

Embriyonik mezenkim dokusunun kırık iyileşmesine etkisi

Hasan Bombacı⁽¹⁾, Adnan Kafadar⁽¹⁾, Fügen Aker⁽²⁾, Metin Türkmen⁽³⁾

Travmatik yada tümöral sebeplerden sonra meydana gelen kaynama problemleri ve kemik defektlerinin tamirinde diğer yöntemlerin yanında en sık olarak kemik greftleri uygulanmaktadır. Ashton ve arkl. kemik iliğini kullanarak ve stromal hücrelerinin embriyonik karakterde kemik ve kırık hücrelerine dönüştüğünü göstermiştir. Bu da farklılaşmamış postnatal kemik iliği hücrelerinin embriyonel gelişmenin erken safhasındaki farklılaşmamış mezenkim hücreleri ile aynı gelişme potansiyeline sahip olduğunu gösterir. Bizde bu çalışmada yukarıda bahsedilen sorunların halledilmesinde, şimdiye kadar denenmemiş bir yöntem olan embriyonel mezenkim hücrelerinin etkinliğini değerlendirmeyi amaçladık. Bu amaçla 16 adet Wistar cinsi sıçanın her iki femurunda da kırık oluşturulduktan sonra bir taraftaki kırıklara intramedüller Kirschner teli ile interkondiler çentikten girilerek osteosentez sağlanmış, diğer tarafta ise intramedüller osteosentezden sonra, sıçan embriyosundan mikroskop altında alınan mezenkim hücrelerinden zengin vertebral kolon kırık hattına implante edilmiştir. Böylece hem daha yoğun mezenkim hücresi sağlamayı, hem de mezenkim hücrelerinin proliferasyonuna kadar geçen süreyi kazanmayı planladık. Sıçanlar 2 gruba ayrılmış, 6 ve 8 haftalık takipler sonunda femurlar radyolojik ve histolojik incelemeye tâbi tutulmuştur. Radyolojik olarak greft konan taraflardaki femurlarda daha ileri safhada kallus görüntüsü, diğer tarafa göre daha sıklıkla tespit edilmiştir. Histolojik incelemede de kallusun diğer tarafa göre greftli tarafta daha olgun olduğu ve konulan greftin kallus dokusu ile bütünleştiği görülmüştür. Kaynama prosedürü greft konmayan tarafa göre daha fazla ilerlemiş bulunmuştur. Bunun yanında kaynama süresi sıçanlardaki kapalı kırık kaynama süresi dikkate alındığında uzun bulunmuştur. Bu kırık hematomunun kaybına veya immün reaksiyona bağlı olabilir. Bu çalışmadaki sonuçlarımız gösteriyorki, kırık kaynama işlemi esnasında mezenkim hücrelerinin kondroblastlar dönüşmesi için hücre içi biyolojik ortamın, kırığın olduğu ortamın veya diğer bazı bilinmeyen faktörlerin önemli etkisi vardır. Greft olarak nakledilen mezenkim dokusu gecikmelide olsa kallus dokusu ile bütünleşir ve kallusun nitelik ve nicelik olarak gelişmesine katkıda bulunur. Nakledilen mezenkim dokusuna karşı gelişen immün reaksiyon bu araştırmanın kapsamı dışında olsa da sonucu etkilemesi beklenen bir diğer önemli faktördür. Sonuç olarak, embriyonel mezenkim hücrelerinin kemik defektlerinin doldurulmasında etkili olduğu, ancak doku reddinin değerlendirilmesi için daha uzun süreli takibe ihtiyaç duyulduğu kanaatine varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Kemik grefti, kemik defektleri, kallus, mezenkim dokusu

The effect of embryonic mesenchymal tissue on fracture healing

Bone grafts are used most frequently beside other methods for problems occurring with healing after trauma or tumors and for repair of bone defects. Ashton et al. have studied bone marrow and demonstrated that both bone and cartilage of an embryonic nature are produced by differentiated marrow stromal cells, suggesting that the undifferentiated precursor cell of the postnatal marrow has the same potential as the undifferentiated mesenchymal cell found in early embryonal stages of development. Our aim in this study was to evaluate the efficacy of embriyonic mesenchymal cells as a solution for the abovementioned problems and this method has not been used until now. We performed fractures on both femurs of 16 Wistar rats and than treated one side with osteosynthesis only with intramedullary Kirschner wire, and the other side was treated after an intramedullary Kirschner osteosynthesis with a vertebral colon from rat embryo implanted on fracture line and this colon is rich in mesenchymal cells. So, we both intended to get larger amount of mesenchymal cells and gain the time in which mesenchym cells proliferate. The femurs of 2 groups of rat, were examined radiologically and histologically, at 6th and 8th weeks. On radiological examination, callus was further developed on the femurs in which graft was used as opposed to the other side. On histologic examination, callus was much mature and graft was blended with it on the grafted side. Union procedure was fur-

(1) Haydarpaşa Numune Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği Başasistanı, Op. Dr.

(2) Haydarpaşa Numune Hastanesi Patoloji Laboratuvarı Başasistanı, Uzman Dr.

(3) Haydarpaşa Numune Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği Şefi, Doç.Dr.

ther developed in the site of graft. Besides, the union time has been found longer in comparison with closed fracture union time in rats. It might depends on either the lack of fracture hematoma or the immune reaction. Our results of this study confirm that, the intracellular milieu, the milieu in which fracture takes place or other miscellaneous unknown factors have great effect in the union procedure while mesenchym cells transforme to chondroblasts. Mesenchym tissue which is transferred as greft, unite with callus at last and boost it as quality and quantity. The immune reaction which developes against to the transferred mesenchym tissue although is out of the scope of this study, is another important factor which is expected to effect the result. As a result, we concluded that embryonal mesenchymal cells are effective in filling bone defects, but a longer follow-up time is required for the evaluation of tissue rejection.

Keywords: Bone graft, bone defects, callus, mesenchymal tissue

Tedavisi uzun zaman gerektiren ve maddi kayıplara sebep olan kemik kaynama bozuklukları, travmatik ya da tümoral kemik defektlerinin doldurulması ortopedistlerin mesleki uygulamalarında her zaman önemli bir yer tutmuştur (2). Bu sebeple çeşitli cerrahi teknikler geliştirilmiş, yeni implantlar denenmiş, kemik iliği ve günümüzde de hâlâ en sıklıkla başvurulan kemik greftleri kullanılmıştır (13, 14, 21, 26, 29). Bu greftler otogreft yada allogreft olabilir. Bu yöntem çok basit ve genellikle iyi sonuç alınan bir uygulamadır.

Kırık kaynaması embriyonik oluşumlardaki gibi endokondral ossifikasyon mekanizmasıyla, bir çok ardışık gelişmeler sonrası oluşur. Kemik yapının uyarılması konusunda yapılan araştırmalar bu biyolojik olayın anahatlarını ortaya koymuştur. Kemik yapının ana hücresi olan osteoblastlar primitif mezenkim hücrelerinden kaynaklanmaktadır. Bu hücreler de alıcısındaki küçük damarların etrafında yoğunlaşmakta, "BMP" (bone morfojenik protein), "transforming growth factor beta" ve diğer bölgesel medyatörler etkisi ile osteoblastlara dönüşerek kemik üretimini sağlamaktadırlar (4, 5, 8, 9, 15, 16, 19, 23, 26).

Biz bu gerçekten hareketle, osteoblastlara kaynak oluşturan mezenkim hücrelerini embriyodan elde edip, daha yoğun bir şekilde kırık bölgesine naklederek kallus süresine ve miktarına etkisini araştırdık.

Gereç ve yöntem

DETAM Araştırma Laboratuvarı ve Haydarpaşa Numune Hastanesi Patoloji Kliniğinde yürütülen çalışmamızda 20 adet Wistar cinsi sıçan (180- 200 gr) ve 3 adet 7 günlük gebe sıçan ile çalışıldı (12). Araştırma 3 seansta tamamlandı. Deneklerden enfeksiyon gelişen 4 tanesi araştırma dışı bırakılarak uygun olan 16 sıçanın 32 femuru değer-

lendirmeye alındı.

Hayvanlar eter ile sersemletildikten sonra intraperitoneal 50mg/kg thiopentone ile genel anestezi sağlandı. Bu esnada diğer taraftan yüksek doz eter ile öldürülen gebe sıçana seksiyon yapılarak, embriyolar greft alınmak üzere hazırlandı. Steril şartlar altında ve biomikroskop kullanılarak embriyoların servikal ve kaudal eğimler arasında kalan vertebral kolonunun* tamamı dokunun ezilmemesine dikkat edilerek keskin diseksiyonla çıkarıldı (Şekil 9). Greftler nakil için geçen süre zarfında(en az 15, en fazla 70 dakika) serum fizyolojik içinde muhafaza edildi. Diğer sıçanlarda uyluk anterolateralinden longitudinal insizyonla girilerek kemiğe ulaşıldı. Femur diafizinde kemik makası ile kırık oluşturulduktan sonra intramedullar Kirschner teli ile medullayı sıkı olarak dolduracak şekilde osteosentez sağlandı. Cerrahi travmayı en az düzeyde tutmak için Kirschner telleri distalden interkondiler çentikten intramedüller olarak gönderildi. Tellerin gönderilmesinde her zaman intramedüller üç noktadan temas eden stabil bir osteosentez temin etmek mümkün olmadı. Bu grafilerin çoğunda görülen aşırı eksojen kallus oluşumu ile de radyolojik olarak aşıkârdır. Fakat bunun yanında greft konmayan diğer tarafta da aynı şartlar geçerli olduğundan sonuçları karşılaştırmak mümkün olmuştur. Sağ taraftaki femurlar osteosentezden sonra kapatılırken, sol taraftaki femurlardaki kırık hattına hazır edilen embriyonal mezenkim dokusu geniş bir alanın kırık hattıyla temas etmesine özen göstererek spiral şekilde yerleştirdi ve kapatıldı (Şekil 10). Gluteal bölgeden adele içi 1mg/kg sulperazon ile antibiyotik profilaksisi yapıldı. Sıçanlarda normal beslenme yanında rutin yara bakım ve takibi yapıldı. 4 sıçanda yarada enfeksiyon gelişti ve daha sonra bunlar çalışma dışı bırakıldı.

Bu deneklerden değerlendirmeye alınan 16 sıçandan 8 tanesi 6. haftada, 8 tanesi 8. haftada öl-

* Daha önce yaptığımız ön çalışmada 1 haftalık gebe albino Wistar sıçanın embriyosundan aldığımız örneklerin histolojik çalışmasında, primitif mezenkimal hücreleri en fazla vertebral kolonda bulduk.

Kemik oluşumu	Puanlama
Hiç kemik oluşumu yok	0
Kemik oluşumu defektin % 25'ini işgal ediyor	1
Kemik oluşumu defektin % 50'sini işgal ediyor	2
Kemik oluşumu defektin % 75'ini işgal ediyor	3
Kemik oluşumu defekti tamamen doldürmüştü	4

Tablo 1: Kallus oluşumunun radyolojik skorlaması (Lane ve ark)

	Radyolojik skorlama		Histolojik skorlama			
	Graft (+)	Graft (-)	Graft (+)	Graft (-)	Graft (+)	Graft (-)
6 hafta	1-2	1	5	0-1	2	6
	3-4	7	3	2-3	6	2

Tablo 3: 6. haftada öldürülen sıçanların radyolojik ve histolojik değerlendirilmesi.



Şekil 1: 8 haftalık sıçanın greft konmuş sol femuru. Lane'e göre skorlaması 4 bulundu. Kaynama tam.

dürüldü. Her iki bacakta femurlar röntgen çekildikten sonra çıkartılarak histopatolojik değerlendirmeye alındı. Femurlar bir günlük %10'luk formalin fiksasyonunu takiben dekalsifikasyon amacıyla %10'luk formik asit içerisinde 4 hafta bekletildi. Bu süre sonunda 3-4 saat suda yıkandı ve rutin takip prosedüründen sonra parafin bloklara uygulanan kesitler H&E (Haematoxylin-Eosin) ile boyandı. Kesitler longitudinal plan boyunca, çıkarılan bütün femuru kapsayacak şekilde yapıldı. Ayrıca alınan vertebral kolonun nöral doku içerip içermediğini araştırmak amacıyla S-100 primer antikoru kullanılarak alkalen fosfataz konjuge Streptavidin-biotin(süpersensitif sistem-Biogenex CA, U.S.A) sistemi ile immünohistokimyasal inceleme yapıldı. Ancak greft alanında nöral dokuya rastlanmadı.

Sıçan femurlarının grafileri ve histolojik incelenmesi Lane ve arkl.'nın önerdiği radyolojik ve his-

Kaynama	Puanlama
Hiç kaynama yok	0
Fibröz kaynama	1
Osteokondral kaynama	2
Kemiksel kaynama	3
Şaftın tam reorganizasyonu	4

Tablo 2: Kallus oluşumunun histolojik skorlaması (Lane ve ark)

	Radyolojik skorlama		Histolojik skorlama			
	Graft (+)	Graft (-)	Graft (+)	Graft (-)	Graft (+)	Graft (-)
8 hafta	1-2	0	2	0-1	1	4
	3-4	8	6	2-3	7	4

Tablo 4: 8. haftada öldürülen sıçanların radyolojik ve histolojik değerlendirilmesi.



Şekil 2: 6. haftada sıçanın greft kullanılmamış sağ femuru. Lane'e göre skorlaması 2 bulundu.

tolojik skorlama kriterlerine göre değerlendirildi (18) (Tablo 1, 2).

Bulgular

Çalışmaya alınan 20 sıçandan değerlendirmeye alınan 16 tanesinin 8 tanesi 6. haftada öldürüldü. Radyolojik incelemede greft konulan tarafta kemik oluşumu Lane'nin radyolojik skorlamasına göre 8 sıçanın 7 tanesinde 3-4 bulunurken (Şekil 1) greft konulmayan diğer tarafta radyolojik skorlaması 3 olan 3 sıçan hariç diğer sıçanlarda skor 1 ve 2 olarak tespit edilmiştir (Şekil 2). Greft konmayan tarafta greft konan tarafa kıyasla kırık bölgesinde kallus dokusunun daha hipertrofik fakat buna karşılık kırık hattında daha belirgin olduğu gözlemlendi (Şekil 2). Bu sıçanların femurlarının histopatolojik incelenmesinde greft konulan femurlardan 2 tanesinde



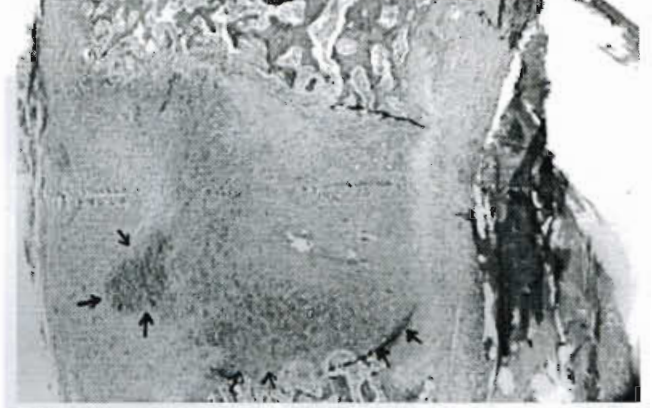
Resim 3: 6. haftada öldürülen sıçanın greft konmamış sağ femurundan kesit. Resmin sol üst ve sağ alt köşesinde kemiksel kallus dokusu görünürken, kırık hattında fibröz dokudan zengin alan seçilmektedir (Lane'e göre grade 1) (H&Ex40).



Şekil 5: 8. haftada öldürülen sıçanın greft konmuş sol femurundan kesit. Embriyo kolumna vertebralisinden alınmış primordial mezenkim hücreleri kallusla sınırları belirsizleşecek ölçüde bütünleşmiş(okla işaretli alanlar) olarak izlenmekte(Lane'e göre grade 2) (H&Ex40).



Şekil 4: 6. haftada öldürülen sıçanın greft konmuş sol femurundan kesit. Embriyo kolumna vertebralisinden alınmış primordial mezenkim hücreleri karakteristik görüntüsüyle belirgin (okla işaretli alanlar). Sol üstte kallusla bütünleşmesi daha ileri aşamada seçiliyor (Lane'e göre grade 2) (H&Ex40).



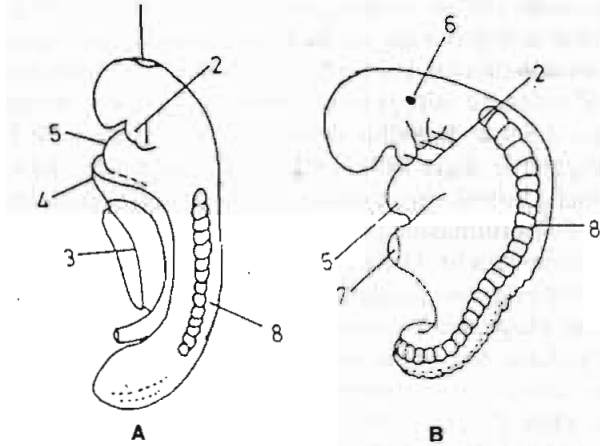
Şekil 6: 8. haftada öldürülen sıçanın greft konmuş sol femurundan kesit. Kırık hattında kaba anatomik devamlılık oluşmuş. Osteokondral kaynama kemiksel kaynamaya dönüşüyor. Greftin sınırları belirsiz fakat yer yer yoğunlaşmış kırıkta kümeleri şeklinde görülüyor (Lane'e göre grade 2-3) (H&Ex40).

histolojik skor 1, diğer 6 tanesinde 2-3 bulunmuştur (Şekil 3). Greft konulmayan femurlardan 6 tanesinde histolojik skor 1-2, 2 tanesinde ise 3-4 olarak tespit edilmiştir (Şekil 4) (Tablo 3). 8 haftada öldürülen sıçanlarda da kaynama greft konulan tarafta daha ileri safhada olup sonuçlar toplu olarak Tablo-4'te gösterilmiştir. Histolojik incelemede H&E (Hematoxylin-Eosin) boyaması ile hazırlanan kesitlerde her iki kenarında koyu boyanan bantlarla karakteristik konik şeklindeki primordial mezenkim hücrelerinden oluşan vertebral kolon kesitleri 6. hafta civarında kallus dokusu içerisinde belirginken, 8. haftada kallus içerisinde kaybolmaya başlamakta ve kallusla bütünleşmektedir. Kırık hattında daha solid ve ileri aşamada kallus dokusu oluşmaktadır (Şekil 5, 6). Greft konmayan femurlardan yapılan kesitlerde ise 6. haftada femurların çoğunda, 8. haftada ise yarısında kırık hattı, fibröz dokudan zengin olarak izlenmektedir (Tablo 3, 4) (Şekil 3).

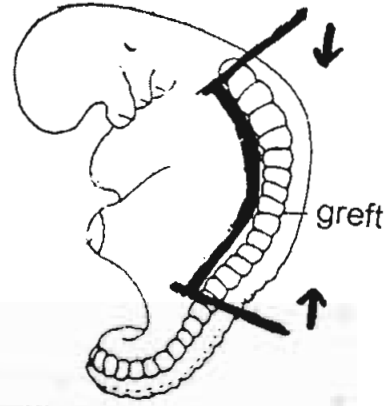
Tartışma

İnsanda kas iskelet sistemi oluşması embriolojik hayatın 17-20. günleri arasında mezodermden ilk somitlerin farklılaşması ile başlar (Şekil 7) (22). Somitler farklılaşarak a)sklerotom, b)myotom, c)dermatom oluşur. Sklorotomun meydana gelmesi ile omurga ve iskelete ait kemiklerin gelişmesi başlar. En ilkel omurgalıdan insana kadar bütün canlılarda "chorda dorsalis" primer iskeleti oluşturur. 4. haftada sklerotomdan göç eden hücreler bir taraftan chorda dorsalis çevresinde dizilerek- insan gibi yüksek sınıf canlılarda -omurgayı oluştururken, diğer taraftan mezenkim hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşması ile kondroblastlara dönüşerek kırıkta dokusunu, osteoblastlara dönüşerek kemik dokusunu oluştururlar (Şekil 8) (22).

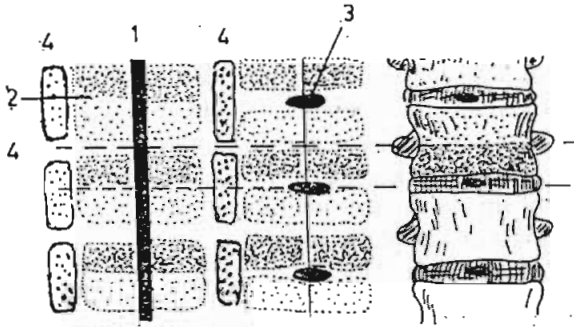
Kırık yada tümöral sebeplerle kemiklerde kayıplar meydana gelebilir. Kemik defektlerinin doldurul-



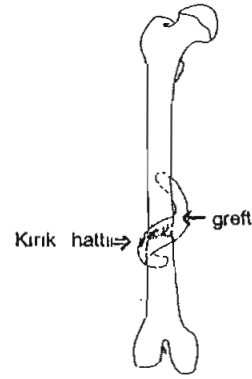
Şekil 7: a.25 günlük bir embriyonun, b.28 günlük bir embriyonun yandan görünüşü. 1.neuroporus anterior, 2.yutak kaviseri, 3.ductus omphaloentericus, 4. amnion kesesi, 5. kalp taslağı, 6. kulak taslağı, 7.göbek bağı, 8.somitler (İ.Petorak).



Şekil 9: Greftin alındığı siçan embriyosunun vertebral kolon bölgesi (İ.Petorak).



Şekil 8: Sklerotomdan omurganın meydana gelişi. 1. chorda dorsalis, 2. sklerotom, 3. nucleus pulposus ve discus intervertebralis, 4. myotom (İ.Petorak).



Şekil 10: Mezenkim dokusundan zengin embriyonel greftin kırık hattına yerleştiriliş şekli.

ması ve kırık kaynamasının sağlanması için çok uzun zamandır pek çok ameliyat yöntemleri,damarlı kemik greftleri, implantlar, hiperbarik oksijen tedavisi, elektrik uygulamaları denenmiştir (2, 6, 13, 14, 17, 27, 29). Bu yöntemler arasında en sık kullanılan ise kemik greftleridir.

Kemiğin kaybının kortikal yada spongioz olmasına göre uygulanacak greft çeşidi ve miktarında değişir. Kortikal kemik kayıplarında destek görevinde olan kortikal kemik greftleri kullanılması daha uygun gibi görünse de greftin alıcı ile bütünleşmesinde prosedür her zaman istenilen neticeyi vermemektedir. Kortikal greftlerde bütünleşme osteoklastik aktivite ile başlamakta, osteoklastların ardından bölgeye gelen kan damarları ile osteoblastlar "creeping substitution" adı verilen mekanizmayla yeni kemik yapımını sağlamaktadırlar (3, 7, 18, 23, 25, 28). Bu işlem spongioz greftlerde greftin osteokondüktif etkisiyle daha kısa sürede başlayan osteoblastik aktivitesi ve kaynamasıyla karşılaştırıldığında çok uzun

sürmekte hatta bazen hiç tamamlanamamaktadır (4, 31).

Greftin osteoindüksiyonu greftin spongioz yada kortikal oluşuna göre başlangıçta biraz farklılık oluştursa da temelde aynı olaylar silsilesi halinde gelişir (18, 23, 28). Greft alıcı bölgeye yerleştirildikten sonra implante kemik matriksindeki fibronektin ve ölen hücrelerden salınan nekrotik maddelerle inflamasyon safhasında kemotaksis meydana getirir. İlk hücreler kemik iliğinden, greftin endost tabakasından ve yakındaki periosttan gelir (4, 10, 24, 25). Sonraki safhada-ki bu 7-8 gün sonra gerçekleşir- mitozla mezenkim hücrelerinden kondroblast ve bunlardan diferansiyasyonla osteoblastlar oluşur (23). Osteoindüksiyon aşaması osteoblast ve osteoklastların fonksiyonlarının arttığı dönemdir. Osteokondüksiyon safhasında, damarlanmayı takiben osteoblastlar grefte ulaşarak -"creeping substitution" -mevcut kemik yapısı üzerinden yeni kemik yapımına başlarlar. Bunu takip eden remodeling safhası ise yıllarca

sürebilir (3, 4, 26). Bu olaylarda kortizon, kalsitonin, tiroid ve paratiroid hormon, büyüme hormonu gibi sistemik ve "bone morfojenik protein", "transforming growth factor-beta", "insulin like growth factor-II", "platelet derived growth factor" gibi pek çok bölgesel faktörler rol almaktadır (3, 5, 8, 9, 19, 20, 30).

Kemik greftleri, bu kadar sık kullanılmasının yanında tamamen masum işlemler değildir. Başta greftin alındığı yerde kanama, şekil bozukluğu, fonksiyon bozukluğu, ağrı, enfeksiyon gibi rahatsızlıkların görülebileceğinin yanısıra ayrıca nakledildiği yerde de allogreftlerde immun reaksiyon gelişmesi greftin alıcı dokuyla bütünleşmesini geciktirmekte, bazan da kaynama oluşsa bile geç dönemde özellikle kortikal greftlerde gevşemeler meydana gelmektedir (11). Red reaksiyonu asıl olarak T lenfositlerinin hücre cevabı olup greftteki antijenik yapıların kemik iliği, osteoblast, osteoklast ve ürünleri olduğu belirtilmektedir (11). Donmuş ve deproteinize edilmiş kemiğin antijenik özelliği azalmaktadır. Fakat özellikle deproteinize kemiğin osteoindüktif özelliği de ileri derecede azalmaktadır (18). Bu yüzden kemik greftinin yerini tutacak sentetik veya yarı sentetik maddelerin arayışı devam etmektedir (3, 16, 18, 21, 27).

Ashton ve arkl. yaptıkları çalışmada embriyonik kemik ve kırıldak hücrelerinin kemik iliği hücrelerinden elde edilebileceğini, indifersaniye kemik iliği hücrelerinin erken embriyonel dönemdeki mezenkim hücrelerinin potansiyeline sahip olduğu kanaatine varmışlardır (1). Mezenkim hücreleri osteoindüksiyonda sahneye en erken 7-8. günde, tam anlamıyla 2. haftada çıkmaktadırlar (23, 24). Mezenkim hücreleri, normal sekonder kallus oluşum sürecinde önce prolifer olmaya, sonra olaylar silsilesi halinde kondroblast farklılaşması, kırıldak oluşumu, vasküler invazyon ile encondral ossifikasyon gelişmekte, önce "woven bone" sonra "lameller bone" olarak işlem son bulmaktadır. Biz çalışmamızda bu arada geçen süreyi kazanmak ve daha yoğun mezenkimal hücre transferi sağlayarak kaynamayı çabuklaştırmayı amaçladık. Yaptığımız ön çalışmalarda mezenkim dokusunun en yoğun olarak 1 haftalık sıçan embriyosunun vertebral kolonunda olduğunu tespit ettik. Kırık sahasına koyduğumuz mezenkim hücrelerinin kondroblastlara dönüşmesinin umduğumuz hızda gerçekleşmediğini gördük. Bunun bir kaç sebebi olabilir; bu durumda hücrelerin bu dönüşümü sağlaması için gerekli ortam alıcı bölgede olmayabilir, nakledilen hücrelerin metabolizması yada hücre içi moleküler biyoloji buna hazır olmayabilir, yada

alıcıdaki immün reaksiyonu yenmek zaman alabilir. Fakat sebep her ne ise belli bir zamana mal olsada sonunda ortadan kaldırılmaktadır. Kırık hattında kallus oluşumu süregiderken implante edilen mezenkim dokusu da kallus dokusu ile birleşmekte ve bu bölgelerde diğer bölgelerden daha yoğun bir kondroblast kitlesi oluşmaktadır (Şekil 4, 5, 6). Bu defektin doldurulmasında artmış kondroblast sayısı ile etkili olmaktadır. Daha önce denenmemiş bu yöntemle embriyodan aldığımız primitif vertebral kolonun, kırık oluşturulan femurlara büyük oranda konsolide olduğunu, 6. haftada ve 8. haftada öldürülen sıçanların radyolojik ve histolojik değerlendirilmesinde tespit ettik (Tablo 3, 4). Mezenkim hücreleri "woven bone" içerisinde önce kondroblastlara dönüşmüş, daha sonra bölgesel meyatör faktörlerin etkisi ile kemikleşme meydana gelmiştir.

Sonuçlar Lane'in tarif ettiği radyolojik ve histolojik kriterler esas alınarak değerlendirildiğinde gerek 6. hafta, gerekse 8. haftada yapılan değerlendirmelerde greft konan taraflarda, kontrol taraflarına göre kaynamanın daha ileri safhada olduğu, aynı zamanda klinik muayenede tutunmanın da daha çok hayvanda gerçekleştiği ortaya çıktı. Buna karşılık radyolojik ve histolojik bulgularda bire bir ilişki kurmak her vakada mümkün olmadı. Biz bunu Lane'in kullandığı "fine focus radiography" tekniğini uygulayamayışımıza, bu sebeple de radyolojik değerlendirmelerimizin histolojik değerlendirmelere göre daha subjektif ve hataya yatkın olmasına bağladık. Buna rağmen radyolojik bulgular kendi içinde değerlendirildiğinde, kallusun radyolojik görüntüsünün, greft konan tarafta, kontrol tarafına göre, daha çok sayıda bacakta ileri safhada olduğu gözlenmiştir. Kaldı ki bu çalışmadaki esas amacımız aldığımız mezenkimden zengin embriyonel greftin kallusla bütünleşmesini ve süregiden kaynamaya etkisini araştırmak olduğundan histolojik değerlendirme sonuçları daha objektif olarak kabul edilmiştir. 6. haftada öldürülen 8 sıçanın greft konan femurlarının 7'sinde kemik oluşumu defektin % 50'sinden fazlasını işgal ederken greft konmayan tarafta bu sayı 3'tür. Greft konan tarafta osteokondral ve kemiksel kaynama 8 femurun 6'sında gelişirken greft konmayan tarafta 2 femurda sağlanmıştır (Tablo 3). Keza 8. haftada öldürülen sıçanlarda da benzer sonuçlar alınmıştır (Tablo 4). Takip süresi uzun olmadığı için shaftın tam reorganizasyonu hiçbir vakada görülemedi.

Herşeye rağmen kırıkların kaynaması sıçanlardaki kapalı kırık iyileşmesi süreleri dikkate alındığında nispeten uzun olarak bulunmuştur. Bu açık müdahale-

lede kırık hematomunun kaybına bağlı olabileceği gibi, immün reaksiyona da bağlı olabilir. Horowitz ve ark. yaptıkları araştırmada antijenik hücrelerin kemik iliği, osteoblast, osteoklast ve ürünleri olduğunu belirtmişler fakat mezenkim hücrelerinin anti-jenitesi konusunda bir tespit yapmamışlardır (11). Heiple ve arkl. allogreftlerde immün reaksiyonun greftin konsolidasyonunu yavaşlattığını fakat kendi serisinde gecikmeli de olsa bütün vakalarda kaynama elde ettiğini belirtmiştir (10). Bu gecikme mezenkim hücrelerinin değişime uğraması için gereken damarlanmanın greft sahasına ulaşması için gereken süreye de bağlı olabilir.

Sonuç olarak, mezenkim dokusundan zengin embriyonel primitif vertebral kolonun kırık hattında kemiğe konsolidasyonu oluşmuş, femoral kaynama ümit edilen hızda olmamakla beraber radyolojik ve histolojik olarak greft konmayan taraflara göre daha üstün bulunmuştur. İmmün reaksiyonun değerlendirilmesi açısından daha uzun süreli takip edilmiş çalışmalarla ihtiyaç vardır.

Kaynaklar

- Ashton BA, Allen TD, Howlet CR, et al: Formation of bone and cartilage by marrow Stromal cells in diffusion chambers in vivo. *Clin Orthop* 151: 294-307, 1980.
- Böhm P, Scherer MA: Incorporation of devitalised autografts in dogs. *International Orthop* 21:283-290, 1997.
- Brinker MR, Miller MD: *Review of Orthopaedics* 2nd edition. Philadelphia: WB. Saunders Company, 1-22, 1996.
- Burchardt H: Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am* 18 (2):187-195,1987.
- Cornell NC, Lane JM: Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop* 277: 297-311.1990.
- DeSantis G, Williams JF, Dvir E, McCO'Brien B, Hurley JV, Goldberg I: Effect of postoperative radiation of tibial bone grafts in the rabbit. *J Bone Joint Surg* 72 (B): 2 309-311, 1990.
- Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G: Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *J Bone Joint Surg* 57 (A): 2 237-252,1975.
- Frost HM: The Biology of fracture healing. Part I. *Clin Orthop* 248:283-293.1989.
- Frost HM: The Biology of fracture healing. Part II. *Clin Orthop* 248:294-309, 1989.
- Heiple KG, Goldberg VM, Powell AE, Bos GD, Zika JM: Biology of cancellous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 18 (2): 179-185, 1987.
- Horowitz MC, Friendlaender GE: Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *Orthop Clin North Am* 18 (2): 227-233, 1987.
- IFFA CREDO (Institut français de la fièvre aphteuse centre de recherche et d'élevage du domaine des oncins) *Laboratory Animals* 40-46, 1992.
- Ilizarov G: The tension-stress effect on the genesis and growth of Tissues. Part I. *Clin Orthop* 238:249-281,1989.
- Ilizarov G: The tension-stress effect on the genesis and growth of Tissues. Part II. *Clin Orthop* 239:263-285,1989.
- Kawamura M, Urist MR: Induction of callus formation by implants of bone morphogenic protein and associated bone matrix noncollagenous proteins. *Clin Orthop* 236:240-248, 1988.
- Kıral A, Şarlak Ö, Gür E, Gültekin N: Tavşanlarda uzun kemiklerdeki geniş segmental defektlerin iyileşmesinin allojenik demineralize kemik matriksi ve otojen kemik iliği transplantasyonu ile uyandırılması. *Acta Orthop Traumatol Turc* 24: 97-103,1990.
- Kuşkucu M, Kıral A, Uçmaklı E, Kaplan H, Elbüken E, Kaya T: Hipobarik oksijen uygulamasının sıçan femur kırıklarının iyileşmesindeki etkisi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 25: 234-238, 1991.
- Lane JM, Sandhu HS: Current approaches to experimental bone grafting. *Orthop. Clin of North Am* 18 (2): 213-224,1987.
- McKibbin B: The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surgery* 60 (B): 150-162, 1978.
- Mundy GR: *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. 2nd edit. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 25-32, 1993.
- Özger H, Aydınok HÇ, Küllü S, Eruş V: Çeşitli kemik replaşman materyallerinin sıçanlarda kemik rejenerasyonu üzerine etkisi (Deneyisel çalışma). *Acta Orthop Traumatol Turc* 24: 279-284, 1990.
- Petorak I: *İnsan Embriyolojisinin Ana Hatları*. İstanbul Üniversitesi, Rektörlük Yayın no.2414. Diş Hekimliği Fakültesi Yayın, 31:58-76, 1980.
- Reddi AH, Wientroub S, Muthukumar N: Biologic principle of bone induction. *Orthop Clin North Am* 18 (2): 207-212,1987.
- Sandberg M, Aro H, Multimaki P, Aho H, Vuorio E.: In situ localization of collagen production by chondrocytes and osteoblasts in fracture callus. *J Bone Joint Surg* 73 (A): 1 69-76,1989.
- Saphiro F: Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg* 70 (A):7 1067-1081,1988.
- Simmons DJ: Fracture healing perspectives. *Clin Orthop* 200:100-113,1985.
- Sönmez M, Durak K, Bilgen Ö: Kemik onarımında kemik iliği ve koral greft uygulamalarının sonuçları. *Acta Orthop Traumatol Turc* 30: 76-79, 1996.
- Springfield DS: Massive autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am* 18 (2): 249-256, 1987.
- Şen B, Çakmak M, Seyhan F, Göğüş A, Taşer Ö: Kırık sonrası oluşan kallusun devamlı kompresyonu tekniği ile primer kırık iyileşmesi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 25: 39-45, 1991.
- Trippel SB: Bone formation and repair. *American Academy of Orthopaedic Surgeons, Symposium* 3-146, 1994.
- Türkmen İM: Otojen kemik greftlerinin kırık kaynaması üzerine etkileri (Deneyisel Araştırma). *Acta Orthop Traumatol Turc* 20:54-65, 1986.

Teşekkür

Deneylerin yapıldığı İstanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Araştırma Merkezi'nde görevli Dr. Aydın Çevik'e, Haydarpaşa Numune Hastanesi Patoloji Kliniğinde görevli Dr. Neşe Karadağ'a, İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilimdalı'nda görevli Dr. Bilge Bilgiç'e her türlü yardımlarından dolayı teşekkür ederiz.

Yazışma adresi:

Dr. Hasan Bombacı

Barbaros Mah. Başkan Sokak

Soyak Gökyüzü Konutları

B Blok D.44

81150 Üsküdar, İstanbul, Türkiye