırdak alanlarında kondrositler, fibröz doku alanlarında iğsi görünümde fibroblastlar dikkati çekmekte. Bu alanda fibröz doku-kıkırdak doku geçişleri ile kıkırdak doku-kemik doku geçişleri ile iyileşme izlenmektedir. Alcian blue, X10.



Şekil 35. B1 grubundan alınan preparatta alcian blue ile boyamada immatür kemik doku alanlarında osteositler kıkırdak alanlarında kondrositler, fibroz doku alanlarında iğsi görünümde fibroblastlar dikkati çekmekte. Bu alanda fibroz doku-kıkırdak doku geçişleri ile kıkırdak doku-kemik doku geçişleri ile iyileşme izlenmektedir. Alcian blue, X10.

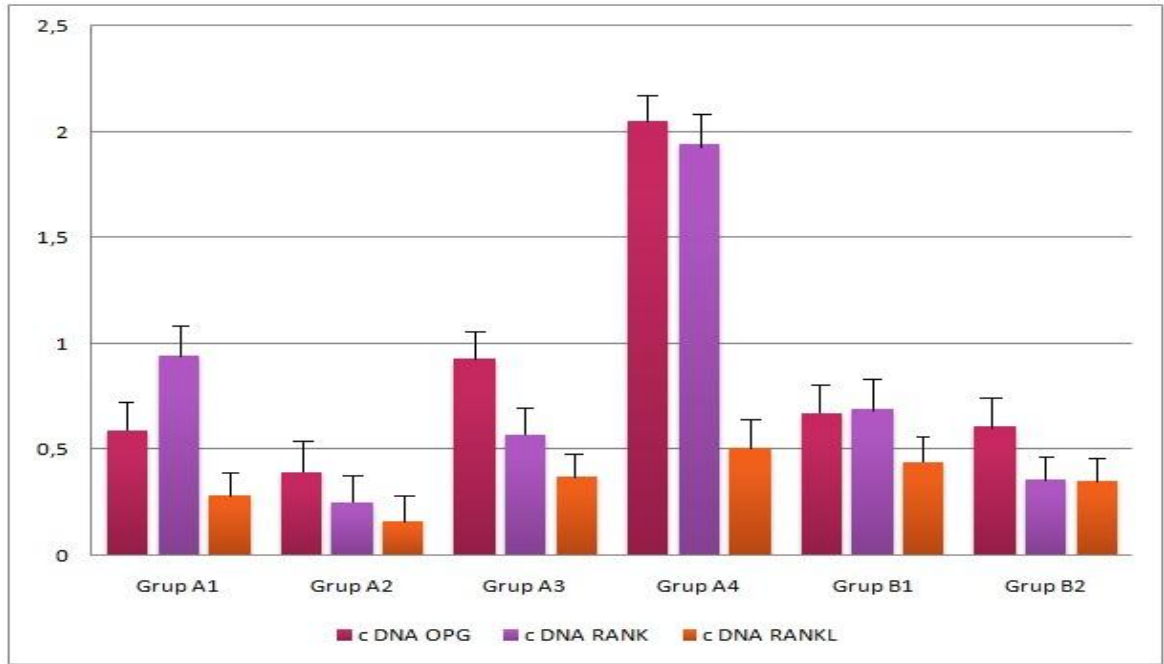


Şekil 36. B2 grubundan alınan preparatta non-union sahasını dolduran mikroskopik olarak fibröz doku ve bağ doku görünümü, non-union alanındaki az miktarda kıkırdak dokudaki kondrosiler ve yoğun olarak fibröz ve bağ doku görülmektedir. Alcian blue, X10.

4.3.GENETİK PARAMETRELERİN KARŞILAŞTIRILMASI

Tablo 14. Gruplar arasında genetik bulguların karşılaştırılması

	A1 GRUP	A2 GRUP	A3 GRUP	A4 GRUP	B1 GRUP	B2 GRUP	P
2 ^{^-2} Formül 1 OPG	0,59 (0,12-7,84) n 6	0,39 (0,03-3,34) n 6	0,93 (0,19-17,51) n 8	2,05 (0,24- 9,65) n 8	0,67 (0,00 -10,48) n 5	0,61 (0,02-13,5) n 7	0,758
2 ^{^-2} Formül 2 RANK	0,94 (0,16-30,4) n 8	0,25 (0,02-9,0) n 8	0,57 (0,05-8,11) n 8	1,94 (0,53-36,0) n 8	0,69 (0,20-56,10) n 9	0,36 (0,12-56,1) n 9	0,334
2 ^{^-2} Formül 3 RANKL	0,28 (0,05-6,96) n 6	0,16 (0,00- 0,47) n 4	0,37 (0-46020,85) n 7	0,51 (0,02-3,07) n 4	0,00 (0,00-0,31) n 3	0,35 (0,07-5,31) n 6	0,444



Şekil 37. OPG, RANK, RANKL genleri için üretilen c DNA miktarları. Gruplar arasında c DNA karşılaştırılmasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı.

PCR için referans değer açısından kontrol grubu olarak kemik dokuda hiçbir işlem yapılmayan A1 grubu alındı. PCR tekniği kullanılarak yapılan gen ekspresyon düzeyi ölçümlerinde, öncelikle bu genlerin kırık iyileşmesi ile ilişkisine bakıldı. Bu amaçla A1 hiçbir işleme maruz kalmayan grup kontrol grubu olarak referans değer kabul edildikten sonra A2 kırık yapıp tesbiti sağlanan sonrasında tam iyileşme görülen grup gen

ekspresyon düzeyleri açısından kıyaslandığında, A2 grupta RANK geni ekspresyon sonucu istatistiksel anlam taşıyordu. RANKL gen ekspresyon sonucu istatistiksel anlam taşıyordu. OPG gen ekspresyon sonucu istatistiksel anlam taşımadığı görüldü.

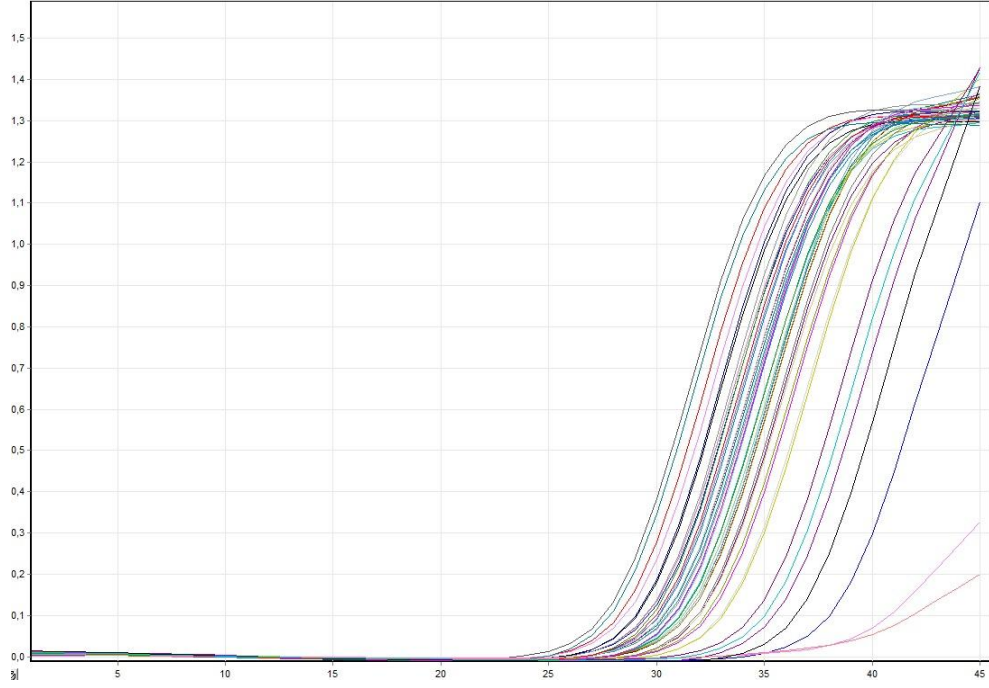
Genlerin non-union olan ilişkisine bakıldığında, bu amaçla A1 hiçbir işleme maruz kalmayan grup kontrol grubu olarak referans değer kabul edildikten sonra pseudoartroz sağlanan A3 grup gen ekspresyon düzeyleri açısından kıyaslandığında, A3 grupta RANK geni ekspresyon sonucu istatistiksel anlam taşıyordu. RANKL gen ekspresyon sonucu istatistiksel anlam taşıyordu. OPG gen ekspresyon sonucunun istatistiksel anlam taşımadığı görüldü.

Genlerin diyabetle olan ilişkisine bakıldığında, bu amaçla her ikisinde de non-union gelişmiş olan diyabetik olmayan A3 ve diyabetik olan A4 grupları gen ekspresyon düzeyleri açısından kıyaslandığında, gen ekspresyon sonucunun istatistiksel anlam taşımadığı görüldü

Kök hücrenin non-union hattında oluşturduğu etkini gen ekspresyon değerleri ile korelasyonuna bakıldığında, bu amaçla pseudoartroz sağlanan ve bundan başka hiçbir işleme tabi tutulmayan A3 grubu kontrol grubu olarak referans değer kabul edildikten sonra pseudoartroz sonrası kök hücre uygulanan ve A3 grubuna göre pseudoartroz iyileşmesi istatistiksel olarak anlamlı olan B1 grubu kök hücrenin gen ekspresyon düzeylerine etkisi açısından kıyaslandığında, ekspresyon düzeyi için sonuç istatistiksel anlamlı bulunmadı.

4.3.1. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Değerlerinin Karşılaştırılması

Parafine gömülü üzerinde çalışılan rat femurlardan mikrotom bıçaklarıyla alınan kesitler üzerindeki genetik çalışmalar sonrası elde edilen RANK gen c DNA miktarlarına bakıldığında;

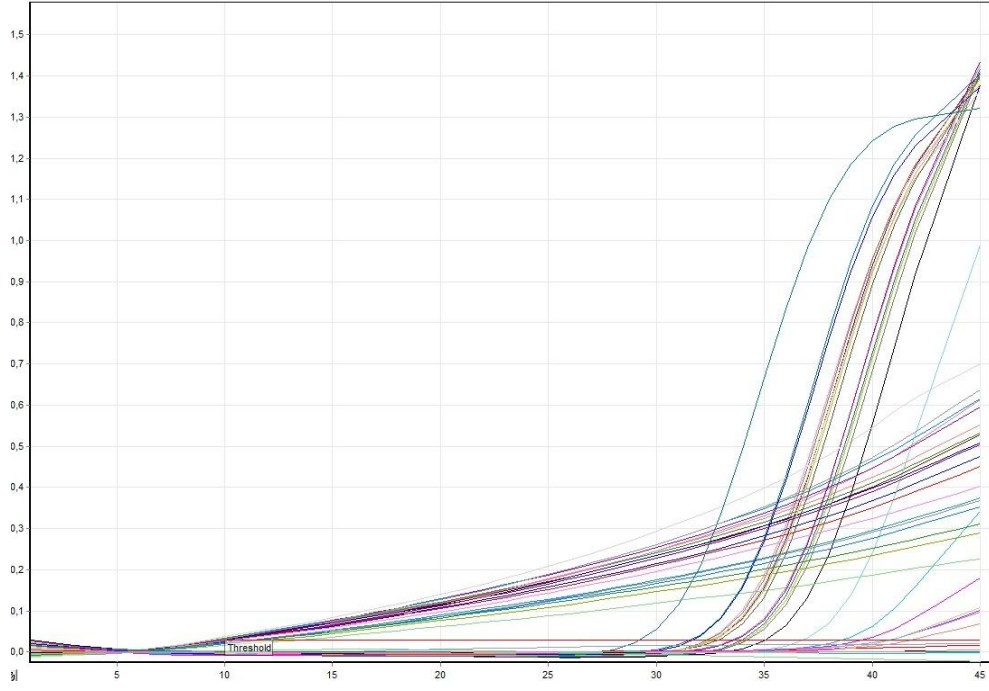


Şekil 38: RANK geni ekspresyon görüntüsü

Elde edilen doku total c DNA RANK değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Grupların kendi içerilerinde anlamlı fark olmadığı görüldü.

4.3.2. Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligand Değerlerinin Karşılaştırılması

Parafine gömülü üzerinde çalışılan rat femurlardan mikrotom bıçaklarıyla alınan kesitler üzerindeki genetik çalışmalar sonrası elde edilen RANKL gen c DNA miktarlarına bakıldığında:

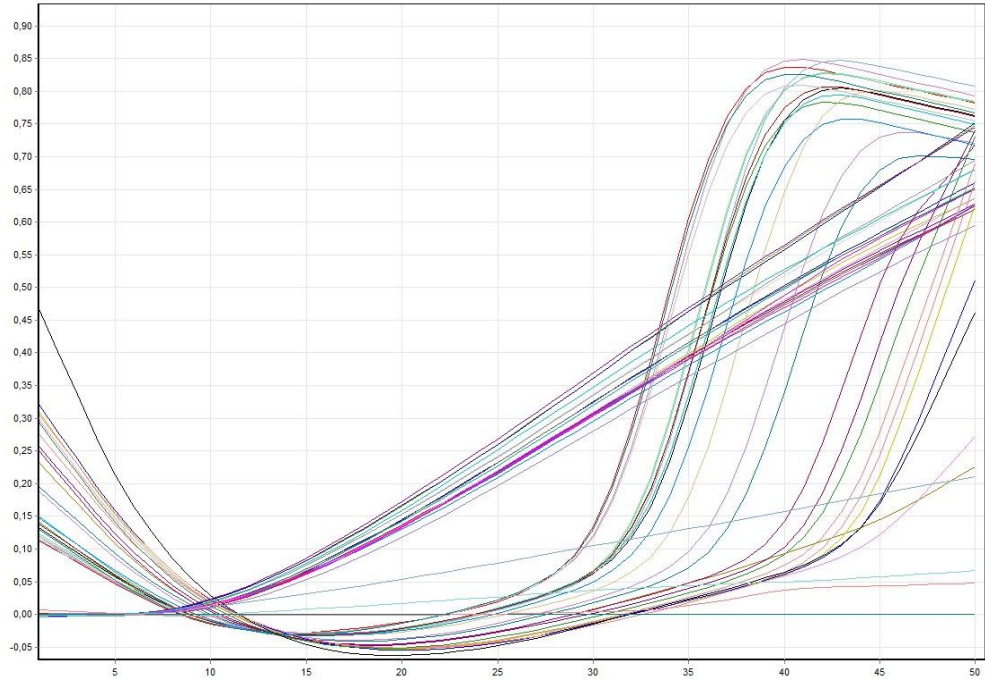


Şekil 39. RANKL geni ekspresyonu görüntüsü

Elde edilen doku total c DNA RANKL değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Grupların kendi içerilerinde anlamlı fark olmadığı görüldü.

4.3.3. Osteoprotegerin Değerlerinin Karşılaştırılması

Parafine gömülü üzerinde çalışılan rat femurlardan mikrotom bıçaklarıyla alınan kesitler üzerindeki genetik çalışmalar sonrası elde edilen OPG gen cDNA miktarlarına bakıldığında:



Şekil 40. OPG geni ekspresyon görüntüsü

Elde edilen doku total c DNA OPG değerleri karşılaştırıldığında, gruplar arasında anlamlı fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Grupların kendi içerilerinde anlamlı fark olmadığı görüldü.

5. TARTIŞMA

Kırık iyileşmesi ve kemiğin yeniden şekillenmesi, birçok hücrenin rol aldığı kimyasal, mekanik ve elektriksel uyaranların karmaşık bir şekilde etkileşimi sonucu meydana gelmektedir (85). Kırık iyileşmesi kırığın oluştuğu andan itibaren hematoma oluşmasıyla başlar, ortama göç eden yeni hücreler ve bunların salgıladıkları yeni kimyasal maddeler aracılığı ile daha karmaşık ve giderek artan hücresel elemanlara, ara maddelere ve hücrelerde farklılaşmalara yol açar. Bu ara maddelerin yeniden işlenmesi ile kırıkta kaynama meydana gelmektedir (86). Kırık iyileşmesinde görev alan başlıca yerel etkenler kırık hematoma, kemik iliği, periost, büyüme faktörleri ve ilgili genlerdir (87).

Ortopedi ve travmatoloji alanında kırık iyileşmesini hızlandıracak tüm ilerlemelere rağmen kırıkların %5-10 kadarında gecikmiş kaynama ya da kaynamama ile sonuçlanmaktadır (88). Yaş, sigara, ilaçlar ve çeşitli sistemik hastalıklar gibi etkenler gecikmiş kaynama ya da kaynamama gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Diabetes mellitus (DM) kemik iyileşmesinde olumsuz etkisi olduğu bilinen sistemik hastalıklardan biridir. Tek başına Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) 21 milyonun üzerinde DM hastası vardır ve bunlara her yıl 500.000 yeni hasta eklenmektedir (88). DM'nin kırık ve artrodez sonrası gecikmiş kaynama ya da kaynamama ile ilişkili olması ileri araştırmalar yapılmasını gerektirmektedir.

Bu amaçla deneysel diyabetik non-union oluşturmak için yayınlardaki uygun hayvan modeli araştırıldı. Bir çok yayına bakıldığında ratların özellikle travma, diyabet ve kök hücre çalışmalarında kullanıldığı görüldü. Ayrıca ratlarda diyabet, kırık oluşturma ve non-union modelinin uygulama araştırmalarında iyi tarif edilmiş olmasından dolayı çalışmada da rat kullanılmasına karar verilmiştir (89).

Deneyisel Diabetes Mellitus modeli oluşturulması cerrahi yöntemle pankreatektomi yapılarak veya farmakolojik ajanlar uygulayarak gerçekleştirilir. Çeşitli çalışmalarda diabette hipergliseminin oluşturduğu bozuklukların ve tedavi yöntemlerinin incelenmesi için farmakolojik ajanlardan Streptozotosin (90) veya Alloksan kullanılmıştır (91). Streptozotosin veya Alloksan antineoplastik ilaçlar olup malign karsinoid ve pankreas Langerhans adacığı kaynaklı tümörlerin tedavisinde kullanılır. Bu ajanlar pankreas Langerhans adacığında insülin salgılayan β hücrelerini geri dönüşümsüz inhibe ederek deney hayvanlarında diabet oluşturmaktadır(90). Alloksan ile oluşturulan diyabette, ketozis insidansı ve mortalite oranı yüksektir ve pankreas rejenerasyonuna bağlı olarak hiperglisemi geri dönebilir. Bu özelliklerinden dolayı, STZ diyabet modeli oluşturmada alloksana tercih edilir (92). Çalışmada uygun modelin Streptozotosin kullanılarak oluşturulan diyabetik rat modeli olduğu sonucuna varıldı.

Non-union tedavisinin başarılı bir şekilde yapılabilmesi için öncelikle non-union modeli oluşturmak gerekir. Bu amaçla birçok araştırmacı deneysel non-union oluşturmak için çalışmalar yapmıştır.

Harrison ve ark. (48)'nin yapılan çalışmasında, mid-diyafizel femoral osteotomi oluşturulduktan sonra mini eksternal fiksator kullanılarak bir grupta 0,5 mm ve diğer grupta 3 mm gap kalacak şekilde femoral tesbit yapılmıştır. Beş hafta sonra yapılan radyolojik değerlendirmede 0,5 mm gap bırakılan grupta kaynama görülürken, 3 mm gap bırakılan grupta non-union olduğu ifade edilmiştir. DEXA ile yapılan değerlendirmede 0,5mm gap bırakılan grupta verilerde artış görülürken, 3 mm gap bırakılan grupta ilk haftalarda artış sonraki haftalarda azalma olduğu görülmüştür. Histopatolojik çalışmada ise 0,5 mm gap bırakılan grupta non-union bulgularının izlendiği rapor edilmiştir. Bu model çalışma için uygun non-union modeli olsada en büyük sorun her canlı için eksternal fiksator temininde yaşanacak bütçe sorunlarından dolayı çalışmada bu model tercih edilmedi.

Oetgen ve ark.(47)'nin 48 fareyle yapılan çalışmasında, 24 farede kapalı standart femur kırığı oluşturulmuş (kontrol grubu) ve geriye kalan 24 fareye de açık osteotomi (çalışma grubu) uygulanmıştır. Çalışma grubunda osteotomi hattının 2 mm distaline ve proksimaline koter uygulayarak periost ortadan kaldırılmıştır. Yapılan histopatolojik değerlendirmede kontrol grubu normal kırık iyileşme bulguları gösterirken, çalışma

grubunda gecikmiş iyileşme veya hiçbir iyileşme bulusunun olmadığı tesbit edilmiştir. Bu model hayvanlarda non-union sağlasa da elektrokoter yardımı ile oluşturulması insanlarda oluşan non-union ile oluşum mekanizması olarak uygun model olmadığını düşünerek çalışmada bu model kullanılmadı.

Garcia ve ark.(40)'nın farelerle yapılan çalışmasında, fare femurunda kırık oluşturulmuş ve kırık hattında gap aralığı 0,8 ve 1,8 mm olacak şekilde intramedüller çivi ve staple çivisi ile tesbit yapılmıştır. Kırık hattı tesbit edildikten sonra 10 hafta beklenmiş ve radyolojik olarak non-union gelişimi değerlendirilmiştir. Radyolojik olarak 0,8 mm ve 1,8 mm gap bırakılan ve periosta zarar verilmeyen grupta non-union gelişimi sırasıyla % 33,3 ve % 50 iken, kırık hattında 1,8 mm gap bırakılan ve periostu çıkarılan grupta non-union gelişiminin % 100 olduğu tesbit edilmiştir. Bu modelin hem maliyetinin azlığı hem de insanda oluşan ve non-union için en sık sebeplerden biri olarak görülen distraksiyon, kemik kaybı ve periost yaralanması mekanizmalarına uygun olacağını düşünerek çalışmada bu model uygulandı.

Femur ve tibia gibi alt ekstremitte kırıkları sonrası gelişen non-unionlar için sık sebepler diyabet, enfeksiyon, açık kırıklar, ateşli silah yaralanmasına bağlı kırıklar, defektli parçalı kırıklar,periost yaralanmaları ve tesbit yetmezliğidir. Hayvan çalışmalarında koterize edilerek yapılan non-union modelleri insanlardaki non-union modelleriyle oluşma mekanizması açısından çok farklıdır. Bu sebeplerden dolayı çalışmada önceden diyabet yapılan ve yapılmayan ratlarda Garcia ve ark.(40)'nın tariflediği kemik gap oluşturularak yapılan non-union modeli kullanıldı. Ratların sol femurlarına osteotomi uygulandıktan sonra proksimalden ve distalden periost sıyrıldı. Kırık hattı 1,8 mm gap kalacak şekilde tespit edilerek 10 hafta beklendi. Radyolojik olarak kontrol edilerek non-union oluşumu doğrulandı.

Amaca uygun modeli oluşturulduktan sonra non-union tedavisi ve oluşma mekanizması üzerine yoğunlaşıldı. Non-union mekanizmasını iyi anlamak için kırık iyileşmesinin etkileyen faktörlerin iyi anlaşılması gerekir. Kırık iyileşmesini yönlendiren pek çok faktör saptanmıştır. Özellikle kemik kaynamasını hızlandıran yeni tedaviler ve kırık iyileşmesini geciktiren sebepleri saptanmaya yönelik çalışmalar artmıştır. Çalışmada bu amaca yönelik hızla yaygınlaşan ve sık non-union sebebi olan diyabet, önemi gün geçtikçe artan kök hücre tedavisi ve kemik metabolizmasında görev

alan RANK, RANKL, OPG gibi genler arası ilişkiler ve bunların non-union iyileşmesindeki rolleri üzerine yoğunlaşıldı.

Otolog kemik greftleri non-union, artrodez, spinal füzyon, düzeltici osteotomiler, kemik defekti içeren kırıkların tedavileri için halen ilk seçenek olarak kullanılmaktadır. Otolog kemik greftleri kemik yapımını sağlayan hücreleri içermesi bakımından osteojenez, kemik yapımını uyuracak matriks yapısı nedeni ile osteokondüktif, içerdği kemik yapımını uyarıcı protein ve sitokinler yardımıyla osteoindüktif olması nedeni ile diğer kemik grefti benzeri maddelerden daha üstündür. Ancak hastadan temin edilecek kemik greft miktarının sınırlı olması, greft alınan bölge için ek cerrahi işlem uygulanması ve alınan bölgede hasara yol açması gibi problemler dezavantajları oluşturur. Bazı durumlarda ise taze donmuş türdeş kemik greftlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Taze donmuş türdeş kemik greftlerinden ise virüs kaynaklı hastalık geçme riski ve kemiğin yapısındaki antijenik uyaranların fazla olması nedeni ile alıcıda immünolojik reaksiyonlara neden olabilmektedir.

Kırık iyileşmesinin gerçekleşmediği veya kaynama yönünden problem olabilecek durumlar için otolog kemik greftleri altın standart olarak kabul edilmesine rağmen greftlerin alındığı vücut bölgesinde hasara yol açması ve alınan miktarın sınırlı olması gibi olumsuz yönlerinden dolayı değişik zamanlarda yapılan çalışmalarda, araştırmacılar kırık iyileşmesini hızlandırmak, kaynama gecikmesini ve kaynamama durumlarını ortadan kaldırmak için alternatif çeşitli çalışmalar ortaya koymuşlardır. Bunlardan biri de kök hücrenin kemik doku üzerinde kullanılmasıdır (93).

Kök hücre tedavisinin osteoblastik aktiviteye ve kemik formasyonuna katkısını gösteren çok sayıda yayın vardır (94).

Taguchi ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada kemik iliği hücrelerinin invivo migrasyonu ve kemik tamirine olan katkısını değerlendirilmiştir (10). Bu çalışmada GFP-şimerik farelerin femurlarında oluşturulan kırıklardan sonra kuyruk veninden kemik iliği hücreleri verilerek incelenmiştir. Kırık bölgesindeki kallus dokusu içinde ve kemiğin çeperindeki hücrelerin hepsinin GFP pozitif olduğu yani osteoblastlara dönüştüğü ve MKH'lerin kemik iyileşmesiyle kesin olarak ilgili olduğu gösterilmiştir (10,11).

Ural ve ark.'nın GATA'da yaptıkları çalışmada da tavşanların her iki tibialarında defekt oluşturularak eksternal fiksator uygulanmıştır (62). Tibialardan birinde defekt

bölgesine MKH lokal olarak verilmiş diğer tibia kontrol grubu olarak kullanılmış ve hiçbir şey verilmemiştir. Uygulamanın 15. günü ve bir ay sonra radyolojik olarak ve birinci ay sonunda histokimyasal olarak MKH uygulanan tarafta daha hızlı iyileşme sağlandığı ve eksternal fiksatörün tutulma süresinin kısaldığı gösterilmiştir (62). Çalışmada kırık iyileşmesine kök hücrenin katkısı gösterilse de non-union üzerine olan etkisi hakkında bilgi verilmemiş olması bu çalışmayı non-union mekanizmasına yönelik çalışmalara yönlendirmiştir.

Başka bir çalışmada Ozan ve ark.'ı (95) sıçan femurlarına osteotomi uygulayıp periostu geniş olarak çıkartmışlar 1.3 mm' lik branül iğnesi ile osteotomi tesbiti yapılmış. Osteotomi hattı kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin etkisini ortadan kaldırmak için % 10' luk formalin ile yıkanmış. Ameliyat sonrası ikinci gün 0,1 ml' de 1 milyon kök hücre kırık hattı ve çevresine perkütan enjekte edilmiş. Çalışmanın 60. Günü tüm sıçanlar sakrifiye edilmiş. Çalışma sonunda kök hücre uygulanan grupta kırık iyileşmesinin artışı yönünde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı sonuç elde edilememiştir. Sebep olarak kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin etkisini ortadan kaldırmak için kullanmış oldukları formaldehitin tedavi için verilen kök hücrelere de toksik etki gösterdiği ve kırık hematomunun doğal yapısını bozduğu , kaynamayı olumsuz etkilediği sonucuna varmışlardır. Bu çalışmada da bu hipotez doğrultusunda formaldehid kullanılmaması tercih edildi.

Ferreira ve ark.'nın (96) yaptıkları çalışmada ise ratlarda pseudoartroz yapılmış bu alana diğer rattan alınan heterolog mezenkimal kök hücre kemik iliğinden alındığı gibi yapılanla kültüre edilip çoğaltılarak yapılan kök hücreler karşılaştırılmış. Sonuçlar karşılaştırıldığında kültüre edilmeden yapılan heterolog kök hücre tedavisi daha üstün olduğu gösterilmiş. Diğer taraftan kültüre edilerek uygulanan kök hücre tedavisinin ise tedavi uygulanmayan kontrol grubuna göre üstünlüğü çalışmada gösterilmiş.

Ahn ve ark.'ı ise tavşanlarda proksimal tibiada fizis defekti oluşturmuşlar ve defekt bölgelerine TGF β 3 ile kültüre edilmiş MKH implante etmişlerdir(97). Altı hafta sonra kontrol gruplarında 28-30°angulasyon gözlenirken MKH verilen tavşanlarda önemli bir angulasyon oluşmadığı gözlenmiştir. Fizis yaralanmalarının tedavisinde MKH uygulamaları yapılacak yeni çalışmalar ışığında alternatif bir tedavi olarak görünmektedir.

Kırık kemik onarımı ve rejenerasyonu yanında sistemik kemik hastalıklarında kök hücre kullanımı ile ilgili çalışmalardan da ümit verici sonuçlar alınmaktadır.

Pereira ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada osteogenezis imperfektalı farelere sağlıklı farelerden alınan kemik iliği kök hücreleri infüze edilmiştir (98). Bu hücrelerin kemikte kollajen-1 üretimi ile kısmen iyileşme sağladıkları gösterilmiştir.

Horwitz ve ark.'ı da benzer bir çalışmayı osteogenezis imperfektalı çocuklarda yapmışlardır. Bu çocuklara MKH verilmesini müteakip osteoblastik farklılaşma ve kemik mineral dansitesinde artma olduğunu göstermişlerdir(99,100).

Çalışmada kullanılmak istenilen RANK, RANKL, OPG genlerinin kemik dokudaki işlevlerine genel olarak bakıldığı zaman, OPG, RANK ile yarışa girerek RANK-RANKL bağlanmasına engel olur. Böylece osteoklastogenezis ve osteoklast aktivasyonunu inhibe eder ve osteoklast apoptozunu artırır. Osteoklast aracılı kemik rezorpsiyonu, RANK-RANKL ve OPG-RANKL bağlanmaları arasındaki dengeye bağlıdır. Bu mekanizma üzerine yapılmış bir çok çalışma bulunmaktadır.Xu ve ark. (101) RA'lı hastalarda sağlıklı kontrollere göre osteoporoz prevalansında artış, RANKL seviyesinde yükselme, OPG seviyesinde ise azalma olduğunu göstermiştir. Kemik kaybında görülen artışın yanı sıra kemik yapımında görülen azalmanın da enflamatuvar romatizmal hastalıklarda görülen osteoporozun patogenezinde etkili olduğu bilinmektedir.

Pazalluoli A. ve ark. (102), akut koroner sendromlu hastalarda serum OPG seviyeleri ile koroner plaklar varlığı ilişkisini incelemişler ve OPG seviyelerinin koroner damarlardaki plak sayılarıyla orantılı olarak değiştiğini bildirmişlerdir. Kırık iyileşmesinin önemli basaklarından birisinin de kanlanma olduğunu düşünülürse, bu çalışma kırıktaki kanlanma açısından sonraki çalışmalara bir kapı açacak ve kırıkla kırığın beslenmesini sağlayan damar yapısı arasında bir bağlantı kuracağı düşünülmektedir.

RANK, RANKL, OPG genlerin hastalıklarla olan ilişkisi, tanı ve tedavi amaçlı kullanılıp kullanılmaması birçok araştırmacının dikkatini çekmiş bu genler üzerine yoğunlaşılmasını sağlamıştır.Bifosfonatlar gibi kemik rezorpsiyonu ve vasküler kalsifikasyonu inhibe ettiği bilinen ilaçlara benzer etki gösteren OPG (103) ile RANK ve RANKL multiple myelom ve diğer tümörlerin kemik metastazları veya postmenapozal osteoporoz gibi artmış kemik rezorpsiyonu durumlarında terapötik

kullanıma sahip olabilirler. Postmenapozal veya yaşla ilişkili osteoporozun patojenezinde OPG, RANK ve RANKL'in rolü hakkındaki bilgiler çelişkilidir. Östrojen, osteoblast ve kemik iliği stromal hücrelerinde OPG üretimini artırır (104). Fakat, kemik iliği stromal hücrelerinde OPG üretimi yaşla azalmasına (105) rağmen erkek ve kadınlarda serum OPG seviyelerinin yaşla arttığı gösterilmiştir (106).

Kemik metastazı olan osteosarkom, meme, kolon, prostat kanserli ve overektomi yapılmış hastalara verilen rekombinant OPG'nin osteoporozu azalttığı gösterilmiştir (107). OPG'nin sarkomaya bağlı kemik yıkımını ve ağrıyı da azalttığı belirtilmiştir (108). RANK-Fc füzyon proteininin kobaylarda oluşturulan malignensinin humoral hiperkalsemi modelinde kemik yıkımı ve hiperkalsemiyi inhibe ettiği gösterilmiştir (109).

RANKL uyarımını inhibe etmek için OPG ve çözünür RANK veya RANKL'a karşı monoklonal antikor kullanımı gündeme gelmiştir. RANKL'a karşı oluşturulan monoklonal antikorların hem sağlıklı kişilerde (110) hem de kemik metastazı olan meme kanserli hastalarda (111) kemik rezorpsiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Yukarıda belirttiğimiz gibi postmenapozal osteoporoz, kemik metastazları ve maligniteye bağlı hiperkalsemiye ilave olarak glukokortikoid kullanımı, Paget hastalığı ve romatoid artrit gibi OPG, RANK ve RANKL sisteminin dengesinin bozulduğu hastalıkların tedavisinde OPG, RANK, RANKL ve RANKL'a karşı monoklonal antikor kullanımı gelecekte uygulanabilir görünmektedir.

Bu bilgiler ışığında çalışmada diyabetik ratlar üzerinde oluşturulan non-union modelinde kök hücre tedavisinin etkinliği ve RANK, RANKL ve OPG gibi kırık iyileşmesinde rolü olduğunu düşünülen genlerin bu safhada ne gibi etkilerinin olduğunu saptanmaya çalışılmıştır.

Direk grafi, uygulanması ve değerlendirilmesi kolay olan non-invaziv, basit bir yöntemdir. Kemiğin kaynaması veya kırık iyileşmesinin değerlendirilmesinde belirli bir standart oluşturmak için radyolojik veriler otörler tarafından birçok skrolama sistemleri geliştirerek değerlendirmişler. Bunlardan biri de Lane-Sandhu skrolama (83) sistemidir.

Bu çalışmada da birçok otör (112) tarafından kabul gören ve kullanılan Lane-Sandhu radyolojik skrolama sistemi kullanıldı. Radyoloji sonuçları değerlendirildiğinde anlamlı sonuç A4-B1, A4-A2, A4-A1, A3-B1, A3-A2, A3-A1, A2-B2, A1-B2, A1-B1

grupları arasında gözlemlendi. Bu sonuçlar bize kemik defektli ve periost hasarlı kırıkların non-union oluşumunda yegane faktör olduğunu gösterdi. Öte yandan A3-B1 grupları arasında anlamlı fark olması kök hücre tedavisinin non-union oluşmuş olan kırık tedavisinde etkisinin olduğunu gösterdi. A4-B2 grupları arasında anlamlı fark saptanmadı. Bu durumun sebeplerini düşündüğümüzde kök hücre sayısının yetersizliği, her iki gruptaki diyabetten dolayı yeterli kök hücrenin canlı kalmaması, kök hücrelerin bulunduğu ortamdan göç etmesi veya yeterli osteokondüktif doku olmaması gibi nedenleri düşünülmektedir. Ayrıca A3-A4 ve B1-B2 grupları arasında anlamlı sonuç olmaması non-union sahasında diabetin sekiz haftalık takip süresi içinde fark oluşturmadığını göstermiş oldu. Daha önceki çalışmalar ışığında diabetin kırık iyileşmesine olan negatif etkilerini bu çalışmada görülmemesi ise takip süresinin kısa oluşu ve yeterli osteokondüktif dokunun bulunmaması gibi faktörlere bağlı olabileceği düşünüldü.

Çok sayıda araştırmacı birçok çalışmada sağlam delillere dayanan histopatolojiyi tek başına kullanmıştır. Histopatolojiyi, biyokimya ve/veya radyoloji ile destekleyerek aralarındaki istatistiksel uyuma bakan çok sayıda araştırmacı da mevcuttur.

Horwitz ve ark. (99,100) osteogenezis imperfekta çocuklarda MKH verilmesini müteakip osteoblastik farklılaşma ve kemik mineral dansitesinde artma olduğunu göstermişlerdir. Murphy ve ark. (113) kondral defekt oluşturdukları keçilerin dizlerine MKH enjekte ederek yaptıkları değerlendirmelerinde, MKH'lerin kondral bozulmada ilerlemeyi durduğunu bildirmişlerdir. Taguchi ve ark. (10,11) yapmış oldukları çalışmada kemik iliği hücrelerinin invivo migrasyonu ve kemik tamirine olan katkısını değerlendirmiştir. Bu çalışmada GFP-şimerik farelerin femurlarında oluşturulan kırıklardan sonra kuyruk veninden kemik iliği hücreleri verilerek incelenmiştir. Kırık bölgesindeki kallus dokusu içinde kemiğin çeperlerindeki hücrelerin hepsini GFP pozitif olduğu yani osteoblastlara dönüştüğü ve MKH'lerin kemik iyileşmesiyle kesin olarak ilgili olduğu gösterilmiştir. Ural ve ark.(62)'nin GATA' da yaptıkları çalışmada da tavşanların her iki tibialarında defekt oluşturarak eksternal fiksator uygulamışlardır. Tibialardan birinde defekt bölgesine MKH lokal olarak verilmiş diğer tibia kontrol grubu olarak kullanılmış ve hiçbirşey verilmemiştir. Uygulamanın 15. günü ve bir ay sonra radyolojik olarak ve bir a sonra radyolojik olarak ve birinci ay sonunda histokimyasal olarak MKH uygulanan tarafta daha hızlı iyileşme sağlandığı ve eksternal fiksatorün tutulma süresinin kısaldığı gösterilmiştir.

Hayvan modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabilmesi çok önemlidir. İnsanlarda kırık iyileşmesinin erken dönemleri incelendiğinde, diyafiz kırıklarında görülen onarı hızı ile deneysel kırığın onarım hızı benzerlikler göstermektedir. Bu nedenle deneysel kırık modelinden elde edilen sonuçların insanlara uyarlanabileceği düşünülmektedir (112).

Bu çalışma da Huo ve ark. (84) 'nın oluşturduğu histopatolojik derecelendirme sistemi tercih edildi. Kontrol gruplarında ışık mikroskopuyla daha çok fibröz doku az miktarda kartilaj görülürken, kök hücre gruplarında immatür ve matür kemik dokular fazla miktarda görüldü. Böylece subjektif olan radyolojik çalışma daha objektif olan histopatolojik çalışmayla desteklendi. Radyoloji ve histolojinin birbirine uyumlu olduğu ve her 2 kriterde de, kontrol ve bazı çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptandı.

Yapılan literatür araştırmasında ratlarda, farelerde ve tavşanlarda çok sayıda non-union modeli tarif edilmiş ve yine çok sayıda kırık iyileşmesinde kök hücre kullanımı ve etkilerinin incelendiği görülmüştü. Bu çalışmada olduğu gibi diyabetik non-union modelinde kök hücre uygulanması şeklinde başka bir çalışmayla karşılaşılmadı.

Kök hücre kullanılarak yapılan bu çalışmada kök hücre tedavisinin diyabetli olmayan deneklerdeki non-union tedavisinde olumlu etki oluşturduğu radyolojik, histopatolojik sonuçlar açısından istatistiksel olarak anlamlı olduğu izlendi. Çalışmada ayrıca non-union gelişiminde ve kök hücre uygulanmasında RANK, RANKL ve OPG gen ekspresyon aktivitesinin değiştiği gösterildi ama değerlerin istatistiksel anlam taşımadığı görüldü. Bu genlerin non-union oluşumu mekanizmasında rol alabileceği ve erken tanı için bir marker olabileceği düşünüldü.

İstatistik açısından anlamlı çıkan radyoloji ve histolojiye dikkati çekersek. Kontrol grupları olan A3 ve A4 grupları ile çalışma grupları olan B1 ve B2 grupları kıyaslandıklarında, grupların normallik analizleri yapıldı radyoloji skorları açısından kıyaslanan A3-B1 ile A4-B2 nin normal dağılmadığı izlendi. Histoloji skorları açısından kıyaslanan A3-B1 de normal dağılım izlenirken A4-B2 de normal dağılım izlenmedi. Bu bilgiler ışığında A3-B1 ile A4-B2 nin radyolojik kıyaslaması ve A4-B2 nin histolojik kıyaslamasında Mann-Whitney Test kullanıldı ve $p<0,05$ anlamlı sonuca ulaşıldı. A3-B1 gruplarının histolojik skorlarının normal dağıldığı izlendi. Hem Mann-Whitney Test hemde T-Test de $p<0,05$ olarak izlendi ve anlamlı sonuca ulaşıldı. Bu

sonuçlar adipoz doku kaynaklı kök hücrenin tedavi edici etkinliğini gösterdi. A4-B2 gruplarının histoloji skorlarının Mann-Whitney Testine göre $p>0,05$ olduğu saptanarak anlamlı sonuca ulaşılmadığı görüldü. Burada farklılığın diğerbir değişken olan diyabetten kaynaklandığı sonucuna varıldı.

6. SONUÇLAR

Deneysel diyabetik rat femur non-union modelinde kök hücrenin kaynama üzerine etkisi histopatoloji, radyoloji ve RANK, RANKL, OPG genleri kullanılarak incelendi ve aşağıdaki sonuçlar elde edildi.

Diyabetik rat modeli oluşturmak için STZ uygulandı ve diyabet amaçlanan deneklerin tamamında kan şekeri yüksekliği ve idrar glikozu saptanarak amaçlanan deneklerin tümünde DM oluşturuldu.

Non-union amaçlanan deneklerin tamamında non-union oluşturuldu.

Non-union modeli oluşturulan diyabetsiz deneklerdeki non-union alanına kök hücre tedavisinin radyolojik ve histopatolojik incelemeler sonucunda etkilerinin olumlu olduğu sonucuna varıldı ve bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olduğu gösterildi.

Non-union modeli oluşturulan diyabetli deneklerdeki non-union alanına kök hücre tedavisinde ise radyolojik ve histopatolojik incelemeler sonucunda olumlu etkiler elde edildi. Ancak elde edilen radyolojik sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, histopatolojik olarak istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamadı.

Non-union oluşturulan deneklerde, non-union modeli ile RANK, RANKL, OPG gen ekspresyon düzeyi PCR tekniği kullanılarak saptanan cDNA değişim değerleri gösterildi. Buna göre diyabetli non-union grubunda en yüksek değerler elde edildi. Ancak gruplar arasında değerlerin istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği tespit edildi.

Kök hücre tedavisinin, diyabetli deneklerdeki non-union sahasına etkisinin diyabetli olmayan deneklerdeki non-union sahasına olan etkisine göre sınırlı ve yetersiz kaldığı görüldü. Ayrıca histopatolojik incelemelere göre de skorlarının istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği bulundu. Diyabetli deneklerdeki non-union sahasına verilen kök hücrenin tedavi edici olan etkisine diyabetin olumsuz bir faktör olabileceği sonucuna varıldı.

Kök hücre tedavisinin non-union sahasındaki kemik metabolizmasında görev alan RANK, RANKL ve OPG gen ekspresyon düzeylerini değiştirip değiştirmediği PCR

tekniki kullanılarak gösterildi ve cDNA değişim değerleri saptandı. Buna göre kök hücre tedavisinin cDNA değişim değerleri üzerine etkisi olmadığı görüldü ve bunun da istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermediği bulundu.

Sonuç olarak; pseudoartroz tedavisinde günümüzde farklı tedavi seçenekleri olmakla beraber, özellikle diyabeti olmayan olgularda, kök hücre tedavisinin ilerleyen dönemlerde destekleyici çalışmaların artmasıyla da beraber pseudoartroz tedavisinde bir seçenek olarak kullanılabileceği sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

1. Trentz OA, Handschin AE, Bestmann L, Hoerstrup SP, Trentz OL, Platz A. Influence of brain injury on early posttraumatic bone metabolism. *Neurologic Critical Care Medicine* 2005;33:399-406
2. Einhorn TA. Current concepts review: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg* 1995;77:940-56
3. Grundnes O, Reikeras O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 1993;64:340-2
4. Ozaki A, Tsunoda M, Kinoshita S, Saura R. Role of fracture hematoma and periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 2000;5:64-70
5. rhBMP-2 Enhances the Bone Healing Response in a Diabetic Rat Segmental Defect Model Vikrant Azad, Eric Breitbart, Loay Al-Zube, Sloane Yeh, J. Patrick O'Connor, Sheldon S. Lin. *J Orthop Trauma* Volume 23, Number 4, April 2009
6. Manoel Luiz Ferreira, Paulo Cesar Silva, Lucas Henrique Alvarez Silva, Danielle Cabral Bonfim, Lucas Cristo Conilho Macedo Müller, Christiano Costa Esposito and Alberto Schanaider. Heterologous mesenchymal stem cells successfully treat femoral pseudarthrosis in rats. *Journal of Translational Medicine* 2012, 10:51
7. Durdu S, Akar AR, Arat M, Sancak T, Eren NT, Ozyurda U.: Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation for patients with Rutherford grade 2-3 thromboangiitis obliterans. *J Vasc Surg*. 2006, 44(4): 732-9. Epub 2006 Aug 22
8. Otto W.R., J. Rao: Tomorrow's skeleton staff: Mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif*. 2004, 37:97-110.
9. Javazon E. H., K. J. Beggs, A. W. Flake: Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp. Hematol*. 2004, 32:414-425.
10. Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H: The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 , 27;331(1):31-6.

11. Denise Shirley A, David Marsh A, Grant Jordan A, Stephen Mcquaid B, Gang Li: Systemic Recruitment Of Osteoblastic Cells İn Fracture Healing Journal Of Orthopaedic Research 2005, 23:1013-1021
12. Imbalance of RANK, RANKL and OPG expression during tibial fracture repair in diabetic rats. Fernanda Penna Lima Guedes de Amorim, So´crates Souza Ornelas, Sandoval Felici´simo Diniz, Aline Carvalho Batista, Tarcı´lia Aparecida da Silva. J Mol Hist (2008) 39:401–408.
13. 17. RANKL, RANK, osteoprotegrin: key patners of osteoimmunology and vasculer diseases. M.Baud’huin, F.Lamoueux, L. Duplomb, F. Redini and D. Heymann. Cell. Mol. Life Sci.64(2007) 2334-2350
14. Carpenter CJ, Plum F, Bennett JC, Thomas E. Kemik hastalıkları ve kemik mineral metabolizması ünitesi. (Çeviri: S. Mısırlıoğlu). Cecil Essentials of medicine: İstanbul: Yüce Kitabevi; 1995. s.530-5
15. Netter FH. Kemiğin oluşumu ve yapısı. A Tansu, Kayalar Ak G (Editörler). The netter collection of medical illustrations. Ankara: Güneş Tıp Yayınevi; 2009. s.169-74.
16. Abdallah BM, Stilgren LS, Nissen N, et al. 2005. Increased RANKL/OPG Mrna ratio in iliac bone biopsies from women with hip fratures. Calcif Tissue Int 76:90-97.
17. Pollak D, Floman Y, Simkin A, Avinezer A, Freund HR. The effect of protein malnutrition and nutritional support on the mechanical properties of fracture healing in the injured rat. J Parenter Enteral Nutr 1986;10:564-7.
18. Khan SN. Bone growth factors. Alciu Othop Clin North Am 2000;31:375-88.
19. Yılmaz C, Erdemli E, Selek H, Ankan M. The Contribution of vitamin C to healing of experimental fractures. Arch Trauma Surg 2001;121:426-8.
20. Halıcı M, Öner M, Güney A, Canöz Ö, Narin F, Halıcı C Melatonin promotes fracture healing in the rat model. Eklem Hastalık Cerrahisi 2010 Dec;21(3):172-7.
21. Reeve J, Meunier PJ, Parsons JA, Bernat M, Bijvoet OL, Courpron P et al. Anabolic effect of human parathyroid hormone fragment on trabecular bone in involutional osteoporosis: amulticentre trial. Br Med J 1980;280:1340-4.
22. Charbon A, Elisabeth E. Extra-osseous actions parathyroid hormone and calcitonin clinical orthopaedics and related research. Clin Orthop Relat Res 1971;78:140-50.
23. Edward G, Heinz W, William M, Stephen F, Mark A, Ann W et al. Treatment of postmenopausal osteoporosis with transdermal estrogen. Ann Intern Med 1992;11:117.
24. The Netter collection of medical illustrations. Available at www.netterimages.com. Acessed Nov 1999.
25. Bartl R, Frisch B. Yaşam boyu sağlıklı kemikler için koruyucu önlemler. Akıncı Tan A (Editör). Osteoporoz teşhis, korunma, tedavi’de. Ankara: Ortadoğu Yayıncılık; 2006. s.81-96.

26. Luppen CA, Blake CA, Ammirati KM, Stevens ML, Seeherman HJ, Wozney JM et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances osteotomy healing in glucocorticoid-treated rabbits. *J Bone Miner Res* 2002;17:301-10.
 27. Bak B, Holmberg P, Andreassen J, Andreassen T. Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop* 1990;61(1):54-7.
 28. Brinker MR, O'Connor DP. (Çeviri: H. Yetkin, M. Yazıcı). Miller'in ortopedi kitabı. Ankara: Adya Yayıncılık; 2006:1-44. 32. Kılıçoğlu Sibel S. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniv Tıp Fak Mecmua* 2002;55(2):143-50.
 29. Kılıçoğlu Sibel S. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniv Tıp Fak Mecmua* 2002;55(2):143-50.
 30. Dalle Carbonare L, Giannini S. Histologic diagnosis of metabolic bone diseases: bone histomorphometry. *Reumatism* 2004;56:15-23.
 31. Akman Ş, Göğüş A, Şener N, Bilgiç B, Aksoy B. Sıçan tibia kırıkları sonrası uygulanan diklofenak-sodyum'un kırık kaynaması üzerine etkileri. *Hacettepe Ortopedi Derg* 2001;11(2):55-60.
 32. Folwarczna J, Janiec W, Sliwinski L. Effects of heparin and low-molecular weight heparin on bone mechanical properties in rats. *Thromb Haemost* 2004;92(5):940-6.
 33. Koçer A, Öner M, Karaman İ, Koçer D, Kafadar İH, Güney A, Karaman ZF. The effects of locally applied simvastatin on an experimental mouse femur nonunion model. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 2014;48(6):679-84. doi: 10.3944/AOTT.2014.14.0120.
 34. Ince A, Schütze N, Karl N, Löhr JF, Eulert J. Gentamicin negatively influenced osteogenic function in vitro. *Int Ortho* 2007;312:223-8
 35. Baldık Y, Talu U, Altınel L, Bilge H, Demiryont M, Aykaç Tokur G. Bone healing regulated by nitric oxide: an experimental study in rats. *Clin Orthop Relat Res* 2002;404:343-52
 36. Kanis JA, Borgstrom F, De Laet C, Johansson H, Johnell O, Jonsson B et al. Smoking and fracture risk: A meta-analysis. *Osteoporos Int* 2005;16(2):155-62.
 37. Mayo KA, Benirschke SK: Treatment of tibial mal-unions and nonunions with reamed intramedullary nails. *Orthop Clin North Am* 1990, 21:715-720.
 38. Cave EF. Delayed Union and Nonunion of Fractures; In *Fractures and Other Injuries* (1 st ed). Year Book Publishers, Chicago 1960
 39. Canale TS. *Campbell's Operative Orthopaedics* (10th ed). Mosby Publishers, Philadelphia 2003
 40. Garcia P, Holstein JH, Maier S, et al. Development of a reliable non-union model in mice. *J Surg Res* 2008;147:84-91
- Öner M, Koçer A. Deneysel rat femur non-union modelinde lokal uygulanan simvastatinin etkileri, Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıpta uzmanlık tezi 2010

41. Canale TS. Campbell's Operative Orthopaedics (10th ed). Mosby Publishers, Philadelphia 2003
42. Claes L, Augat P: Influence of size and stability of the osteotomy gap on success of fracture healing. J Orthop Res 1997, 15:577-84.
43. Chapman MW: Principles of treatment of nonunions and malunions. In: Chapman MW (ed), Chapman's orthopaedic surgery. 3rd ed., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001, s:847-85.
44. Marsh D: Concepts of fracture union, delayed union, nonunion. Clin Orthop 1998, 355: 522-30.
45. Garvin JR, Alberti KGMM, Davidson MB, et al. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care 1998; 21(1): 5-19
46. McKee M. D: Aseptic non-union. In: Thomas P. Rüedi, William M. Murphy (ed), AO principles of Fracture Management, AO publishing, Switzerland, 2001 s:753-768.
47. Oetgen ME, Merrell GA, Troiano NW, Horowitz MC, Kacena MA. Development of a femoral non-union model in the Mouse. Injury 2008;39:1119-26.
48. Harrison LJ, Cunningham JL, Strömberg L, Goodship AE. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. J Orthop Trauma 2003;17:11-21.
49. İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, ve ark. Temel İç Hastalıkları Güneş Kitabevi 1997; cilt 2:2-30
50. Szhudelsky T. The mechanism of alloxan and STZ action in beta cells of rat pancreas. Physiol Res 2001;50:536-46
51. Dunn JS, Duffy E, Gilmour MK, Kirkpatrick J, McLetchie NG. Further observations on the effects of alloxan on the pancreatic islets. J Physiol 1944;103:233-43
52. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother Rep 1963;29:91-8
53. Lenzen S. The mechanism of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. Diabetologia 2008;51:216-26
54. Bell RH, Hye RJ. Animal models of diabetes mellitus physiology and pathology J Surg Res 1983;35:433-60.
55. Koh PO, Sung JH, Won CK, et al. Streptozotocin-induced diabetes decreases placenta growth factor level in rat placenta. J Vet Med Sci 2007;69:877-80
56. Çetiner M: Hücresel Tedaviler Tarihi ve Süreyya Tahsin Aygün. 2. Ulusal Kök Hücre Kongresi Program ve Özet Kitabı, Trabzon, 2006, s:29-34
57. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 1999, 284(5411):143-147

58. Deans RJ, Moseley AB: Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. *Exp Hematol* 2000, 28:875-84
59. Lodie TA, Blickarz CE, Devarakonda TJ, He C, Dash AB, Clarke J, Gleneck K, Shihabuddin L, Tubo R: Systematic analysis of reportedly distinct populations of multipotent bone marrow-derived stem cells reveals a lack of distinction. *Tissue Engineering* 2002, 8: 739-751
60. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, et al. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Jt Surg [Am]* 1998; 80:1745–1757.
61. Ma HL, Chen TH, Hung SC. Development of a new method in promoting fracture healing: multiple cryopreserved bone marrow injections using a rabbit model. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004;124:448-454.
62. Ural AU, Demiralp B, Avcu F, Yurttaş Y, Canpolat E, Can B, Serdar M, Sarper M. : Allojenik mezenkimal kök hücrelerin tavşan tibial segmentel kemik defekti tamirinde kullanımı. *Turkish Journal of Hematology. Supplement* 2004 ;Vol:21 (3):48.
63. Kraus KH, Kirker-Head C.: Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Vet Surg.* 2006 , 35(3):232-42. Review
64. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, Hilbe M, McCool J, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Merkle HP, Rechenberg B, Kaplan DL, Kirker-Head C.: Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone* 2006, 39(4):922-31
65. Ahn JJ, Terry Canale S, Butler SD, Hasty KA.: Stem cell repair of physal cartilage. *J Orthop Res.* 2004 , 22(6):1215- 21.
66. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davey E, Bucay N, Renshaw-Gregg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Boyle WJ. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89: 309–319.
67. Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K. (1997) Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 234: 137–42.
68. Lacey DL, Timms E, Tan H-L, Kelly MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy F, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ. (1998) Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell.* 93: 165–176)
69. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95: 3597 602.

70. Schneeweis LA, Willard D, Milla ME. 2005. Functional dissection of osteoprotegerin and its interaction with receptor of NF-kappaB ligand. *J Biol Chem* 280:41155-41164.
71. Kostenuik PJ, Shalhoub V. (2001) Osteoprotegerin: A Physiological and Pharmacological Inhibitor of Bone Resorption. *Curr Pharm Des.* 7: 613-35.)-(Boyce BF, Xing L. (2007) Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Res Ther.* 9:1.
72. Takayanagi H. (2005) Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *J Periodont Res.* 40: 287-93.
73. Anderson MA, Maraskovsky E, Billingsley WL, Dougall WC, Tometsko ME, Roux ER, Teepe MC, DuBose RF, Cosman D, Galibert L. (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic cell function. *Nature.* 390: 175-9.
74. Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. (2000) Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis, *Nat Genet.* 24: 45-8.
75. Whyte MP, Obrecht SE, Finnegan PM, Jones JL, Podgornik MN, McAlister WH, Mumm S. (2002) Osteoprotegerin deficiency and juvenile Paget's disease. *N Engl J Med.* 347: 175-84
76. Li J, Sarosi I, Yan XQ, Morony S, Capparelli C, Tan HL, McCabe S, Elliott R, Scully S, Van G, Kaufman S, Juan SC, Sun Y, Tarpley J, Martin L, Christensen K, McCabe J, Kostenuik P, Hsu H, Fletcher F, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ. (2000) RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 156-71
77. Shoback D, Bikle DD. Metabolic Bone Disease. In: Gardner DG, Shoback D editors. *Greenspan's Basic & Clinical Endocrinology.* 8th ed. New York, McGraw Hill, 2007;281-345
78. Guerrini MM, Sobacchi C, Cassani B, Abinun M, Kilic SS, Pangrazio A, et al. Human osteoclast-poor osteopetrosis with hypogammaglobulinemia due to TNFRSF11A (RANK) mutations. *Am J Hum Genet* 2008;83:64-76.
79. Hofbauer LC. (1999) Osteoprotegerin ligand and osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism. *Eur J Endocrinol* 141: 195-210.
80. Liu SH, Chang YH, Chiang MT. Chitosan reduces gluconeogenesis and increases glucose uptake in skeletal muscle in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Agric Food Chem* 2010;58: 5795-800
81. Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother Rep* 1963; 29: 91-8
82. Çiğdem Ö, Nuradan Bulut Ç, Hipergliseminin elektrodermal aktivite üzerine etkisinin streptozotocin ile diabet oluşturulmuş sıçanlarda incelenmesi, uzmanlık tezi, agosto 2003

83. Lane JM, Sandhu HS. Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop Clin North Am* 1987;12: 213-25
84. 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: 383-90.
85. Trentz OA, Handschin AE, Bestmann L, Hoerstrup SP, Trentz OL, Platz A. Influence of brain injury on early posttraumatic bone metabolism. *Neurologic Critical Care. Critical Care Medicine* 2005;33:399-406.
86. Einhorn A. Current concepts review: Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg* 1995;77:940-56.
87. Mahy PR, Urist MR. Experimental heterotopic bone formation induced by bone morphogenetic protein and recombinant human interleukin-1B. *Clin Orthop* 1988;237:236-44.
88. rhBMP-2 Enhances the Bone Healing Response in a Diabetic Rat Segmental Defect Model Vikrant Azad, Eric Breitbart, Loay Al-Zube, Sloane Yeh, J. Patrick O'Connor, Sheldon S. Lin. *J Orthop Trauma* Volume 23, Number 4, April 2009
89. Tsuchida H, Hashimoto J, Crawford E, Manske P, Lou J. Engineered allogeneic mesenchymal stem cells repair femoral sagmantal defects in rats. *J of Orthop Research* 2003;21:44-53.
90. Sango K, Horie H, Saito H, et al. Diabetes is nit a potent inducer of neuronal cell death in Mouse sensory ganglia, but it enhances neurite regeneration in vitro. *Life Sci* 2002; 71(20): 2351-2368
91. Suzuki Y, Sato J, Kawanishi M, et al. Lowered response threshold and increased responsiveness to mechanical stimulation of cutaneous nociceptive fibers in sreptozotocin-diabetic rat skin in vitro- correlates of mechanical allodynia and hyperalgesia observed in the early stage of diabetes. *Neurosci Res* 2002;43: 171-178.
92. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diyabetes research: an overview. *Indian J Med Res* 2007;51:216-26.
93. Manoel Luiz Ferreira, Paulo Cesar Silva, Lucas Henrique Alvarez Silva, Danielle Cabral Bonfim, Lucas Cristo Conilho Macedo Müller, Christiano Costa Esposito and Alberto Schanaider. Heterologous mesenchymal stem cells successfully treat femoral pseudarthrosis in rats. *Journal of Translational Medicine* 2012, 10:51
94. Ozturk AM, Cila E, Kanatli U, Isik I, Senkoğlu A, Uzunok D, Piskin E. Treatment of segmental bone defects in rats by the situmilation of bone marrow osteoprogenitör cells with prostaglandin E2. *International Orthopedics* 2005;29:73-77.
95. Ozan F, Dinç MH, Pekedis M, Yıldız H, Bora OA. Nekroza uğramış kemikte allojenik mezenkimal kök hücrelerin kırık iyileşmesi üzerine etkisi. *Electronic Journal of BioTechnology* Vol: 1, No: 2, 2010(1-9)

96. Ferreira ML, Silva PC, Silva LHA, Bonfim DC, Müller LCCM, Esposito CC, Schanaider A. Heterologous mesenchymal stem cells successfully treat femoral pseudarthrosis in rats. *Journal of Translational Medicine* 2012, 10:51
97. Ahn JI, Terry Canale S, Butler SD, Hasty KA.: Stem cell repair of physeal cartilage. *J Orthop Res.* 2004 , 22(6):1215- 21.
98. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, et al.: Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *PNAS USA* 1998, 95:1142-7.
99. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, et al.: Transplantability and therapeutic effects of bone marrowderived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999, 5:309-13.
100. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, McCarville ME, Orchard PJ, Pyeritz RE, Brenner MK.: Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood* 2001, 97(5):1227-31.
101. Xu S, Wang Y, Lu J, Xu J. Osteoprotegerin and RANKL in the pathogenesis of rheumatoid arthritis induced osteoporosis. *Rheumatol Int* 2012;32:3397-403.
102. Pazalluoli ve ark. Osteoprotegerin and B-type natriuretic peptide in non-ST elevation acute coronary syndromes: Relation to coronary artery narrowing and plaques number. *Clinica Chimica Acta* 2008; 391: 74-79.
103. Price PA, Faus SA, Williamson MK. (2001) Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21: 817–824.
104. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Spelsberg TC, Riggs BL. (1999) Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology.* 140: 4367–70.
105. Makhlef HA, Mueller SM, Mizuno S, Glowacki J. (2000) Agerelated decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured inthree-dimensional collagen sponges. *Biochem Biophys Res Commun.* 268: 669–7.
106. Yano K, Tsuda N, Kobayashi F, Kobayashi F, Goto M, Harada A, Ikeda K, Higashio K, Yamada Y. (1999) Immunological Characterization of Circulating Osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor: increased serum concentrations in postmenopausal women with osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 14: 518–27.
107. Stejskal D, Bartek J, Pastorkova R, Ruzicka V, Oral I, Horalik D. (2001) Osteoprotegerin, RANK, RANKL. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 145: 61-4.
108. Honore P, Luger NM, Sabino MC, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB,O'Keefe PF, Ramnaraine ML, Clohisy DR, Mantyh PW. (2000) Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord. *Nat Med.* 6: 521–8.

109. Oyajobi BO, Anderson DM, Traianedes K, Williams PJ, Yoneda T, Mundy GR. (2001) Therapeutic efficacy of a soluble receptoractivator of nuclear factor κ B IgG Fc fusion protein in suppressing bone resorption and hypercalcemia in a model of humoral hypercalcemia of malignancy. *Cancer Res.* 61: 2572–8.
110. Bekker PJ, Holloway DL, Rasmussen AS, Murphy R, Martin SW, Leese PT, Holmes GB, Dunstan CR, DePaoli AM. (2004) A single-dose placebo-controlled study of AMG 162, a fully human monoclonal antibody to RANKL, in postmenopausal women, *J Bone Miner Res.* 19: 1059-66.
111. Body JJ, Facon T, Coleman RE, Lipton A, Geurs F, Fan M, Holloway D, Peterson MC, Bekker PJ. (2006) A study of the biological receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand inhibitor, denosumab, in patients with multiple myeloma or bone metastases from breast cancer, *Clin Cancer Res.* 12: 1221–8.
112. Müller ME. *Manuel of internal fixation* (3th ed). Springer-Verlag, Berlin 1991