

1. GİRİŞ

Distraksiyon osteogenezis (DO), kırık hattında oluşan kallus dokusuna aşamalı ve kontrollü olarak çekme-gerilme kuvvetinin uygulanması sonrası yeni kemik oluşması işlemidir. DO, konjenital veya edinsel kraniyofasyal iskeletsel anomalilerin cerrahi tedavisinde tercih edilen bir tedavi yöntemidir (1). DO ile başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen distraksiyon sonrası yeni kemik oluşumu için geçen süre yani konsolidasyon periyodunun uzun olması önemli bir dezavantajdır (6-8 hafta). Göreceli olarak uzun olan bu süreçte distraktörün takılı kalması en önemli problemlerden bir tanesidir. Buna ek olarak bu uzun süreçte ortaya çıkan ağrı, pinlerin gevşemesi ve buna bağlı distraktörün düşmesi, enfeksiyon ve kemik iyileşmesinin gecikmesi diğer önemli problemlerdir. Konsolidasyon periyodunun kısaltılmasına yönelik girişimlerin, bu problemlerin çözümünde önemli katkısı olacaktır. Konsolidasyon periyodunun kısaltılması için büyüme faktörleri, gen tedavisi, *bone* morfojenik protein (BMP) kullanımı gibi çeşitli tedavi yöntemlerine yönelik araştırmalar yapılmıştır ve halen bu konuda çalışmalar devam etmektedir (2,3,4). Bu amaçla kullanılabilecek diğer bir yöntem de kök hücre tedavisidir.

Organizmada, kendi kendini yenileyebilen, farklı hücre tiplerine dönüşebilen hücrelere “kök hücre” denir. Kök hücrenin hangi hücreye farklılaşacağını hücre çekirdeğinde bulunan genler kontrol eder. Canlı vücudunda ancak birkaç hücre türüne dönüşebilen bu hücreler, laboratuvar koşullarında gerekli destekleyici ortam ve sinyaller sağlandığında çok daha fazla hücre türüne dönüşebilmektedir.

Erişkin kemik iliği stroması mezenşimal kök hücreleri veya mezenşimal progenitor hücreler olarak bilinen hematopoetik hücre olmayan bir hücre grubu içerir. Bunlar kemik, kırık, yağ, tendon, kas ve kemik iliği stroması

içeren farklı mezenşimal dokulara in vitro veya in-vivo olarak gelişebilen multipotent öncüllerdir ve bu onları doku mühendisliği çalışmaları için çekici bir hücre kaynağı yapar (5). Bunlar kemik iliği hücrelerinin yaklaşık %0,01 ile %0,001'ini temsil eder, fakat cam ve plastiğe yapıştıkları için hematopoietik kök hücrelerinden kolaylıkla ayrılabilirler (6). Mezenşimal kök hücrelerin kemik iliği dışında vücutta kemik, kıkırdak, düz kas ve iskelet kası gibi dokularda da bulunduğu gösterilmiştir.

DO süresince yeni kemik oluşumu, primitif mezenşimal hücreler, fibroblastlar, osteoklastlar, osteoblastlar ve bunların prekürsörlerinin de katıldığı kompleks bir süreç sonucu meydana gelir. Bu süreçte primitif mezenşimal hücreler değişik mekanik stimulusların etkisi ile distraksiyon alanında yeni kemik oluşumunda anahtar rol oynayan hücrelere farklılaşırlar (7). Bu da konsolidasyon periyodunda yeni oluşan kemiğin mineralizasyonun hızlanmasına katkıda bulunabilir.

Bu çalışmada, rat mandibular distraksiyon modeli kullanılarak aktivasyon periyodu sonunda distraksiyon alanına uygulanacak olan mezenşimal ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücrelerin, oluşan yeni kemiğin mineralizasyonunu hızlandırıp hızlandırmayacağı ve bunların karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Tarihçe

Kemik dokusu kendisini yenileyebilen, yeniden şekillendirilebilen kısaca dinamik bir denge içerisinde yaşayan bir dokudur. Wolf ve Frost kemiğin basınç altında rezorpsiyon, gerilme altında apozisyon süreci gösterdiğini tanımlamışlardır (8). Yine Roux ve Meyer de streslerin kemik formasyonunda etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu görüşlerin ışığı altında distraksiyon osteogenezisi, çekme-gerilme basıncının biyomekanik kurallarını temel almıştır (9).

DO cerrahi tekniği, iskelet traksiyonu, kemik fiksasyonu ve osteotomi tekniklerindeki gelişmelerin açık bir sonucudur. Hipokrat M.Ö. 325 yılında kırılmış kemik segmentlerinin mekanik manüplasyonunu tanımlamıştır. 14. yy'da Guy de Chauliac yer değiştirmiş kırıkların redüksiyonu için devamlı traksiyonu ilk tanımlayıp uygulayandır. Osteotomi konsepti 19. yy'da oluşturulmuştur. Malgaigne 1847'de yerdeğiştirmiş patellar kırıkların tedavisinde eksternal fiksasyon kullanım konseptini tanımlamıştır. Bir vidanın sıkıştırılması ile birlikte ilerletilebilen, birleştirilmiş kancalar ile eksternal bir gövdenin oluşturduğu bir aleti kullanmıştır.

DO, gerilme-çekme kuvvetleri aracılığı ile aşamalı olarak birbirinden uzaklaştırılan kemik segment yüzeyleri arasında yeni kemik formasyonunun olduğu biyolojik bir süreçtir. İskeletsel deformitelerin rekonstrüksiyonunda kullanılan bu cerrahi yöntem, yumuşak dokunun ve kemik hacminin de stimule edilerek genişletilmesi ile sonuçlanan, cerrahi olarak oluşturulmuş fraktürlerin aşamalı ve kontrollü olarak yer değiştirmesi şeklinde de tanımlanmaktadır. DO, cerrahi yöntemlerle birbirinden ayrılmış kemik segmentleri arasında oluşan kallus dokusuna çekme-gerilme kuvvetlerinin

uygulanması ile başlatılır. Çekme kuvvetlerinin yarattığı gerilimle, distraksiyon yönüne paralel bir şekilde yeni kemik dokusu şekillenmesi uyarılmaktadır. Kraniofasyal bölgede yapılan distraksiyon osteogenezis köken ve gelişimini, iskeletsel fiksasyon, kraniofasyal osteotomi ve dentofasyal traksiyon gibi yöntemlerinden almıştır. Tüm bu cerrahi teknikler ve geliştirilen modifikasyonlarda, özellikle ekstremitelere ait kemiklerdeki DO deneyimlerinden oldukça yararlanmıştır (8).

Codivilla 1905 yılında (10), ilk aşamalı distraksiyon girişimini femur kemiğinin uzatılmasında kullanmıştır. Daha sonra 1927'de Abbot (11), tibia kemiğinde distraksiyon osteogenezis benzeri bir uzatma işlemi uygulamış ancak bu yaklaşımı, yüksek komplikasyon insidansı nedeni ile klinik olarak kabul görmemiştir.

Wassmund alt çeneye ait ilk osteodistraksiyon tekniğinin 1927'de Rosenthal tarafından uygulandığını belirtmiştir. Ancak literatürde bilinen ilk alt çene uzatılması, 1937'de Kazanjian (12) tarafından uygulanmıştır. Kazanjian alt çenenin korpusuna uyguladığı modifiye-L-osteotomisini takiben hastaya kullandığı "over the face" cihazı aracılığı ile çene ucuna uyguladığı aşamalı çekme kuvveti ile işlemi gerçekleştirmiştir.

1948'de Crowford (13), tedavisinde gecikilmiş bir olguda mandibular simfizis bölgesinde, şekil ve fonksiyon bozukluğuna yol açan fraktürün yeniden düzenlenmesinde, aralıklı kuvvet uygulayan bir vida aracılığı ile bu bölgedeki patolojiyi tedavi etmiştir.

Kemik segmentlerine ve çevre yumuşak dokuya aşamalı traksiyon uygulayan ilk distraksiyon osteogenezis teknikleri hemen kabul görmemiştir. Bunun yerine korrektif osteotomiler, özellikle 1957'de Obwegeser (14) tarafından tanımlanan sagittal split ramus osteotomisinin (SSRO) kullanılmasından sonra, alt çeneye ait deformitelerin düzeltilmesinde SSRO temel bir tedavi modeli olarak kullanılmıştır.

Modern DO, 1950'li yıllardan itibaren Rus ortopedist Gavriel İlizarov'un yıllar süren çalışmalarıyla belirlenen prensipleri temel almıştır. İlizarov (15) "eksternal sirküler fiksator" ü geliştirerek, DO 'in biyolojik temellerini tanımlamış ve kullandığı düzeneği tüm dünyaya sunmuştur. İlizarov, fraktür olmayan kemiklerde yapay bir fraktür oluşturarak, aşamalı gerilim kuvvetleri aracılığı ile uzun kemiklerde uzatma işlemini gerçekleştirmiştir.

Daha sonraki yıllarda İlizarov tarafından tanımlanan bu konsept, maksillofasyal yöre cerrahisinde kullanım için bir takım modifikasyonlar ile adapte edilmiştir. Kraniofasyal bölgede iskelet yapısında DO prensiplerinin uygulandığı ilk çalışma, 1973 yılında Snyder ve arkadaşlarının (16) bir köpek mandibulası üzerindeki uygulamalarıdır. Bu deneyde, mandibulanın bir tarafından 1,5 cm kemik segment çıkarılması ile cerrahi kısaltma sağlanmış ve mandibular kemik 10 haftalık iyileşmeye bırakılmıştır. Bu işlem sonunda geniş bir çapraz ısırım oluşmuş, oluşan patolojiyi düzeltmek için eksternal fiksator yerleştirilerek bir osteotomi gerçekleştirilmiş, çapraz ısırım düzelene kadar eksternal fiksator yavaşça distrikte edilmiştir.

1977'de Michieli ve Miotti (17), Snyder'ın çalışmasını intraoral cihaz kullanarak bir basamak ileri götürmüşlerdir.

1982'de Panikorovsky ve arkadaşları (18) köpeklerde DO tekniği ile mandibula uzatmasını gerçekleştirerek, yeni gelişen kemik formasyonunun histomorfometrik sonuçlarını yayınlamışlardır.

Bu çalışmalar, New-York'ta Karp (19) ve arkadaşlarını teşvik etmiş, bu grup deneyleri tekrarlamış ve köpek modelinde DO'ü takip eden ossifikasyon sürecinin histolojik analizlerini detaylı olarak gerçekleştirmişlerdir. Sonunda bu laboratuvar çalışmaları, grubun 1989'da ilk insan mandibular distraksiyonunu gerçekleştirmesini sağlamıştır (20). 1992 ve 1994'de bununla ilgili küçük hasta serileri yayınlanmıştır. İlk defa başarı ile gerçekleştirilen, enfeksiyon ve komplikasyon olarak anlamlı bir risk taşımayan mandibular distraksiyon, klinik bir köşe taşıdır. Modern çağda klinik kraniyo-maksillofasyal distraksiyonda bu çalışmalar yol gösterici olmuştur. Ülkemizde

ise ilk deneysel ve klinik uygulamalar 1978 ve 1992 yılları arasında Dr. Cemal Aytemiz ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (21).

McCarthy, mandibula distraksiyon çalışmalarından sonra kraniyofasyal anomalilerde, orta yüz bölgesinde bu yöntemin kullanılabileceğini ortaya koydu. Köpek zigomatik arkına yaptığı iki adet osteotomi ile osteotomize segmenti distrakte etmiş ve uzun aksıyla açı yapışını, yine küçük köpeklerde osteotomi yapılmadan nazofrontal ve zigomatikomaksiller sütürlerin distrakte edilerek bilateral enoftalmus ve anterior çapraz ısırımın oluşumunu göstermiştir. Böylece orta yüz bölgesinde distraksiyon kullanımı başlamıştır. Yazar daha sonra Le Fort III osteotomiyi köpeklerde, endoskopik olarak, küçük insizyonlar ve inkomplet osteotomilerle gerçekleştirmiş. Uzun süreli postoperatif bakıma ve kan transfüzyon ihtiyacına gerek kalmayan, distraksiyon uygulamalarına dair bu çalışmalar, insanlarda morbiditeyi azaltıcı yeni çalışmalara ışık tutacak nitelikte olmuştur.

1992 yılında McCarthy, konjenital kraniyofasyal anomalisi olan 4 çocuk hastada DO'e ait olgu sunumunu rapor ederek, bu tekniğin insan üzerindeki ilk klinik uygulamalarını göstermiştir. Polley ve arkadaşları (22) 1995 yılında, ağız dışı sabit distraktörler kullanarak, damak-dudak yarıklı çocuklarda orta yüz bölgesinin distraksiyonunu başarı ile gerçekleştirmişlerdir. Yine aynı yıl, Cohen ve arkadaşları (23) orta yüz bölgesinin distraksiyonu amacı ile "Modüler İnternal Distraksiyon Sistemi" (MIDS)'ni kullanmışlardır. Bir yıl sonra Chin ve Toth (24) Le Fort III osteotomisi sonrasında, orta yüzü internal aygıtlar kullanarak öne almışlardır. Molina ve arkadaşları (25) 1999 yılında, hemifasyal mikrozomili hastalarda alt ve üst çeneyi aynı anda öne ve aşağıya hareket ettirebilen ağız dışı bir distraktör kullanmışlardır.

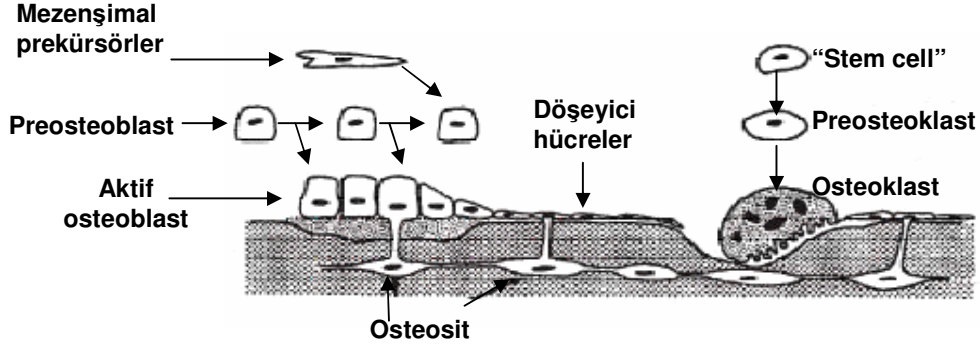
Başlangıç çalışmalarında osteotomi sırasında, intramedüller kan akımının korunmasının, DO başarısında, temel etkenlerden biri olduğu düşünüldü. De Bastiani, kortikotomiye takiben, 14 günlük latent dönem uygulamış, ardından distraksiyona başlamış ve çalışma sonuçlarına göre intramedüller kan desteğinin, kemik rejenerasyonunda şart olmadığını iddia etmiştir (26). McCarthy mandibular parçaların komplet ayırımının distraksiyon prosedürünün güvenliği için şart olduğunu belirtmiştir. Ortiz Monasterio ve Molina 106 hasta içeren serilerinde internal kortikal tabakayı intakt bırakan, kansellöz kemiğe kadar yapılan kortikotomi ile, 5. günden itibaren 1 mm/gün dereceli uzatma uygulamışlardır (27).

Günümüze kadar kraniyofasial iskeletin değişik komponentlerinde başarılı distraksiyon gerçekleştirilmiştir. Distraksiyon için uygun vakalar, kraniyofasial mikrozomiler, Nager sendromu, Pierre Robin sendromu, temporomandibular eklem ankilozu, postravmatik gelişim bozuklukları, tümör eksizyonu sonrası orta yüz hipoplazileri (maksiller yetersizlikler, kraniyofasial dizostozis), zigomatik yetersizlik (Treacher-Collins Sendromu), kraniumun gelişim bozuklukları (kraniyofasial sinostozis) ve edentüloz maksillo-mandibular patolojiler sayılabilir.

2.2.Kemik İyileşmesi

Kemik, diğer dokulardan farklı olarak, neredeyse orjinal dokuya tamamen benzeyen bir doku ile iyileşir. Kırık iyileşmesi esnasında, fibröz dokunun kırıldık dokuya ve onunda kemik dokuya dönüşmesi söz konusu olabilmektedir. Yetişkinde her yıl iskeletin %5-10'u yeniden yapılır. Osteoblastlar ve osteoklastlar bir koordinasyon halinde işlev görürler. Kemiği oluşturan hücreler osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositlerdir. Kemik iliğinin stromal hücreleri, direkt olarak osteojenik dokuyu oluşturur ve osteojenik öncü hücreler olarak adlandırılırlar. Osteoprogenitör hücreler, pluripotent mezanşimal hücreler olup, kemik yüzeyleri çevresinde

yerleşirler. Stromal kökenli bu mezenşimal hücreler, kemiğin fizyolojik gelişiminde aktif olmayıp, büyüme, rejenerasyon veya onarım durumlarında aktive olurlar. Uyarıcı faktörlerin varlığında bölünme ve osteoblasta farklılaşma yeteneğine sahiptirler. “Uyarılabilir osteojenik hücre” olarak adlandırılırlar (Şekil 1).



Şekil 1. Kemikte hücre döngüsü

Brighton (1984) ve Frost (1989) kırık iyileşmesini 6 evre olarak tanımlamışlardır:

- 1- Etki: Stresin meydana gelmesi ve enerjinin absorpsiyonu ile kırık oluşması evresidir.
- 2- Osteoindüksiyon: Onarım süreci için gerekli olan hücrelerin modülasyonunu sağlar. Osteoindüktif ajanlar, hücre yıkım ürünleri, oksijen gradiyenti, elektrik potansiyel (elektronegativite - elektropozitivite), sitokinler, büyüme faktörleri ve kollojen olmayan proteinler olarak sıralanabilir.
- 3- İnflamasyon Evresi: Cerrahi olarak kemik segmentlerinin ikiye ayrılması ile bir grup inflamatuvar olay başlar. İlk olarak damarların yırtılması ile kemik segmentlerinin arasında ve çevresinde hematoma oluşur. Hematom pıhtıya dönüşür ve kemik uçlarında

rezorbsiyon başlar. Bu yapının içine kan akımının restorasyonu için damar şekillendirici faktörler ile kapiller büyüme olur. Bu süreç 1-3 gün sürer. Pıhtının yerini, zamanla kapiller, kollojen, fibroblast ve inflamatuvar hücrelerden oluşan granülasyon dokusu alır.

- 4- Yumuşak Kallus Evresi: İnflamasyon periyodunu izleyen bu dönem yaklaşık 3 hafta sürer ve kallus içine kapillerin büyümesi devam eder. Fraktürden sonraki 5. günde büyüyen kapiller, fraktür hattına bitişik alanlarda distal ve proksimal segmentin medullar kanalı içinde şekillenir. Yumuşak kallus evresinde fibroblastlar ile granülasyon dokusu fibröz dokuya dönüşür. Kartilaj da granülasyon dokusunun yerini alır. Bu olay daha çok intersegmenter "gap" in periferinde meydana gelir. Distraksiyon gap alanında ise genellikle membranöz kemik iyileşmesi oluşur. Yani kartilajinöz ara faz atlanarak direkt kemik oluşur (8).
- 5- Sert Kallus Evresi: Normal kırık iyileşmesi sırasında yumuşak kallusun fibrokartilajinöz dokusu osteoblastlar ile kemik ağından oluşan sert kallusa çevrilir. İntrakartilajinöz kemikleşmede kapillerin ilerlemesi gibi kartilaj kalsifiye olur, kalsifiye kartilaj matriks üzerinde osteoblastlar yeni kemiği şekillendirir. Birçok fraktür için sert kallus devresi 3-4 ay sürer ve bunu yeniden şekillenme (*remodeling*) evresi izler.
- 6- Yeniden Şekillenme Evresi: "Fiber" yapıdaki kemik yavaşça lameller kemiğe dönüşür ve medüller kanal onarılır. Medüller kanalın onarımının sona ermesi ile kemik tamamen normale döndüğünde yeniden şekillenme tamamlanmış olur. Yeniden şekillenme evresi yıllarca sürer.

Distraksiyon osteogenezis sırasında normal kemik iyileşmesi süreci duraksatılarak yumuşak kallusa dereceli çekme uygulanır. Yumuşak kallusun intersegmental dokusuna uygulanan gerilim stresleri dinamik bir mikroçevre oluşturur. Gerilim stresleri "selüler" ve "subselüler" düzeyde dokularda

stimüle edici değişikliklere neden olur. Bu değişiklikler büyümeyi stimüle edici ve şekillendirme etkisi şeklindedir.

Büyüme stimüle edici etki, intersegmenter konnektif dokunun biyolojik elementleri gerilim ile aktive olur. Doku oksijenizasyonundaki artma ile anjiogenezis uzar, biyosentetik aktivitenin artması ile artmış fibroblast proliferasyonu olur. Şekillendirme etkisi ile gerilim fibroblastların fenotipinde değişiklik yapar. Bu fibroblast benzeri hücreler, ara filamentlerinin hipertrofik görünümü ile karakterlidir. Fibroblastlar ve sekrete ettikleri kollojen distraksiyon vektörüne paralel şekillenir (Şekil 2).



Şekil 2. Solda normal sağda distraksiyon yönüne paralel uzanım gösteren fibroblast görünümü.

Kırık iyileşmesinin düzenlenmesinde, hücrelerden salınan faktörlerin yanı sıra, elektriksel olaylar ve mekanik mikroçevre de önemli rol oynamaktadır. İnflamasyon evresinde kemiğin dış yüzeyi, kırık hattı üzerinde en yüksek değere ulaşan elektronegatiflik gösterir, bu durum kırık iyileşene kadar devam eder. Kemik, kas aktivitesi veya vücut ağırlığı ile oluşan strese

maruz kaldığında meydana gelen piezo-elektrik akımlarının etkisiyle konveks yüzde elektropozitivite, konkav yüzde ise elektronegativite oluşmaktadır. Frost'a göre pozitif elektrik akımı olan yerde osteoklast artışı olur ve rezorbsiyon gelişir. Elektronegatif bölgelerde osteoblastik aktivite artmaktadır. Osteoblastlar, kemik mikroçevrede hem intraselüler hem de ekstraselüler, kalsiyum ve fosfat iyon konsantrasyonlarını düzenlerler. Osteoblastlar, paratiroid hormonu, D vitamini, östrojen, sitokinler ve büyüme faktörleri için reseptöre sahiptirler. Osteoklastlarda bu reseptörler yoktur. Uyarılan osteoblastlar, osteoklastları aktive eden bir mediatör salgırlar. Böylece kemik yapımı ve yıkımı arasında denge sağlanır. Bu olaya "*coupling*" adı verilir. Kemik volümünün regülasyonunda esas iki mekanizma kalsiyum ve fosfat regüle eden hormonlar ile lokal regülasyondur. Kemik hücreleri tarafından yapılan birçok lokal büyüme faktörleri ve sitokinlerin ekstraselüler olarak kemik matriksinde depolandığı gösterilmiştir.

Büyüme faktörlerinin mitojenik, diferansiyasyon yapıcı, kemotaktik ve osteolitik özellikleri vardır. Hulth (28) kırığa cevap olarak "Bone morfojenik protein" in kortikal kemik ucundan salgılandığını göstermiştir. Mezenşimal hücrelerin, osteoprogenitör hücrelere diferansiyasyonu, BMP olarak bilinen osteoindüktif proteinlerle tetiklenirken, osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonu diğer büyüme faktörlerinin etkisi altında olmaktadır.

2.3. Distraksiyon Osteogonezis

DO tekniği, kemik biyolojisinin en gizemli fenomenlerinden birisidir. İskeletsel segmentte devamlılık bozularak, "fraktür iyileşmesi" olarak bilinen yeni kemiğin kallus formasyonun aşamalı olarak gerilmesi bu sürecin başlaması için yeterlidir. Fraktür bölgesinde gerçekleşen doku farklılaşması ve kallus formasyonu, aşamalı traksiyon kuvvetlerinin etkisi altında replase olmakta ve intersellüler matrikste ilgili doku tiplerine dönüşmektedirler. Bu mekanik koşulların doğası ve rejenere kemik formasyonunun dinamikleri,

iskelet sisteminin herhangi bir bölümündeki doku bulguları ile benzerlik gösterir (5, 29, 30).

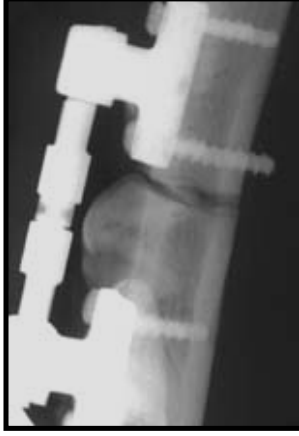
2.3.1.Distraksiyon Osteogenezisinde Protokol

DO tekniği şu temel aşamalarda gerçekleşmektedir:

a) Kortikotomi yada osteotomi: Kısaca kemiğin anatomik devamlılığı bozularak iki segmente ayrılması demektir. Osteotomi esnasında periosteal ve endosteal vaskülarizasyonu içeren osteojenik dokular maksimum bir şekilde korunmalı yani minimum travma ile osteotomi gerçekleştirilmelidir (29-32). İlizarov (33), periost, nutrisyonel arterler ve kemik iliğinin, yeni kemik oluşumu ve formasyonunda birbirine yakın derecede önemli olduğunu belirtmiştir. Bu teknikte tedavi için seçilen düzenek, osteotomi sonrasında ilgili bölgeye yerleştirilmektedir. Daha sonra latent periyoda geçilir.

b) Latent periyod: Kemik fragmanlarının birbirinden ayrılması yani osteotominin yapılması ile distraksiyon kuvvetlerinin uygulamasının başlangıcı arasında geçen süreçtir. Başka bir deyişle, cerrahi işlemin uygulamasından sonra başlayıp distraksiyon kuvvetleri uygulanana kadar geçen süredir (şekil 3). Osteotomi sonrasında fragmanlar arasındaki bölgede fibrovasküler bir köprünün yani fraktür kallusunun oluşumuna izin vermek amacı ile ayrılmış olan kemik segmentleri nötral pozisyonlarında bekletilir (8, 30, 32, 34,35).

Latent periyodun süreci yaşa ve osteotomi esnasında oluşan cerrahi travmaya bağlı olarak 2-14 gün arasında değişmektedir. Minimum cerrahi travmanın söz konusu olduğu ya da geç hastalarda 2-6 gün, orta cerrahi travma ya da erişkin hastalarda ise 7-14 günlük bir latent periyod ideal olarak kabul edilmektedir (8).



Şekil 3. Latet periyod (8).

c)Distraksiyon (Aktivasyon) periyodu: Aşamalı traksiyon kuvvetlerinin uygulanmaya başlanması ile distraksiyon rejenerasyonunun şekillenmesi arasında geçen süredir (Şekil 4). Latent periyodda oluşan kallusa, aşamalı olarak artan gerilim kuvvetleri olarak uygulanmaktadır. Distraksiyon periyodunun iki önemli komponenti vardır (5, 34, 35).



Şekil 4. Distraksiyon periyodu (8)

1- Distraksiyon hızı: Burada söz konusu olan günlük total distraksiyon hızıdır. Yapılan çalışmalara göre:

✓Günde 0.5 mm'den az olan hızlarda => prematür ossifikasyon,

✓Günde 1.5 mm'den fazla olan hızlarda => rejenerasyon bölgesinde lokal iskemi ve psödoartrozis yada ossifikasyonda gecikme meydana geldiği gösterilmiştir (8, 36-38).

İlizarov (38), günlük distraksiyon hızının optimal 1 mm olması gerektiğini belirtmiştir.

2- Distraksiyon ritmi: Bir gün içinde aşamalı olarak uygulanan distraksiyon kuvvetlerinin sayısıdır. Gün içinde 0.25x4 ya da 0.5x2 ritminde distraksiyon yapılmasıyla oluşan rejenera kemiğin büyük ölçüde orijinal kemik dokusuna benzediği İlizarov (38) tarafından gösterilmiştir.

d)Konsolidasyon periyodu: Aktif distraksiyon süreci tamamlandıktan sonra yeni şekillenen kemiğin mineralizasyon, yeniden şekillenme ve matürasyon evrelerini tamamlaması amacı ile distraksiyon düzeneğinin pasif olarak bekletildiği süre kastedilmektedir (8, 30,32, 34, 35, 39) (Şekil 5).



Şekil 5. Konsolidasyon periyodu (8)

Ortalama 4-6 haftalık bir zaman periyodu olup yaş ve lokalizasyona bağlı olarak değişkenlik gösterdiği, bu periyodun sonlanmasına karar vermede en iyi belirtecin "radyografik kortikal görüntü" olduğu Ilizarov (38) tarafından vurgulanmıştır.

2.3.2.Biyolojik ve Biyomekanik Parametreler

Ilizarov (38) özellikle kemik boyu uzatmaları ile ilgili klinik deneyimlerini temel alan ve " *Ilizarov Effects*" olarak adlandırılan distraksiyon osteogenezis tekniğine ait biyolojik prensipleri ikiye ayırmıştır:

1- Dokuların matürasyonu ve oluşumu esnasındaki çekme geriliminin etkisi: Ilizarov'un ilk prensibinin şartı, yaşayan dokuları stimüle ederek, rejenerasyon elde edilmesini sağlayabilecek aşamalı bir traksiyon oluşturmaktır. Böylece yeni şekillenen immatür kemik, doğal yapısına hızla remodele olmaktadır.

2- Vaskülarizasyon ve eklem yapısının anatomik formu ile bağlantılı olarak kemiğin bağımlı olduğu fonksiyonel yüklenmenin etkisi: Bu prensip, eklem ve kemiklerin hacim ve şeklinin, mekanik yüklenme ve vaskülarizasyon arasındaki karşılıklı etkiye (*interaction*) bağlı olduğunu savunmaktadır. Eğer vaskülarizasyon normal ya da artmış mekanik yüklenmeyi desteklemekte yetersiz kalıyorsa, kemik dokusu uygun cevabı veremeyeceği için kemikte atrofik ya da dejeneratif değişiklikler meydana gelebilir. Buna karşılık vaskülarizasyon, artmış mekanik yüklenmeyi desteklemekte yeterli ise kemik, kompanse edici hipertrofik değişiklikler gösterecektir.

Günümüzde distraksiyon osteogenezis tekniğinin başarıyla uygulanabilmesinin şu iki parametreye bağlı olduğu düşünülmektedir:

1- Biyolojik parametreler: Bir takım faktörleri kapsar:

- a) Osteojenik dokuların maksimum bir şekilde korunarak, osteotomi boyunca vaskülarizasyonun elde edilmesi,
- b) Latent periyodun yeterli olması,
- c) Optimal bir distraksiyon hızı ve ritmi,
- d) Fonksiyonel yüklenme öncesinde yeni şekillenen kemiğin yeniden şekillenmesi için yeterli bir konsolidasyon süresidir (30, 36, 40).

2- Biyomekanik parametreler: Üç ana bölümde incelenmektedir:

a) Ekstresek yada düzenek ile ilgili parametrelerdir. Bunlar; düzeneğin materyal donanımını, rijiditesini, fiksasyon pinlerinin çaplarını, uzunluğunu ve sayısını kapsamaktadır. Kemik fiksasyonunun stabilitesini ve distraksiyon düzeneğinin mekanik yapısını ilgilendirmektedir.

Osteotomi uygulanan kemik segmentlerinin stabil fiksasyonu başarılı distraksiyon için kritik bir faktördür. Rijit eksternal fiksasyonun 10. haftasında kartilajinöz bir ara dönem olmadan yeni kemik oluşumunun tamamlanması, iyi rejenere olan kemik formasyonu ile ilişkilidir. Bununla birlikte stabilitesi iyi yapılmamış bir distraktörün, arada kartilajinöz şekillenmeye neden olarak kemik "*remodeling*"inde anlamlı bir gecikmeye neden olacağı gösterilmiştir. Stabil olmayan aletle distraksiyon, psödoartrozis ve fibröz birleşmeye neden olacağı için anlamsızdır.

Stabil fiksasyonun rejenere olan kemik şekillenmesindeki etkisi multifaktöriyeldir. Stabil fiksasyon, fraktür, hematoma, granülasyon dokusu, yeni şekillenen kapiller ve kemik mikrokolumnalarında tekrarlayan travmaları önler, anjiyogenezis ve kallus şekillenmesinde artma ile sonuçlanır.

Distraksiyon rejenerasyonunda yüklenmenin artması ile stabil fiksasyon, osteogeneziste artmaya neden olabilir. Sonuç olarak, stabil kırık kemik segmentlerindeki yüklenmeye sekonder küçük hareketler, hücresel proliferasyon ve protein sentezinde artma, ekstraselüler matriks kompozisyonunda değişiklikler, kemik şekillenme için uygun bir mikroçevre ile sonuçlanır.

b) İntrensek ya da doku ile ilgili parametrelerdir. Bunlar; distrikte edilmiş kemiğin dansitesini, enine kesit alanını, geometrik şeklini, distraksiyon rejenerasyonunun miktarı ve uzunluğunu, kas, fasya ve yumuşak doku gerilimini kapsamaktadır.

c) Distraksiyon düzeneğinin ilgili bölgeye adaptasyonu ve distraksiyon yönüdür. Bu yön, distrikte edilecek kemik segmentlerinin anatomik aksı ile ilişkilidir (30, 32, 33, 40-44).

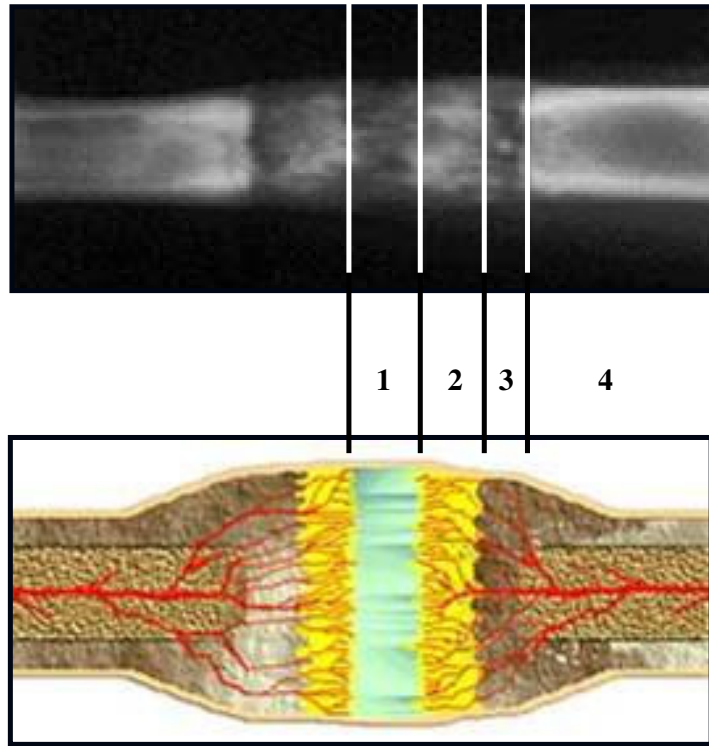
Distraksiyon vektörünün iyi belirlenerek, düzeneklerin buna göre yerleştirilmesi, distraksiyonun başarısında olduğu kadar, komplikasyon görülme insidansını azaltmada da önemlidir. Distraksiyon vektörünün belirlenmesi anatomik yöreye göre farklılıklar göstermektedir.

2.3.3.Histomorfoloji ve Çevre Yumuşak Dokulardaki Etkisi

a)Kemik Dokusunun Yanıtı: DO'de gerçekleşen yeni kemik formasyonunun histomorfolojik dinamikleri üzerinde yapılan çalışmalar distraksiyon alanının 4 temel bölgede incelenebileceğini ortaya koymuştur (Şekil 6):

1- Distraksiyon bölgesinin merkezinde, distraksiyon yönüne paralel olarak sıralanmış kapiller damarlar ve kollojen fibrillerle birlikte fibröz

dokudan oluşan "merkezi (santral) bölge" (Şeki 6). Distraksiyon kuvvetlerinin etkisi altında, büyüme bölgesindeki fibroblast benzeri hücreler, distraksiyon yönüne paralel olarak dizilir ve kollojen fibrilleri sentezler. Daha sonra bu hücreler osteoblastlara farklılaşarak osteoid dokuyu oluşturur. Distraksiyon bölgesindeki aktif osteogenezis, gerilimin etkisi altında devam eder ve bu süreç, encondral ossifikasyonda karakteristik olan kartilajinöz fazı atlayarak gerçekleşir. Distraksiyon sonrasında ve konsolidasyon periyodu boyunca "merkezi fibröz bölge" aşamalı olarak ossifiye olur (19, 29, 33, 39).



Şekil 6. Distraksiyon osteogenezisin radyolojik ve şematik görünümü: 1. Merkezi fibröz bölge. 2. Minerallizasyon (geçiş) bölgesi. 3. Remodeling bölgesi. 4. "Matür" kemik bölgesi.

2- Ana kemik fragmanlarından köken alarak merkezi fibröz bölgeye (santral zon) doğru ilerleyen, trabeküler yapı ile uyumlu olarak distraksiyon

vektörüne paralel şekilde uzanan yeni şekillenen kemiğin yer aldığı mineralizasyon gösteren geçiş bölgesi (Şekil 6).

3- Kemiğin yeniden şekillendiği (*remodeling*) bölgesi (Şekil 6).

4- Matür kemik bölgesi, (8, 21) (Şekil 6).

Konsolidasyon periyodunun farklı aşamalarında gözlenen kemik dokusu değişiklikleri ile ilgili yapılan araştırmalarda, mineral apozisyonunun konsolidasyon periyodunun 4. haftasına kadar aşamalı olarak artış göstermesine karşın daha sonra stabil kaldığı, trabeküler kemik yapının ise progresif bir şekilde zamana bağlı bir artış gösterdiği vurgulanmıştır (8).

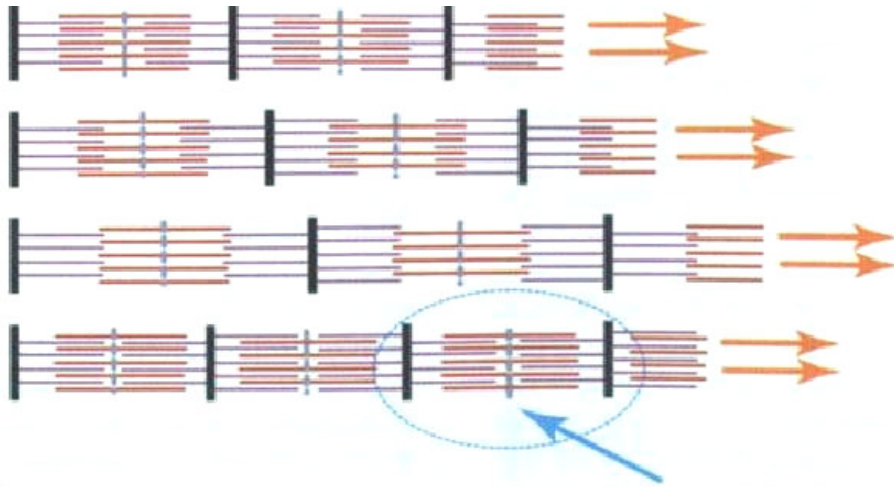
Kemiğe uygulanan distraksiyon kuvvetleri aynı zamanda çevre yumuşak dokularda da bir gerilim oluşturarak, "distraksiyon histogenezis" olarak adlandırılan adaptif değişiklikler zincirini başlatır. Aşamalı traksiyon kuvvetleri ile meydana getirilen gerilim streslerinin etkisi altında periferik sinirler, kan damarları, kartilaj, kas, fasya, cilt ve gingivayı içeren komşu dokularda da aktif histogenezis oluşmaktadır (29, 33, 38, 46).

DO tekniğini sınırlayan faktörler, kemikten çok çevre yumuşak doku ile ilgilidir. Yumuşak dokular içinde sınırlayıcı en kritik faktör kemiğe direkt bir şekilde tutunan kaslardır. Kan damarları, sinirler ve cilt kemiğe indirekt olarak yapışmakta, DO tekniğine daha büyük oranda adaptasyon kapasitesi göstermektedirler (33, 46).

b) Kas Dokusunun Yanıtı: Uzun kemiklerde yapılan çalışmalar, kemiğe yapışan kaslarda distraksiyon osteogenezis tekniğine adaptasyonun kas hücrelerinde hiperplazi ve hipertrofi şeklinde olduğunu göstermiştir (47).

Distraksiyon periyodu boyunca osteotomi bölgesindeki kasın uzaması yani adaptasyonu kolayca olmamaktadır. Çünkü kasta oluşan gerilim sadece osteotomi bölgesinde sınırlı kalmamakta ve tüm kas kütlesi gerilim streslerini

paylaşmaktadır (46). Kasın gerilmesi, stabil aktin ve myozin flamanlarını ayırmakta ve bu elemanların aktif olarak sentezlenmesine neden olmaktadır. Bu çapraz köprüler, gerilim kuvvetleri arasında yeterli süre uygulandığında yeniden oluşmaktadır. Kas lifleri kronik gerilime, muskulotendinöz birleşim bölgesinde sarkomer ekleyerek yanıt vermektedirler (Şekil 7). Ancak DO tekniğinin uygulanması süresince miyofibrillerin çaplarında anlamlı bir değişiklik olmamaktadır. Kas yapılarının anatomik yerleşimleri nedeni ile DO'nin başlangıcında yada daha sonraki evrelerde, farklı sürelerde olmak üzere kas liflerinde öncelikle bir atrofi izlenmektedir. Daha sonra kas fibrilleri, distraksiyon yönüne uyumlu bir şekilde kompanze edici rejenerasyon ve hipertrofi sürecine girmektedirler. (47).



Şekil 7. Kas dokusunun gerilmiş kas fibrillerine yeni sarkomerler ekleyerek osteodistraksiyona gösterdiği adaptasyon (8).

Kas kütlelerinin her iki ucu arasındaki uzaklık, distraksiyon osteogenezis periyodu boyunca uniform bir artış göstermektedir. Ancak kastaki uzama miktarı, kemik uzunluğundaki toplam artışın sadece %20'si kadardır. Bu durum, kasın üzerine gelen gerilme kuvvetlerini tüm kütlelerine dağıttığını ve bir bütün olarak uzadığını göstermektedir. Yani osteotomi alanına yapışan kas bölgesindeki lokal aşırı stres artışı geçici bir durum olarak nitelendirilmektedir (46).

Kas dokusunun biyokimyasal analizlerinde, DO sürecinde uzama gösteren kaslardaki total DNA miktarının değişmediği gözlenmiştir. Bu durum ise osteodistraksiyonun, miyositlerde hiperplaziden daha çok hipertrofik değişikliklere neden olduğu şeklinde açıklanmıştır. Ayrıca kas liflerinin DO periyodunun başlangıcında gösterdiği atrofik süreç ile RNA/DNA oranındaki azalma arasında bir korrelasyon olduğu ve bu bulgunun, mekanik streslerin protein sentezinde azalmaya neden olduğunu gösterdiği düşünölmektedir (47).

Gerilim etkisi ile kasların enerji depolama ve protein sentezi sistemlerinde yapısal değişiklikler gözlenmektedir. Distraksiyon ritmi 0.125x6 mm/gün olacak şekilde uygulanan distraksiyonun 14. gününde, enerji üreten mitokondriler hipertrofiye uğramakta ve birden fazla krista ile karakterize hacim büyümesi göstermektedir. Bu olay özellikle kas liflerinin ucunda ve subsarkolemmal bölgelerde görölmekte, bu bölgelerde aynı zamanda aktin ve myozin filamentleri sentezlenmektedir. Kas hücresi nükleusunda fonksiyonel aktivite artışı, hipertrofi ve karyolemmal invajinasyonlar gözlenmektedir. Distraksiyon kuvvetlerinin etkisi altındaki kas büyümesinin sadece kasın bir önceki halinde bulunan kas liflerinin myofibrilogenезisi sonucu değil, ayrıca kastaki satellit hücrelerinin artışı ile karakterize yeni kas dokusu oluşumu ile gerçekleştiği düşünölmektedir (Şekil-7).

Yeni oluşan kas lifleri içinde aktif olarak myofibriller ve sarkomerler meydana gelmektedir. Kaslardaki kan damarlarının duvarındaki düz kas dokusunun da gerilimin etkisi ile büyüdüğü, böylece distraksiyonun 7. günü sonunda subendotelyal alanlarda aktif düz kas hücrelerine rastlanıldığı belirtilmiştir.

Distraksiyonun 14. gününde aktif hücrelerin, adventisya dışında damarların orta tabakalarında da varlığı izlenmiştir. Bu hücrelerin kontraktil miyositlerden, gelişmiş mitokondrileri, ribozomları, endoplazmik retikulumları ve diğer sitoplazmik organelleri ile ayrıldığı belirtilmektedir. Benzer şekilde normal anterior duvar miyositlerinden, nükleuslarındaki hipertrofi ve

nükleusun içindeki ince şekilde dağılmış ve fonksiyonel olarak aktif olan ökromatin yolu ile ayrılmaktadırlar. Bu şiddetlenmiş biyosentetik aktivite artışına ve proliferasyona, aralarındaki intraselüler kontaktların artışı ve yeni elastik doku oluşumunun da eşlik ettiği belirtilmiştir. Hatta düz kas hücrelerinin her zamanki dairesel konfigürasyonunun, iç elastik membran yakınında oluşan hücresel formasyon nedeni ile longitudinal konfigürasyona dönüştüğü izlenmiştir. Arteriyal duvarın düz kas hücrelerinin ultrastrüktürel morfolojik değişikliklerinin, aktif pre-postnatal büyüme esnasında arterlerin duvarlarında görülen uzama sırasında saptanan değişimlere benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (33).

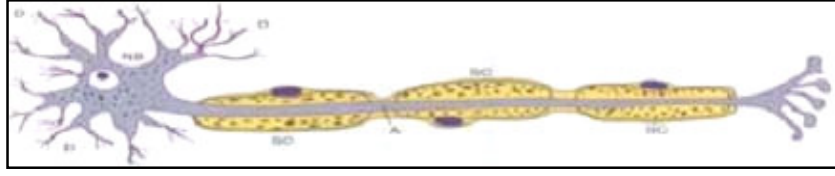
Açıklanan değişimler kas fasyasının bağ dokusunda, tendonlarda, dermiste, kasın endomisiyum ve perimisiyumunda olduğu gibi gerçekleşmektedir. Ayrıca bu değişimlerin kan damarlarının adventisyasında ve sinir dallarının epinörüm ve perinörüyumunda da gözlemlendiği belirtilmiştir. Kollojen fibrillerin genellikle gerilimin vektörü boyunca uzanım gösterdiği, fibroblastların sitoplazmik organelleri ve mitokondrilerinin buna uyumlu olarak düzenlendiği izlenmektedir. Yine aynı şekilde distraksiyon süresince fibroblast sayısı artmış, birbirleri arasındaki kontakt bölgeleri artmış ve pek çok yerde hücresel birleşimler göstermişlerdir. Fibroblastların yoğun intraselüler birleşimleri embriyo, fetüs ve yeni doğan hayvanların gelişen bağ dokularında da tipik bir özelliktir.

Distraksiyon alanındaki fibroblastların diğer bir tipik özelliği, golgi kompleksinin hipertrofisidir. Golgi kompleksi de mitokondriler, sitoiskeletsel mikrofilamentler ve granüler endoplazmik retikulum gibi büyümektedir. Fibroblastlar içinde bulunan mikrofibriller biyosentetik ürünler, geniş vakuoller içinde veya granüler endoplazmik retikulumun sisternası içinde lokalize olurlar. Bazı bölgelerde ise mikrofibriller direkt olarak hücre dışı sıvıya geçmişlerdir. Bu durum mikrofibrillerin golgi kompleksini by-pass ettiklerini ve aşırı miktarda kollojen ve elastik fibril prekürsör salınımı olduğunu göstermektedir. Hatta gerilim vektörüne paralel olarak oluşan fibroblast oryantasyonu, yeni oluşan kollojen fibrillerin pozisyonunda da belirleyici rol

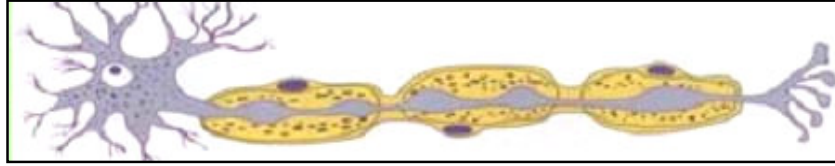
oyunmaktadır. Bu durum bağ dokudaki mikrosirkulasyonu sağlayan kan damarlarının dizilimini de etkilemektedir (33).

c)Sinir Dokusunun Yanıtı: Gerilim altında uzatma ile sinir dokusunda reaktif değişiklikler olur. DO ritmi ve hızı, sinir dokusunda oluşacak değişikliklerde önemli rol oynamaktadır. Gün içinde yapılacak distraksiyon miktarlarının bölünmesi ile aksonlarda minimal değişikliklerin meydana geldiği ve farklı diferansiyasyon evrelerinde yeni sinir liflerinin oluştuğu gözlenmiştir (8,48).

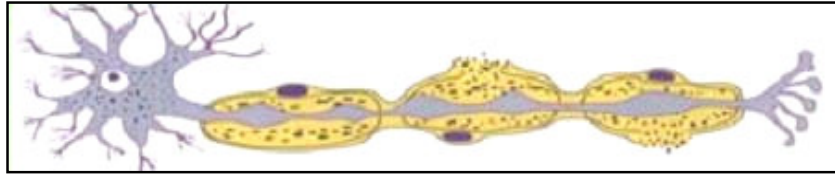
Stres ve gerilim ilişkisi değerlendirilerek, başlangıçta yük ve uzama arasında doğrusal bir ilişkinin olduğu belirtilmiştir. Sinir dokusunun gerilime izin veren elastik özelliği ve sinir liflerinin dalgalı şeklinin, doku içinde yeniden yapılanması bu özelliği gerçekleştirir. Periferal sinir yapılarının elastik olmasına ve %20 oranında uzayabilme yeteneğine sahip olmasına rağmen bu durum, kişiye ve sinir dokusuna göre farklılıklar göstermektedir. Sinir liflerinin aşırı uzatılması epinöral damarların yırtılarak kan akımının azalmasına ve ödeme yol açmaktadır. Ödem ilerleyerek fibröz skarların oluşmasına ve endonöral yapıların kaybolmasına neden olmaktadır (Şekil 8).



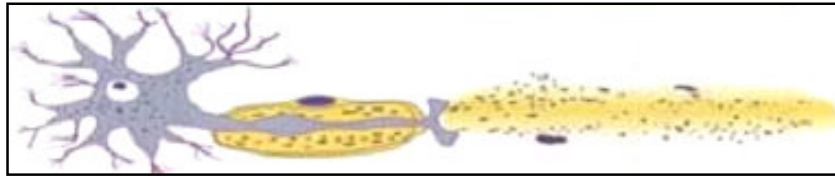
Normal sinir dokusu



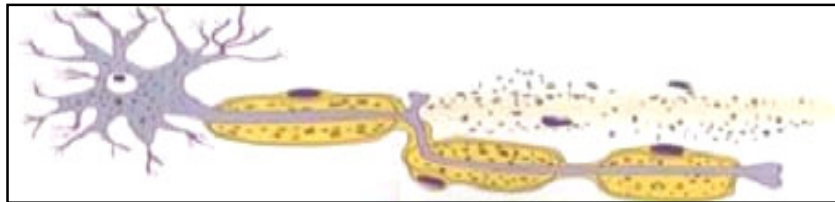
Myelin yapıda değişiklik (% 10-15 uzama)



Myelin yapıda yırtılma (% 20-25 uzama)



Myelin Dejenerasyon (% 30-50 uzama)



Myelin rejenerasyon (Konsolidasyon dönemi)

Şekil 8. Distraksiyonun sinir dokusuna etkisi

Böylece sinir dokusunun sahip olduğu elastisite kapasitesi uygulanan yükü kaldıramaz bir duruma gelmektedir. Sinir lifi demeti içindeki diğer lifler gerilmeye karşı koyarken, zarar gören bölgedeki lifler kopmakta ve çevrelerindeki myelin kılıfını dejenerasyona uğratmaktadır (8,48). Yapılan histolojik çalışmalarda sinir dokusuna %11'den fazla uygulanan uzatma işlemlerinde ciddi sinir hasarının olduğu bildirilmiştir (8).

Distraksiyon hızı, sinir dokusunda oluşacak morfolojik değişikliklerde önemli rol oynar. Myelinize sinirlerin uzaması sırasında *schwann* hücreleri, embriyonik formlarındaki haline geri dönmüş olarak görünür.

Sunderland ve Bradley stress-gerilim fenomenini sinir dokusunda çalışmışlar ve başlangıçta yük ve uzama arasında lineer bir ilişki olduğunu göstermişlerdir. Sinirin gerilime izin veren elastik özelliği ve sinir liflerinin dalgalı seyrinin, doku içerisinde yeniden yapılanması bu özelliği sağlar. Gerilim artınca, perinöral dokudan önce, fasikül içindeki sinir lifleri kopar. Perinöriumun direnci kollajen liflerinden dolayıdır. Sinirin çapı azalır, intrafasiküler basınç artar, mikrosirkülasyon bozulur, hasar sadece yırtık görülen bölgeye sınırlı kalmaz. Sinir gerilimi uygulanan yükün hızıyla yakından ilişkilidir. Yavaş germe, sinirde belirgin fonksiyon kaybı yaratmadan uzunluğunu artırır.

Haftak (49), tavşan periferik sinirine artan şiddette uyguladığı yüke karşı, stress-gerilim ilişkisini göstermiştir. Başlangıçta aşamalı olarak artan gerilim, epinörium ve fasiküllerin uzamasını gösterir. Elastisite, uygulanan bu yükü bir noktada kaldırmaz. Yazar epinöriumun, fasiküllere yastık görevi yaptığını, ne kadar çok miktarda epinörium varsa sinirin strese o kadar dirençli olduğunu iddia etmiştir. Gerilim altında intranöral topografi değişir, besleyici damarların başlangıçtaki helezonik yapısı zamanla kaybolur.

d)Cilt Dokusunun Yanıtı: Cilde ait hücresel elemanlarda DO periyodu boyunca artmış bir aktivite izlenmektedir. Bazal tabaka hücrelerinde silindirik bir yapıya dönüşme ve mitoz söz konusudur. Ayrıca yağ ve ter bezi hücrelerinde artış saptanmıştır (8). Derinin hücresel elemanları genel anlamda epidermisin bazal seviyesinde, gerilim sonucunda aktivasyon belirtileri göstermektedirler. Distraksiyonun 21. gününde bazal hücreler, silindirik bir yapı kazanır ve uzun hiperkromatik nükleusları, uzun hücre aksı boyunca alt membrana dik olacak şekilde bir konum kazanmaktadır. Bazal tabaka hücrelerinde bir çok mitotik figür izlenmekte, bu proliferatif aktivite sonucunda bazal hücre tabakaları ve buna bağlı olarak derinin kalınlığı,

kontrol ekstremitelerindeki ölçümlere göre iki kat artış göstermektedir. Boyutları artmış olan bazal hücrelerdeki büyümenin, granüler, skuamöz ve korneöz olmak üzere belirgin alt gruplar şeklinde izlendiği, ayrıca deri eklerinde gerilim sonucunda aktivite artışı olduğu gözlenmiştir. Distraksiyonun 21. gününde kıl follikülleri, buna eşlik eden sebaceöz ve yağ bezleri önemli oranda bir artış göstermektedirler. Ayrıca deri eklerinden özellikle de sebaceöz bezlerin hipertrofiye uğradığı, distraksiyonun ilerleyen fazlarında kıl folliküllerinin çapraz kesit alanlarında bulunma sayısının artmaya devam ettiği, distrikte edilen ekstremitedeki folikül içinde bulunan kılların, kontrol grubuna oranla daha büyük çaplı olduğu gösterilmiştir.

e)Kan Damarlarının Adaptasyonu: Damarlar uzatmaya cevap olarak endotel hücrelerinin ve vasküler düz kas hücrelerinin sitoplazmik hacmini arttırarak ayak uydururlar. Eğer günde 2 mm'lik bir uzatma yapılacak olursa arteriyollerin hücre sel biyosentetik aktivitesi hasar görerek, negatif sellüler reaksiyon olur ve mikroskopik olarak çok sayıda sitoplazmik parçalanma gözlenir.

% 5-10 uzatmada arteriol ve kapillerdeki akım normalken, vendeki akım yavaşlar. Bu, düşük gerilim limitidir. Yüksek gerilim limitinde, % 11-18 uzatmada, bütün mikrosirkülasyon bozulur (33).

f)Dişeti Dokusunun Yanıtı: Distraksiyon boyunca doku bütünlüğünü sağlamak için dişeti dokusunda inflamatuvar reaksiyona benzer olaylar izlenmektedir. Ayrıca aşamalı traksiyon kuvvetlerinin stimüle edici etkileri nedeni ile organ boyundaki uzunluk artışına, yumuşak dokunun adaptasyonunu sağlamak amacı ile gelişen histogenezis gözlenir. Gerilme nedeni ile ılımlı atrofik reaktif değişiklikler gösteren gingival dokuda, normal anatomik yapıya erişmek için progresif bir restorasyon süreci meydana gelir. Distraksiyondan hemen sonra ve konsolidasyon periyodu başlangıcında interdental papillaların neredeyse tamamen kaybı, intersellüler ödem, hücre tabakalarında düzensiz dizilim ve epitel tabakada önemli bir oranda incelleme olduğu gözlenir. Lamina propriadaki kollojen fibriller ve kan damarları aynı

dönemde gelişmiştir. Konsolidasyon periyodunun ilerleyen dönemlerinde interdental papilla yüksekliğinde aşamalı bir artış, epitel hücre tabakasının yeniden düzenlenmesi, hücrelerin matürasyon ve diferansiyasyonu, lamina propriadaki kan damarları ve fibrillerin reorganizasyonu izlenir. Gingivada distraksiyon prosesine gelişen cevap inflamatuvar cevap ile aynıdır ancak gingival doku bütünlüğü bozulmamış olduğu için skar dokusu oluşmamaktadır. Distraksiyon boyunca gingival adaptasyon için değişik mekanizmaların gerçekleştiği düşünülmektedir. Öncelikle gingival dokular yüzey devamlılığını sağlarken öte yandan kemik de gerçekleşen uzunluk artışına gerilerek uyum sağlamaya çalışmaktadır. Epitel hücre tabakalarındaki süperfisyal keratinize hücreler, artmış uzunluğa adapte olmak için adeta çapraz bir şekilde kayarlar. Stratum granulosum ve spinosum hücreleri, gerilmenin yada intersellüler bağlantılarındaki geometrik reoryantasyonun bir sonucu olarak birbirinden uzaklaşmaya başlar. Bazal hücreler daha horizontal bir konum kazanır. Tüm bu olaylar oluşurken varolan hücre sayısı daha geniş bir alan üzerinde dağılım gösterir. Buna ek olarak lamina propriadaki kapillerde anlamlı bir proliferasyon izlenir (8).

g)Periodontal Ligamentin Yanıtı: DO boyunca, distraksiyon bölgesine komşu dişlerdeki periodontal ligamentte görülen pozisyonel değişiklikler, ortodontik diş hareketi boyunca oluşan değişikliklere benzemektedir. Aşamalı traksiyon kuvvetleri sonucunda gerilmiş olan periodontal ligamentteki fibriller kemik rezorpsiyonu, osteogenezis ve sementogenezis gibi adaptif aktiviteler göstererek, periodontal yapıların orijinal boyut ve uzunluğunu sağlamaya çalışır. Diş ve alveol kemiğine gerilme ve kompresyon kuvvetleri uygulandığında, periodontal ligamentteki spesifik hücre popülasyonları aktive olmakta ve kemik bu stresleri karşılayıncaya kadar geçen süreçte periodontal yapıları remodele etmektedir. Adaptif değişikliklerin sırası, kemik segmentleri veya dişleri etkileyen distraksiyon kuvvetlerinden etkilenmektedir. Diş destekli distraktörler kullanıldığında, periodontal ligamentteki gerilme hareketleri ve çevre dokulardaki elastisiteden dolayı distraksiyon kuvvetleri kemiğe tam olarak iletilemez. Bu da genel olarak dişsel hareketin, iskeletsel hareketten daha

fazla olmasına sebep olduğu için distraksiyon hızı ve süresinin planlanmasında göze alınması gerekmektedir. Kemik destekli distraktörler iskeletsel hareket oluşturmaya karşın komşu dişlerde *tipping* hareketine neden olmaktadır (8).

2.4.Distraksiyon Osteogenezisin Avantajları

Günümüzde DO tekniği ortopedistler, plastik cerrahlar ve kraniyo-maksillofasyal cerrahlar tarafından yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tekniğin uygulamaları gelecekte büyük bir umut sunmaktadır. Yeni tedavi alternatifleri oluşturması ve geleneksel ortognatik cerrahi yöntemlere olan üstünlükleri distraksiyon osteogenezis tekniğine bir takım avantajlar kazandırmaktadır. Bu avantajlar:

1- Kemik segmentleri ve onu çevreleyen yumuşak doku ekspansiyonu simültane olarak gerçekleşmektedir Bu teknik ile haftalar süren bir periyod içerisinde damar-sinir paketlerinin ve çevre yumuşak dokunun, distraksiyon osteogenezis tekniğine adaptasyonu söz konusudur. Oysa geleneksel ortognatik cerrahi yöntemlerle aynı büyüklükte bir repozisyon ani olarak gerçekleştirilmekte ve tek adımda yapılan cerrahi girişim, yeterli bir nöromüsküler adaptasyona izin vermeyerek, yumuşak dokuların zarar görmesine ve relapsa neden olmaktadır. DO tekniğinde relapsın minimal düzeyde olması nedeni ile daha stabil sonuçlar alınmaktadır (29, 30).

2- Bu teknikte, diğer cerrahi yöntemlere oranla, göreceli olarak hasta daha az doku hasarı ve travmaya uğramaktadır. Ayrıca operasyon zamanı kısaltılmıştır. Böylece hastanede kalma süresi kısaldığı için doğal olarak daha ekonomiktir (29).

3- Hastalar aktif yaşamlarına daha kısa sürede dönerler, çünkü iyileşme zamanı kısalmaktadır (5).

4- Erken yaşlarda uygulanabilmektedir (22, 29, 31).

5- Tekniğin uygulandığı kemik yapısının büyüme potansiyeli artırıldığı için, nöromüsküler fonksiyonlarda da bir iyileşme gözlenir (8).

6- Kraniyofasyal bölgede konjenital yada gelişimsel deformiteleri olan hastalarda, orta yüz gelişiminin elde edilmesine olanak sağlar (24, 52).

7- Alt ve üst çene gelişimini artırarak obstrüksiyona bağlı obstrüktif sleep apneli hastalarda, hava yolunu genişletmekte ve solunumla ilgili problemlerin azalmasını sağlamaktadır (31, 55).

8- DO tekniği ile alt çene ve üst çenede üç boyutlu uzatma yada genişletme işlemleri yapılarak, her iki çene birbiri ile uyumlu boyutlara getirilebilmekte, hastanın estetik ve fonksiyonel ihtiyaçları karşılanabilmektedir (20,21,27).

9- Bu teknik ile önceden tahmin edilebilen cerrahi sonuçlara ulaşmak mümkündür (8, 56).

10- Kemiğin doğal iyileşme süreci kullanılarak gerçekleşen DO tekniği ile fasyal kemikler, orjinal ebatlarının %30'una kadar uzatılıp genişletilebilmektedir (8).

2.5.Kök Hücre

Kök hücreler, son yıllarda tüm tıp camiasının en çok üzerinde durduğu ve her yıl yüzlerce yeni çalışmanın yapıldığı bir konu haline gelmiştir. Sunduğu veya sunacağı öne sürülen muhtemel tedavi olanakları düşünüldüğünde, halen tedavisi mümkün olmayan pek çok hastalığa çare olması beklenmektedir. Kök hücrelerin klinik kullanımı ile ilgili çalışmalar günümüzde daha çok onko-hematologlar tarafından yapılmaktadır ancak en faydalı olacağı alanlardan biri de Plastik Cerrahidir. Kök hücrelerin her türlü allojen doku (gerek karaciğer, böbrek, kalp gibi viseral organlar, gerekse yüz, el, kas, kemik vb. kompozit dokular) transplantasyonlarında, tolerans

oluşturmadaki rolleri, yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. Özellikle son yıllarda doku mühendisliğinde kök hücreler kullanılarak elde edilen başarılar Plastik Cerrahinin tedavi şemalarında ciddi değişiklikler olabileceğinin sinyallerini vermektedir.

2.5.1.Kök Hücre Tarihçesi

Tarih boyunca insanoğlunun en büyük hedeflerinden biri hastalıklara çare bulmak ve insan ömrünü uzatmak olmuştur. “Hasara uğramış bir organın fonksiyonlarını restore etmenin, onun yerine yenisini koymaktan daha iyi bir yolu var mıdır?” sorusu insanlık tarihi boyunca hep sorumuştur. Tarih boyunca transplantasyon düşüncesi bu soru üzerine yoğunlaşmış olup sfenksler, deniz kızları ve kantaronlar mitolojide birer zenotransplantasyon örneği olarak yerini almıştır. Mitolojide ateşi Olimpos Dağından, tanrılardan çalarak insanlığa hediye etmesi üzerine Zeus tarafından cezalandırılan Prometheus’un hikayesi de buna bir örnektir. Zeus tarafından Kafkas (Kaf) dağında bir kayaya bağlanarak karaciğerinin hergün bir kartal tarafından yenmesi şeklinde bir cezaya çarptırılan Prometheus’un karaciğeri hergün kendisini yenilemiştir. Bu, karaciğer hücrelerinin rejenerasyon yeteneğini ve dolayısı ile kök hücre kavramını ortaya koyan ilk hikayedir.

Çeşitli bitkilerden elde edilen iksirlerin binlerce yıl önce hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanıldığına ait bilgiler mevcuttur. MÖ 1534 yılına ait olduğu düşünülen bir papirüste çeşitli hastalıklardan ve tedavilerinden bahsedilmektedir. Eski Mısır anıt ve hiyerogliflerinde insanların hastalıklı organlarının değiştirilmesini gösteren şekiller vardır. MÖ 1700’lü yıllarda Babillilerin, bıçak kullanarak ameliyat yaptıklarına ait bilgiler bulunmaktadır. Organ nakillerinin o zamanlar gerçekte yapıp yapılmadığı bilinmese de insanoğlunun hastalıkları yenme ve yaşlanmanın önüne geçme çabaları ilk zamanlardan günümüze kadar sürmüştür. İnsanoğlunun belki de bilinç altındaki ölümsüzlüğe ulaşma isteği bugüne kadar tıp biliminin itici gücü olmuştur.

İlk olarak 1967 yılında tanımlanan embriyonel karsinoma hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması da bu alanda ileri doğru atılmış önemli bir adımdır ve o zamandan beri insan ve fare teratokarsinomlarından çok sayıda hücre serisi tanımlanmıştır. Bu hücrelerin diferansiyasyonu, “embrioid cisimcikler” olarak adlandırılan embriyo benzeri oluşumların meydana gelmesiyle sonuçlanan hücre agregasyonu ile gelişir. Söz konusu embrioid cisimcikler ilk olarak, embriyonal karsinomlu farelerin asit sıvılarında gözlenmiştir. Bu hücrelerin, gelişimsel biyologlar için de önemli bir model oluşturdukları, çünkü in-vitro diferansiyasyon paternlerinin, embriyogenezin çeşitli yönlerini açıkladığı ve 3 germ tabakasının tümünü temsil edici hücrelerin oluşumu ile sonuçlandığı görülmektedir.

Aynı zaman döneminde, in vitro fertilizasyon kliniklerinden alınan fazla embriyolar kullanılarak insan embriyonik kök hücrelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar da başlamıştır. Bu çalışmalar başlangıçta başarısız olmuş ancak pre-implantasyon blastosistlerinden izole edilen hücrelerde diferansiyasyonu incelemek için yapılan bir teşebbüste tavşan embriyo hücreleri kültür ortamına geliştirilebilmiştir. 1998’de ilk insan embriyonik kök hücreleri kültüre edilebilmiştir. Aynı zaman diliminde, insan primordial germ hücrelerinden embriyonik germ hücreleri elde edilmiştir. Bu kök hücrelerin gelecekte hastalık tedavisi için kullanılabilecek olması büyük bir heyecan yaratırken, henüz çözümlenmemiş etik sorunlar ciddi bir direnç yaratmıştır. Bu hücrelere karşı gösterilen etik reaksiyonlar sonucu, erişkin kök hücreleri ile ilgili çalışmalar da yoğunlaşmış ve bu hücrelerin belirgin plastisiteleri “kemik iliğinden kas”, “beynin kana çevrilmesi”, “kanın beyne çevrilmesi” gibi başlıkların görülmesine neden olmuştur. Bu ilk çalışmalardan sonra erişkin ve embriyonik kök hücrelerle ilgili çok sayıda yayın ortaya çıkmıştır. Bunların hepsi aynı amacı taşımaktadır: “kök hücre esaslı tedavi”.

2.5.2.Kök Hücreler ve Kök Hücre Plastisitesi

Kök hücre, bir canlının vücudunda çok uzun bir süre bölünmeye devam ederek kendini yenileyebilen ve bu sayede farklılaşmış hücreler oluşturabilen farklılaşmamış hücrelere verilen addır. Bir başka deyişle farklı hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline ve kendisini yenileyebilme gücüne sahip olan hücrelere “kök hücre” denir. Vücudumuzdaki kas, karaciğer, cilt hücreleri gibi hücrelerin hedefleri bellidir ve bu hücreler bölündükleri zaman yine kendileri gibi bir hücre oluştururlar. Oysa kök hücrelerin bu hücrelerden farklı olarak belirlenmiş bir fonksiyonları yoktur. Bu yüzden aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilirler. Bunu belirleyen en önemli etkenler de genler ve dış uyaranlardır. Vücudumuzdaki herhangi bir hücre grubunda ölüm ya da hasar meydana gelince kök hücreler hangi hücreye ihtiyaç varsa o hücreye dönüşüm gösterirler. Sperm ile ovumun birleşmesi ile ortaya çıkan zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik bilgiye ve güce sahiptir. Bu, tüm hücrelere dönüşebilme potansiyeline sahip ilk embriyonel hücreye “totipotent” hücre denir. Döllenmeyi takiben ilk 4-5 gün içerisinde bu hücreler aynı güce sahip olup herbiri tek başına bir organizma meydana getirebilme yeteneğinde hücrelerdir. Yaklaşık 5 gün sonrasında yani 2-3 bölünme sonrasında oluşan hücre kitlesine de “blastosist” denir ki bu kitle (iç hücre kitlesi) içindeki hücreler de vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Ancak bu hücreler tek başlarına bir organizmayı oluşturamazlar. Bu nedenle bu hücrelere “pluripotent” hücre denir. Bu aşamadan sonra hücreler daha özel fonksiyonlara sahip olmakta ve “erişkin kök hücreleri” oluşturmaktadırlar. Biraz daha özelleşmiş olan bu kök hücrelere ise “multipotent” hücre denmektedir. Buna en iyi örnek hem çocukluk döneminde hem de erişkin dönemde kemik iliğinde bulunan hematopoetik kök hücrelerdir. İnsan vücudunda ancak birkaç hücre türüne dönüşebilen bu hücreler, laboratuvar koşullarında gerekli destekleyici ortam ve sinyaller sağlandığında çok daha fazla hücre türüne dönüşebilmektedir.

Temelde gerçek kök hücre tanımını oluşturan prensipler şunlardır:

1- Kendi kendini yenileyebilme yeteneği ya da başlangıçtaki hücrenin karakterlerini taşıyan en az bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği (*self-renewal*),

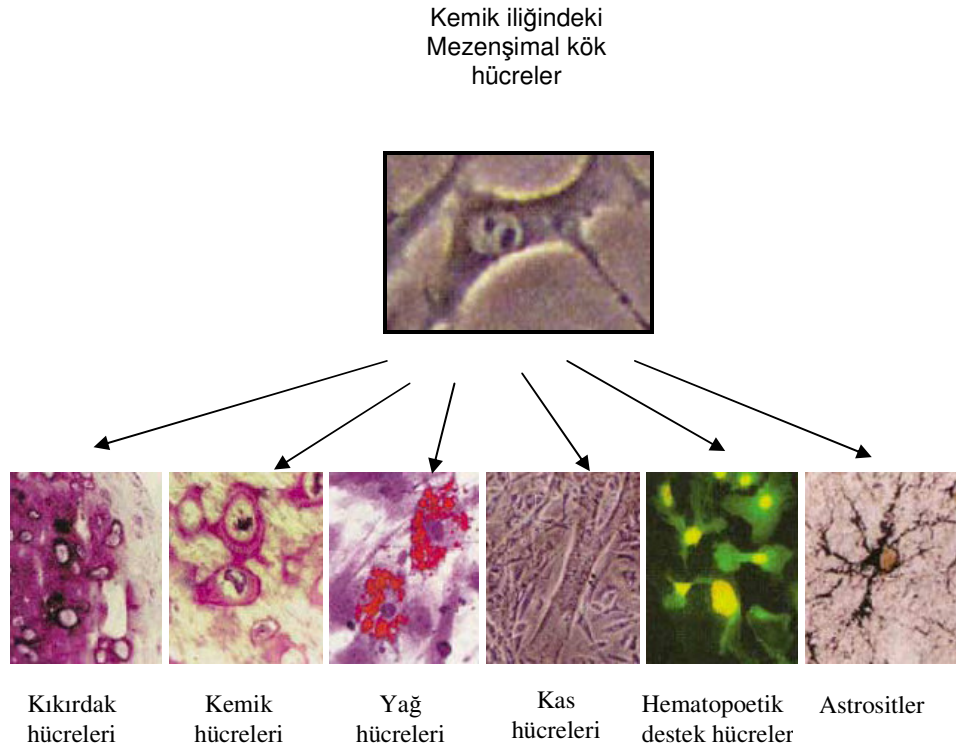
2-Tek bir hücreden birden fazla seri hücresine farklılaşabilme (*multi-lineage differentiation*),

3-Belli bir dokunun in-vivo fonksiyonel rekonstruksiyonu (57).

İlk olarak farelerden ve daha sonra da insan dışı primatlardan ve çok daha yakın bir zaman önce insan blastosistlerinden elde edilen Embriyonik Kök Hücreler (EKH) bu temel prensiplerin tümüne uymaktadır. Erişkin kök hücrelerin büyük bir bölümü, *self-renewal* ve diferansiyasyon potansiyellerinin EKH'den daha düşük derecede olmasına karşın bu kriterlere uymaktadırlar. zerinde en iyi çalışılmış erişkin kök hücreler olan Hematopoitik Kök Hücreler en azından in vivo olarak *self-renewing* (kendi-kendini yenileyen) hücre bölünmelerine uğramakta, tek hücre düzeyinde bütün matür kan elemanlarına diferansiye olabilmekte ve myeloablasyona uğramış bir insanın veya hayvanın kemik iliğini yeniden popule edebilmektedir. Diğer erişkin kök hücreler ise daha yakın zamanlarda tanımlanmışlardır ve bu nedenle de üzerlerinde daha az çalışılmıştır. Bununla beraber Nöronal Kök Hücreler, Mezenşimal Kök Hücreler (MKH) ve Epidermal Kök Hücreler yukarıda açıklanan temel kriterlere uymaktadırlar. Korneal kök hücreler ve anjioblastlar ya da endoteliyal kök hücreler olarak adlandırılan diğer kök hücreler de tek bir diferansiye hücre tipine farklılaşma özelliklerinin dışında bu kriterlere uymaktadırlar (58). Son yıllarda, belli bir dokudan alınan hücrelerin farklı bir dokuya diferansiye olabilme özelliği gösterdiğini bildiren çalışmaların sayısı giderek artmıştır ve bu çalışmalar, "kök hücre plastisitesi" atısı altında toplanmışlardır. Kök hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara diferansiye olabilme özelliğini tanımlamaktadır. Bunun rnekleri arasında endotele, kas hücrelerine, kalp kasına ve hepatositlere dönüşebilen kemik iliği kökenli hücreler ve hatta pürifiye edilmiş hematopoitik kök hücreler bulunmaktadır.

2.5.3.Mezenşimal Kök Hücreler

Kemik iliğini oluşturan bir diğer hücre grubu da MKH'lerdir. MKH'ler, çok sayıda pasaj boyunca ex-vivo olarak kültürde üretilebilmekte ve tek hücre düzeyinde osteoblastları, kondroblastları, adipositleri, fibroblastları ve iskelet myoblastlarını da içeren mezodermal hücrelere diferansiye olabilmektedirler. (58, 59). MKH'ler in vivo olarak kullanıldıklarında yukarıda sayılan hücre tiplerinin aynı dizisine diferansiye olabilmektedir (60)(Şekil 9).



Şekil 9. Mezenşimal kök hücreler uygun in vivo ve in vitro koşullarda kıkırdak, kemik, yağ, kas, hematopoetik kök hücreler ve astrositlere farklılaşabilmektedirler.

Çok sayıda yeni çalışma MKH'lerin, mezodermin dışında kalan endotel, nöroektoderm ve endoderm de dahil olmak üzere çok çeşitli hücrelerin karakterlerini kazanabileceklerini bildirmektedir. MKH'lerin kullanıldığı tüm çalışmalarda in-vitro olarak çok sayıda pasajdan geçirilerek kültürü yapılmış hücreler kullanıldığı için bu çalışmalar, plastisitesi olan hücrelerde kendini-yenileme özelliğinin de olduğunu göstermektedir (57). MKH'ler aynı zamanda iskelet kası, dermis, yağ dokusu, periodontal ligamentten de izole edilebilmektedir (61-62).

2.6.Distraksiyon Osteogeneziste Kök Hücre Uygulaması

Kök hücreler kemik kırıkları, kemik defektleri ve kaynamayan kırık bölgelerinde deneysel ve klinik olarak kullanılmıştır.

Tsuboto ve arkadaşları (63), 1999 yılında yaptıkları çalışmada, tavşan tibialarına dinamik eksternal fiksator yerleştirerek, 20 gün boyunca günde 1 mm olacak şekilde distraksiyon uygulamışlardır. Aktivasyon periyodunun sonunda hayvanları 3 gruba ayırmışlar ve distraksiyon alanına grup 1'de herhangi bir madde enjekte edilmezken grup 2'de 0.5 ml serum fizyolojik enjeksiyonu, grup 3'de de 0.5 ml serum fizyolojik içinde 5×10^6 adet osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre enjeksiyonu gerçekleştirmişlerdir. 2, 4, 6, ve 8. haftalarda distraksiyon uygulanan alanlar radyolojik, histolojik, mekanik analizle ve ayrıca kemik mineral dansitesi yönünden değerlendirilmiştir. Kemik mineral dansitesi 2. ve 4. haftalarda hücre enjekte edilen grupta kontrol ve serum fizyolojik enjeksiyonu uygulanan gruba göre artmış olarak bulunurken diğer haftalarda gruplar arasında fark bulunmamıştır. Radyolojik olarak hücre uygulanan grupta distrikte edilen kemik segmentinin diğer gruplara göre daha kalın olduğu izlenmiştir. Mekanik olarak 3 nokta eğme testi ile değerlendirilen grupların arasında fark bulunamazken, tüm gruplarda 4. hafta değerlerinde maksimum artış olduğu ve 6. ve 8. haftalarda değerlerin azaldığını gözlemlemişlerdir. Tüm bu sonuçların ışığında uzun kemiklerde distraksiyon alanına uygulanan osteoblasta kadar farklılaştırılmış

kök hücrelerin, erken dönemde, oluşan yeni kemik hacmini ve kemik mineral miktarını arttırdığını belirtmişlerdir. Uygulanan bu işlemin distrikte edilen kallusta osteojenik hücre sayısını arttırarak ve transplante edilen kök hücrelerden salgılanan sitokin, kollojen ve diğer ajanların etkisi ile membranöz ve kartilajinöz ossifikasyonu stimüle ederek etki gösterdiğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışmanın sonucunda aktivasyon fazı sonrasında kallus dokusuna transplante edilen osteoblast benzeri hücrelerin erken dönemde yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı sonucuna varmışlar ve insanda da aynı işlem gerçekleştirildiği takdirde distraksiyon osteogeneziste konsolidasyon periyodunu ve eksternal fiksatorün takılı kalma süresini azaltacağını ileri sürmüşlerdir.

Takamine ve arkadaşları (64), 2001 yılında yaptıkları çalışmada, femoral distraksiyon uyguladıkları toplam 69 ratı 4 gruba ayırmışlar ve distraksiyon alanına, aktivasyon periyodu sonunda, grup 1 de herhangi bir enjeksiyon uygulanmazken grup 2 de serum fizyolojik, grup 3 de kollajen jel, grup 4 de de kollajen jel ile karıştırdıkları osteoblasta kadar farklılaştırılmış mezenşimal kök hücreleri uygulamışlardır. Enjeksiyon sonrası 2, 4, 6 ve 8. haftalarda, radyolojik, histolojik, 3 nokta eğme testi ve femoral küllerin ağırlığının ölçümü ile değerlendirme yapmışlardır. Radyolojik değerlendirmede grup 4 de 2. haftada kaynama gerçekleşirken diğer gruplarda 4. haftada kaynamanın gerçekleştiğini görmüşlerdir. Histolojik değerlendirmede osteoblastlar etrafında matür kemik matriksi gözlenmiş, herhangi bir inflamatuvar reaksiyona rastlanmamıştır. Üç nokta eğme testinde kırılmaya karşı dayanıklılık 4. grupta diğer gruplara göre 2. ve 4. haftalarda daha yüksek olarak bulunmuştur. Femurların yakılarak küllerinin ağırlığının ölçülmesine dayanan femoral kül ölçümü testinde de 2. haftada grup 4 de belirgin farklılık bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda kemik iliğinden elde edilen mezenşimal kök hücrelerin osteoblasta kadar farklılaştırılıp kollajen jel ile karıştırılarak distraksiyon alanına uygulanmasının, distrikte edilen kallusun maturasyonunu arttıracığı ve konsolidasyon periyodunu kısaltacağı kanısına varmışlardır. Kollajen jel burada bir taşıyıcı gibi davranarak hücrelerin çevre dokulara dağılmasını önlemektedir.

Kitoh ve arkadaşları (65) 2004 yılında yaptıkları çalışmada, 2 akondroplazili ve 1 konjenital tibial psödoartrozu olan hastaların toplam 3 femur ve 2 tibiasına distraksiyon uygulamışlar. Aktivasyon periyodunun 2. haftasında ve sonunda olmak üzere toplam 2 kez distraksiyon alanına kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre ve plateletten zengin plazma uygulamışlardır. Hastaların iliak krestlerinden alınan kemik iliğinden üretilen mezenşimal kök hücreler in-vitro koşullarda osteoblast benzeri hücrelere kadar farklılaştırılmıştır. Bu farklılaştırılan hücreleri, hastaların venöz kanlarından elde edilen ve birçok büyüme faktörünü içeren plateletten zengin plazma ile karıştırarak distraksiyon alanına uygulamışlardır. 3 vakayla sınırlı bu çalışmadan elde ettikleri sonuçları bir ön rapor olarak yayınlamışlardır. Kemik iliği kaynaklı osteoblast benzeri hücrelerin plateletten zengin plazma ile karıştırılarak transplante edilmesinin distraksiyon osteogenezis süresince yeni kemik oluşumunu hızlandırarak, olası komplikasyonların riskini azalttığını ve tedavi süresini kısalttığını bildirmişlerdir.

Qi ve arkadaşları (66), 2006 yılında yaptıkları çalışmada toplam 40 adet erkek ratın sağ hemimandibularına 3.2 mm'lik distraksiyon uygulamışlar ve sonrasında ratları 2 gruba ayırmışlar. Grup 1 ratlarda aktivasyon periyodunun sonunda, distraksiyon aralığına, sağ tibialarından elde ettikleri kemik iliği kökenli otolog mesenşimal kök hücreleri 0.1 ml serum fizyolojik içerisinde 5×10^5 miktarında, grup 2 ratlara da aynı miktarda serum fizyolojik enjekte etmişlerdir. Postoperatif 27. ve 55. günlerde her gruptan 10'ar hayvan sakrifiye edilerek radyolojik, histolojik ve histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir. Radyolojik olarak 27. ve 55. günlerde grup 1' deki distraksiyon alanı grup 2'ye göre daha radyodens olarak izlenmiştir. Histolojik olarak kök hücre uygulanan grupta, distraksiyon alanında, uygulanmayan gruba göre daha fazla mezenşimal hücre, osteoblast ve yeni oluşan kan damarları ve daha büyük ve yeni oluşmuş trabeküller izlenmiştir. Histomorfometrik analizde grup 1'de kortikal ve kansellöz kemik alanında yeni oluşan kemik hacmi ve yeni trabeküllerin kalınlığı grup 2'ye göre belirgin bir şekilde daha fazla olarak izlenmiştir. Bu çalışmanın sonucunda otolog kemik iliği kökenli mezenşimal kök hücrelerin distraksiyon alanına

uygulanmasıyla yeni kemik oluşumunun hızlandığını ve konsolidasyon süresinin kısaldığını bildirmişlerdir.

Shao ve arkadaşları (67), 2007 yılında yayınladıkları çalışmalarında 50 adet tavşanın mandibulalarına bilateral olarak 1 cm'lik distraksiyon uygulamışlar ve aktivasyon periyodunun sonunda tek taraflı olarak distraksiyon alanına her bir ratın iliak kemiğinden elde ettikleri 1×10^7 adet osteoblast benzeri kök hücreyi enjekte etmişlerdir. Diğer tarafa da 0.5 ml *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* enjekte etmişlerdir. Hayvanlar 3 eşit gruba ayrılmış ve 2, 4 ve 6. haftalarda sakrifiye edilerek radyografik, histolojik, histomorfometrik ve elektron mikroskopik olarak değerlendirilmişlerdir. Ayrıca dual-enerji x-ray absorpsimetresi ile kemik mineral dansitesi değerlendirilmiştir. Rayolojik değerlendirmede hücre enjekte edilen tarafta distrakte edilen kallusun kontrol tarafına göre daha kalın ve solid olarak izlendiği görülmüştür. Kemik mineral dansitesi hücre transplante edilen tarafta 2. haftada daha fazla bulunmuş fakat 4. ve 6. haftalarda her iki taraf arasında fark bulunamamıştır. Elektron mikroskopik değerlendirmede hücre transplante edilen taraftaki kollajen fibrillerinin kontrol tarafına göre daha yoğun ve düzenli olarak dizildiği gözlenmiştir. Histolojik olarak hücre enjekte edilen tarafta 2. haftada daha fazla matür kemik dokusu ve daha fazla kartilajinöz adalar tespit edilmiş, histomorfometrik olarak da yine hücre transplante edilen tarafta yeni kemik oluşum yüzdesi kontrol tarafına göre daha yüksek olarak bulunmuştur. Bu verilere dayanılarak membranöz kemiklerde distraksiyon osteogenezisin aktivasyon fazı sonunda uygulanan osteoblast benzeri kök hücrelerin yeni kemik oluşumunu hızlandırarak konsolidasyon fazını kısalttığı ve tedavi süresine bağlı olarak ortaya çıkabilecek komplikasyonları belirgin ölçüde azalttığı sonucuna varmışlardır.

Tüm bu çalışmaların sonucunda, gerek yassı gerekse uzun kemiklerde, distraksiyon osteogenezisin aktivasyon periyodu sonunda, distraksiyon alanına uygulanan mezenşimal ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücrelerin yeni kemik oluşumunu arttırarak konsolidasyon fazını kısalttığı görülmüştür. Distraksiyon osteogeneziste kök hücre tedavisi

ile ilgili çalışmaların daha çok uzun kemik distraksiyon modelleri kullanılarak yapıldığı görülmektedir. Kök hücre tedavisinin kraniyofasyal distraksiyon modellerinde kullanımı ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Ayrıca yapılan çalışmalarda, aynı hayvan modeli üzerinde, gerek kraniyofasyal gerekse uzun kemiklerdeki distraksiyon osteogeneziste mezenşimal ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre tedavisinin etkileri de kendi aralarında karşılaştırılmamıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu araştırma Mart 2007-Ağustos 2007 tarihleri arasında GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi'nin olanakları ile yapıldı. Bu çalışma öncesinde, GATA Komutanlığı Hayvan Deneyleti Etik Kurulu'nun 09.02.2007 tarih ve 07/9 nolu etik kurulu onayı alındı.

3.1.Deney Hayvanlarının Tanımı ve Sayısı

Bu çalışmada, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Deneysel Araştırma Merkezi'nde üretilip yetiştirilen, ortalama 200-250 gr ağırlığında, 3-6 aylık toplam 30 adet erkek *sprague dawley* rat kullanıldı.

3.2.Deney Protokolü

3.2.1.Preoperatif Hazırlık ve Anestezi

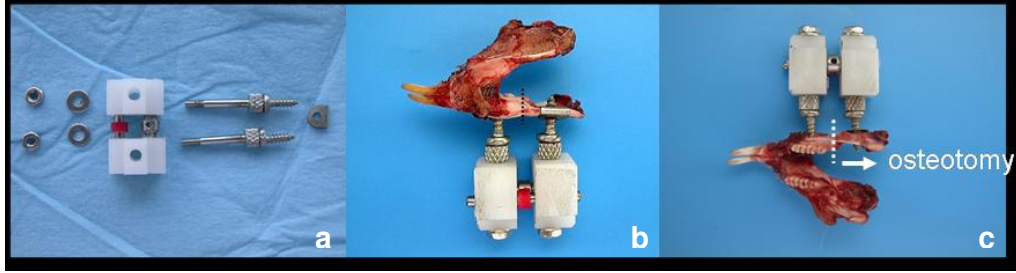
Standart laboratuvar yemi ve suyu ile beslenen, normal oda ısısında, 12 saatlik karanlık/aydınlık siklusuna tabii tutulan ve özel kafeslerde muhafaza edilen ratların genel sağlık taraması operasyon öncesi bir veteriner hekim tarafından yapıldı. Bu muayene sonrasında sağlıklı olduğu düşünülen ratlar çalışmaya alındı.

Ratlarda, kas içine uygulanan %10 Ketamin (90mg/kg) (Alfamine, Ege Veterinerlik, Türkiye) ve %2 Xylazine (10mg/kg) (Alfazyne, Ege Veterinerlik, Türkiye) ile anestezi sağlandı. Tüm hayvanlarda, uygulanan bu miktarla

yeterli anestezi ve analjezi sağlanmış olup operasyon süresince ek ilaca gerek duyulmadı.

3.2.2.Distraktör Tasarımı ve Tanımı

Bu çalışmada daha önceki çalışmalarda kullanılmış olan ve Modelsan'da (Ankara, Türkiye) üretimi gerçekleştirilen rat mandibular distraktörü kullanıldı (68). Bu distraktörde, iki tarafında yivleri olan 12 mm'lik bir vidanın iki ucuna özel olarak dizayn edilmiş 2 adet polivinil klorid blok yerleştirilmiştir. Blokların bu vida etrafında dönmesini engelleyecek aynı uzunlukta bir metal çubuk da alt kısma yerleştirilmiştir. Polivinil bloklar üzerinde vertikal planda pinlerin geçeceği birer adet delik bulunmaktadır. Pinler birbirlerine kaynakla tutturulmuş iki kısımdan oluşmaktadır. Pinlerin distal kısmını, mandibulada açılan deliklere fikse edilecek şekilde 2x8 mm'lik bir titanyum vida ve proksimal kısmını da polivinil klorid bloklara girerek 1'er adet pul ve somun ile bu bloklara tutturulacak bir vida oluşturmaktadır (Resim 1.a). Anterior pin mandibula korpusunda açılan deliğe yerleştirilirken posterior pin mandibula angulusunda açılan deliğe yerleştirilmektedir. Rat mandibula angulusu ince ve narin olduğu için bu bölgedeki pin gevşediğinden bunu engellemek için U şeklinde bir plaka bu bölge için tasarlanmıştır. Bu U şeklinde plaka, bacakları açılarak mandibular rimi içine alacak şekilde angulusa yerleştirilmektedir. Plaka bir klips gibi angular rimi stabilize ederek delme ve vidalamanın daha güvenli bir şekilde yapılmasını sağlamaktadır (Resim 1.b-c). Bu plakanın medial bacağındaki delik lateral bacadaki delikten daha dardır. Bu da kemiğin plağın iki bacağı arasında sıkışmasını sağlamaktadır. U şeklindeki bu plaka kullanılarak angulustaki ince kemiğin üzerine posterior pin fiksasyonu gerçekleştirildiğinde, takılacak aletin stabilitesi artmaktadır. Polivinil klorid blokların arasındaki vidanın 90° dönmesi kemik uçları arasında 0.25 mm'lik ayrılma sağlamaktadır.



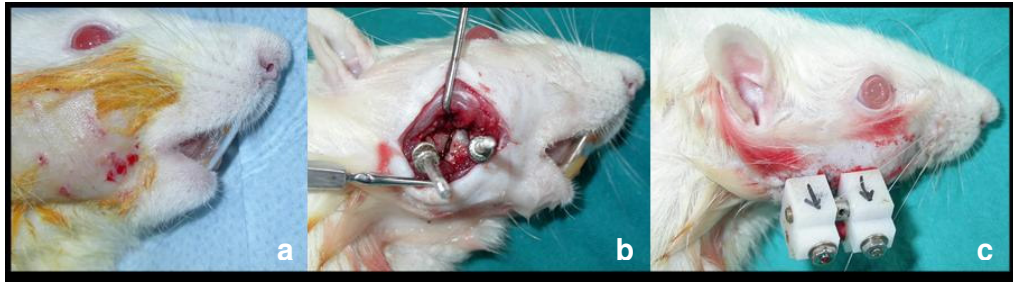
Resim 1. Rat mandibular distraktörü. a. Distraktörü oluşturan parçaların görünümü. b-c. Distraktörün mandibulaya takılmış haldeki görünümü.

3.2.3. Operasyon Tekniği ve Distraktörün Yerleştirilmesi

Ratların sağ hemimandibularlarının üzeri cerrahi sabunla temizlendikten sonra traş edildi. Traştan sonra tekrar cerrahi sabun ile bu bölgenin temizliği yapıldı ve hayvan operasyon tahtasına sol yanına yatırılarak ayaklarından ve kuyruğundan flaster yardımı ile fiske edildi. İntravenöz serum setinin plastik kısmından kesilip hazırlanan 1 cm'lik tüp, ratın alt ve üst kesici dişlerine geçirilerek interinsizyel fiksasyon sağlandı. Bu yalnız cerrahi manuplasyonu kolaylaştırmakla kalmayıp aynı zamanda hayvanın cerrahi süresince hava yolu devamlılığını sağlamaya yardımcı oldu. Operasyon sahası batikon ile temizlenerek hayvan operasyona hazırlandı (Resim 2.a).

Operasyon için hazır hale gelen hayvanın sağ hemimandibular yöresinde 1 cm'lik transvers cilt insizyonu yapıldı. Masseter kası split edildi ve mandibula korpus ve angulusu ortaya kondu. Molar dişlerin posterioruna gelecek şekilde osteotomi hattı belirlendi. Bu hattın 4 mm önüne anterior pinin yerleştirilmesi amacıyla matkap ile (Dremel Europa Konijnenberg 60, Breda, NL) yavaş devirde (3000 rpm), serum fizyolojik irrigasyonu altında, 1.6 mm'lik delik açıldı. Anterior pin bu deliğe vidalandı. Belirlenen osteotomi hattının 4 mm posteriorunda angulus mandibula lateral ve medial kısımlarındaki kaslar insersiyolarından ayrıldı ve U şeklindeki plaka angulus mandibula inferior rimine yerleştirildi. Bu plaka üzerindeki deliklerden matkap

ile angulus mandibulaya aynı şartlarda delik açıldı ve posterior pin bu plaka üzerinden dikkatli bir şekilde angulusa yerleştirildi. Pinlerin yerleştirilmesini takiben molar dişlerin posteriorundan, 1 mm'lik elmas *burr* yardımı ile düşük devirde, serum fizyolojik irrigasyonu altında osteotomi gerçekleştirildi (Resim 2.b). İşlem esnasında hasara uğrayan kas kısımları minimal debride edildi ve kas 5\0 vikril ve cilt 6\0 prolenle suture edildi. Takiben distraktörün polivinil blok kısmı pinlerin üzerine yerleştirilerek pul ve somun yardımı ile tespiti sağlandı (Resim 2.c). İntraoperatif olarak distraktör aktive edilerek osteotominin tam olup olmadığı ve distraktörün çalışıp çalışmadığı kontrol edildi. Takiben pin diplerine antiseptik bir solusyon olan Piyedif (Dif, Türkiye) sıkıldı. 2 günde bir kas içerisine uygulanan 0.1 cc Oksitetrasiklin (Oxytetra LA, Pfizer, USA) ile 10 gün boyunca antibiyotik profilaksisi sağlandı.



Resim 2. Distraktörün yerleştirilmesi a. Operasyon için sağ hemimandibular bölgenin traş edilip temizlenerek hazırlanması. b. Pinlerin takılıp osteotominin yapılması. c. Kas ve cildin suture edilerek polivinil klorid blokların pinlerin üzerine yerleştirilmesi.

3.3.Distraksiyon Protokolü

Distraktör takılmasını takiben 3 gün beklendi. Bu bekleme periyodunun ardından, 2x0.25 mm/gün olacak şekilde 6 gün boyunca toplam 3 mm'lik uzatma sağlandı.

3.4.Postoperatif Bakım

Bu aktivasyon periyodunu 4 haftalık konsolidasyon periyodu takip etti. Ratlar tek olarak özel kafeslerinde muhafaza edildi. Postoperatif olarak katı gıda ile beslenemediklerinden, beslenmeleri enteral beslenme solusyonu (Biosorb Drink Nutricia, Zoetermer, The Netherlands) ile sağlandı. Yarı yarıya sulandırılan bu solusyon ikinci bir şişede hayvana verildi. Hazırlanan bu karışım günlük olarak yeniledi. Tüm işlemlerde Türk Veteriner Hekimliği Medikal Deontoloji Kanunu (6343/2; 6.7.26) ve hayvan haklarını içeren Helsinki Deklerasyonuna bağlı kalındı.

3.5.Deney Grupları

Distraktör yerleştirilen ve 3 mm distraksiyon uygulanan ratlar aktivasyon periyodu sonunda 10'ar rattan oluşan 3 gruba ayrıldı.

Grup 1 (Kontrol grubu): Sağ mandibular distraksiyon uygulanan hayvanlarda aktivasyon periyodunun sonunda distraksiyon aralığına 0.3 cc serum fizyolojik enjekte edildi. Ratlar eşit 2 alt gruba ayrılıp 5 tanesi konsolidasyon periyodunun 2. haftasında kalan 5 tanesi de 4. haftasında yeni kemik oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla radyolojik, sintigrafik ve histomorfometrik olarak incelendi.

Grup 2 (Mezenşimal kök hücre uygulanan grup): Sağ mandibular distraksiyon uygulanan hayvanlarda aktivasyon periyodunun sonunda distraksiyon aralığına, içerisinde 1×10^6 adet 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (SIGMA, Germany) ile işaretlenmiş mezenşimal kök hücre içeren 0.3 cc'lik Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Biological Industries, İsrail) solusyonu enjekte edildi. Ratlar eşit 2 alt gruba ayrılıp 5 tanesi konsolidasyon periyodunun 2. haftasında kalan 5 tanesi de 4. haftasında yeni kemik oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla radyolojik, sintigrafik ve histomorfometrik olarak incelendi.

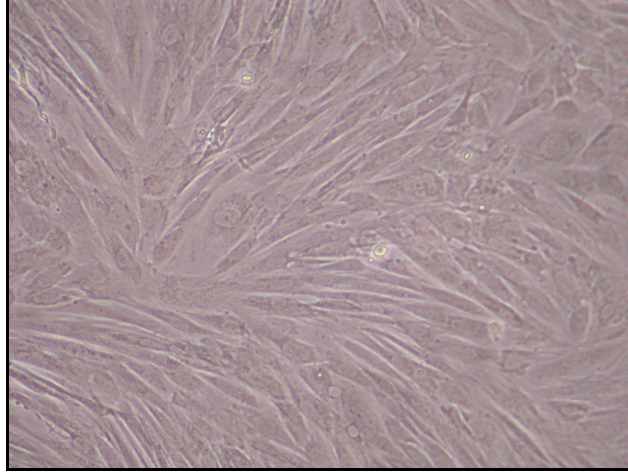
Grup 3 (Osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan grup): Sağ mandibular distraksiyon uygulanan hayvanlarda aktivasyon periyodunun sonunda distraksiyon aralığına içerisinde 1×10^6 adet DAPI ile işaretlenmiş osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre içeren 0.3 cc'lik DMEM solusyonu enjekte edildi. Ratlar eşit 2 alt gruba ayrılıp 5 tanesi konsolidasyon periyodunun 2. haftasında kalan 5 tanesi de 4. haftasında yeni kemik oluşumunun değerlendirilmesi amacıyla radyolojik, sintigrafik ve histomorfometrik olarak incelendi.

3.6.Kök Hücre Elde Edilmesi

Kök hücre elde edilmesi GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Tıbbi ve Kanser Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.6.1.Mezenşimal Kök Hücre Elde Edilmesi

Ratların tibialarından 15 g iğne ile kemik iliği aspire edildi. Hücre toplulukları 1:2 oranında fosfatla tamponlanmış tuz solusyonu (PBS, Biological Industries, İsrail) ile dilüe edildi. 1:3 oranında Ficoll solusyonu (1.073 g/ml, PAA, Germany) üzerine yayıldı. 1800 rpm'de 30 dk oda ısısında santrifüj (HERMLE, Z 383 K,Germany) edildi. Mononükleer hücre tabakası alındı ve % 10 fetal sığır serumu (FBS, Biological Industries, İsrail) 100 U/ml penisilin+100 µg/ml streptomisin (SIGMA, Germany), 2mM L-glutamin (Biological Industries, İsrail) içeren DMEM (Biological Industries, İsrail) solusyonu ile süspanse edildi ve % 5'lik karbondioksit içeren 37 derecelik etüvde (Sanyo, MCO-18AIC, Japan) inkübe edildi. 3 günde bir media değişikliği yapıldı. İnkübasyondan 8-10 gün sonra hücreler tripsin-etilendiaminetetraasetik asit (EDTA), (Biological Industries, İsrail) ile kaldırıldı ve yeni kültür kabına tekrar ekildi. 3 pasajdan sonra üretilen hücreler transplantasyon için kullanıldı (Resim 3).



Resim 3. Kültüre edilen Mezenşimal kök hücrelerin 2.haftada (x100) büyütmede görünüşleri (İnverted microscope, Nikon eclipse TS100, Japan).

3.6.2.Osteoblasta Kadar Farklılaştırılmış Kök Hücre Elde Edilmesi

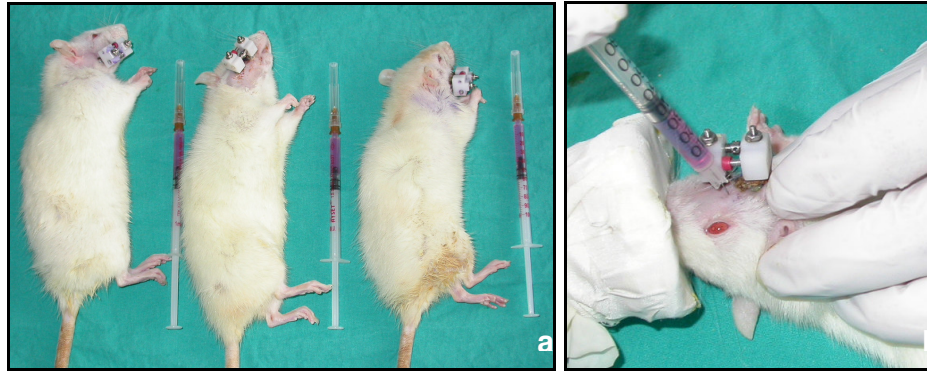
Ratların tibialarından 15 g iğne ile kemik iliği aspire edildi. Hücre toplulukları 1:2 oranında fosfatla tamponlanmış tuz solusyonu (PBS, Biological Industries, Israel) ile dilüe edildi. 1:3 oranında Ficoll solusyonu (1.073 g/ml, PAA, Germany) üzerine yayıldı. 1800 rpm'de 30 dk oda ısısında santrifüj (HERMLE, Z 383 K,Germany) edildi. Mononükleer hücre tabakası alındı ve % 10 fetal sığır serumu (FBS, Biological Industries, İsrail), 100 U/ml penisilin+100 µg/ml streptomisin (SIGMA, Germany), 2mM L-glutamin (Biological Industries, İsrail) içeren DMEM (Biological Industries, Israel) solusyonu ile süspanse edildi ve % 5'lik karbondioksit içeren 37 derecelik etüvde (Sanyo, MCO-18AIC, Japan) inkübe edildi. 3 günde bir media değişikliği yapıldı. İnkübasyondan 8-10 gün sonra hücreler tripsin-etilendiaminetetraasetik asit (EDTA) (Biological Industries, İsrail) ile kaldırıldı ve yeni kültür kabına tekrar ekildi. Hücrelere %10 fetal sığır serumu, 100 nM dekzametazon, 0.05 mM L-askorbik asit ve 10 mM beta-gliserofosfat (SIGMA, Germany) içeren osteojenik medya eklendi. 3 günde bir medya değiştirildi ve 2 hafta sonra hücreler transplantasyon için kullanıldı.

3.7.Kök Hücrelerin DAPI ile İşaretlenmesi

Distraksiyon hattına mezanşimal hücreler implante edilmeden önce kültür ortamına steril olarak 50 mcg/ml konsantrasyonunda DAPI solüsyonu eklendi. Boya kültür ortamında en az 30 dakika kaldıktan sonra bağlanmamış DAPI'yi uzaklaştırmak amacıyla hücreler 6 kez Hank's balanced salt solution (HBSS) (Biological Industries, Israel) ile yıkandı. Hücreler tripsinize edildi, 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde DMEM ile sulandırıldı ve enjeksiyon için kullanıldı.

3.8.Kök Hücre Uygulanması

Aktivasyon periyodunun sonunda yani postoperatif 10. günde, 3 gruba (n=10) ayrılan ratlara Severon (Sevorane, Abbot, UK) ile kısa süreli inhalasyon anestezisi uygulandı. Grup 1'deki ratlara 0.3 cc serum fizyolojik, distraksiyon hattı boyunca 3 ayrı noktadan enjekte edildi. Grup 2'deki ratlara 1×10^6 hücre/ml DAPI ile işaretlenmiş mezanşimal kök hücre içeren 0.3 cc'lik DMEM solüsyonu 3 ayrı noktadan enjekte edildi. Grup 3'deki ratlara 1×10^6 hücre/ml DAPI ile işaretlenmiş osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre içeren 0.3 cc'lik DMEM solüsyonu 3 ayrı noktadan enjekte edildi (Resim 4).



Resim 4. Kök hücre uygulaması a. Aktivasyon periyodunun sonunda kök hücre uygulaması için hazırlanan ratlar. b. Distraksiyon aralığına kök hücre uygulaması.

Enjeksiyon sonrası hayvanlar ayrı ayrı kafeslere konarak takiplerine devam edildi.

3.9.Araştırmadan Çıkarılma Ölçütleri

Cerrahi sırasında veya sonrasında distraktör düzeneğinde çalışmama, mandibulada kırık meydana gelmesi, distraktörün erken düşmesi, cilt ve/veya kasta nekroz meydana gelmesi ve infeksiyon durumunda bu hayvanlar çalışmadan çıkarıldı.

3.10.Değerlendirme

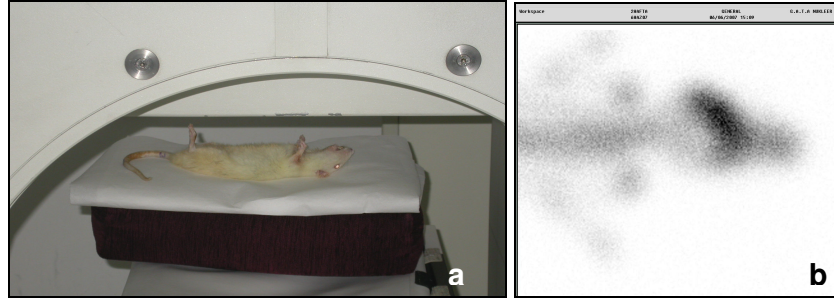
3.10.1.Radyografik Görüntüleme

Operasyondan hemen sonra pinlerin ve aletin uygun pozisyonda olup olmadığını değerlendirmek için antero-posterior kafa grafileri çekildi. (Ultranet SA, GE Medical Systems by Medys, Manzo, Italy). Konsolidasyon periyodunun 2. ve 4. haftalarında, yeni kemik oluşumunu değerlendirmek için kafa grafileri çekildi. Makine ayarları 50kV, 7mA ve 40 saniyelik ekspozur zamanına göre ayarlandı.

3.10.2.Kantitatif Kemik Sintigrafisi

Kuyruk veninden 37 MBq (1 mCi) Tc-99M MDP (Teknesyum 99m Metilendifosfonik asit) (MON.MDP.KIT, Monrol, Türkiye) verildikten 2 saat sonra hayvanlara daha önce tarif edildiği şekli ile ketamin anestezisi uygulandı. Yeni kemik oluşumunu ve mineralizasyonu göstermek amacı ile gama kamera ile (Gama Camera Dual Head, XDG00128, Optima NX, USA) 10 dakika süre ile sintigrafik görüntüler alındı (Resim 5.a,b). Elde edilen görüntüler üzerinde distraksiyon alanı ve karşı sağlam alan üzerinde eşit

dikdörtgenler oluşturularak ortalama değerler sayım/pixel olarak hesaplandı. Lezyon sayımı/karşı taraf sayımı oranlanarak ortalama up-take oranları hesaplandı. Her gruptan elde edilen değerler karşılaştırıldı.



Resim 5. Sintigrafi çekimi a: Sintigrafi çekimi sırasında ratın gama kameradaki görüntüsü. b: Sintigrafi çekimi sırasında gama kameradan elde edilen görüntünün bilgisayar ortamındaki görünümü.

3.10.3. İmmüfloresan Görüntüleme

Konsolidasyon periyodunun 2. haftasında histomorfometrik analiz için sakrifiye edilen grup 2 ve 3'deki kök hücre tedavisi uygulanan ratların mandibulaları dekalsifikasyon işlemine tabii tutulmadan önce, distraksiyon alanının üst kısmından 2 mm'lik örnek alındı. Bu örnekler parafin bloğa gömüldü. Bu bloklardan 5 mikrometrelilik sagittal kesitler alındı ve bunlar lam üzerine yerleştirilerek immüfloresan mikroskop ile (Nikkon Eclipse 80 i Japan) değerlendirme yapıldı. Bu kesitlerde floresan veren kök hücreler görülmeye çalışıldı.

3.10.4. Histomorfometrik Analiz

Kemik sintigrafisini takiben hayvanlar kas içine uygulanan yüksek doz ketamin ile öldürüldü. Mandibulaların üzerindeki yumuşak dokular

uzaklaştırıldı. Bu örnekler % 10 formalin içerisinde alındı. Daha sonra % 40 formik asit ve % 6.26 sodyum formatın yarı yarıya karıştırılmasından elde edilen solusyonda 5 gün bekletilerek dekalsifiye edildi. 5 gün sonrasında örnekler parafin bloğa gömüldü ve bu bloklardan 5 mikrometrelilik kesitler alındı. Kesitler lam üzerine yerleştirildi ve Mason trikrom ile boyandı. Trikrom ile boyanan osteotomi alanları ışık mikroskobu altında tespit edildi. Mikroskop tabanlı görüntü analiz programı kullanılarak (Zeiss Vision KS 400 version 3.0 for Windows) yeni oluşan kemik ve fibrozis oranları analiz edildi. Görüntü analizine makro olarak başlandı ve 2.5x büyütme altında ölçüm yapılacak alanlar belirlendi. Seçilen alanlar büyük büyütmede (x100) ardışık dikdörtgen alanlar şeklinde tek tek otomatik olarak tarandı ve uygun görüntüler alındı. Rastgele düzenlenmiş olan çizgi ve nokta sistemi (grid) her bir alınan görüntünün üzerine konuldu. Sonra fibrozis ve yeni oluşan kemik interaktif olarak sayıldı. Yeni oluşan kemik/fibrozis oranları % olarak programda hesaplandı.

3.10.5. İstatiksel Analiz

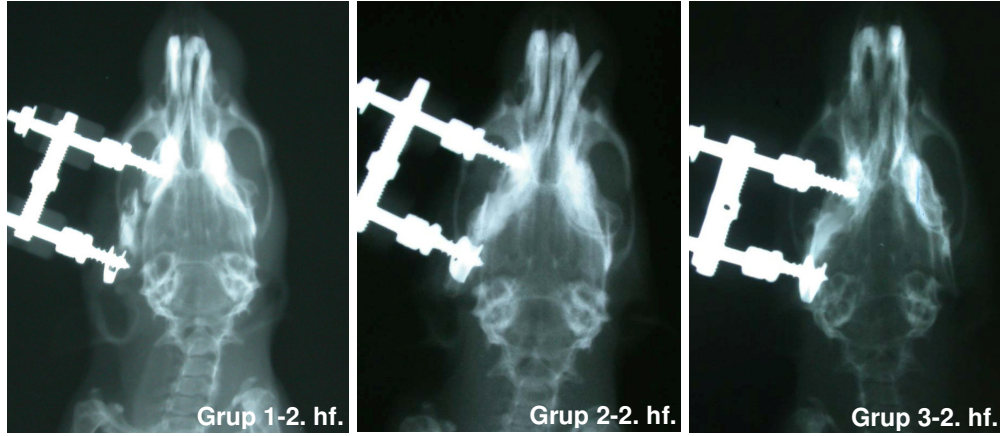
Sonuçlar ortalama \pm standart sapma olarak elde edildi. İstatistiksel analiz için SPSS for Windows 15.0 (SPSS, Chicago, IL) kullanıldı ve $p < 0.05$ değeri anlamlı olarak kabul edildi. Grupların kendi içerisinde 2. ve 4. haftadaki sintigrafik ve histomorfometrik değerleri Wilcoxon Eşli Sıra testi (45) ile değerlendirildi. Gruplar arasındaki 2. ve 4. haftadaki değerlendirmeler ise Mann-Whitney U testi ile analiz edildi.

4. BULGULAR

Toplam 30 hayvan opere edildi ve tüm hayvanlar çalışmayı tamamladı. Hiçbir hayvanda yara yeri enfeksiyonu ve ayrılması olmadı. 6 hayvanda pin dibi reaksiyonu görüldü fakat bu distraktörün düşmesine ve işlemin başarısız olmasına neden olmadı.

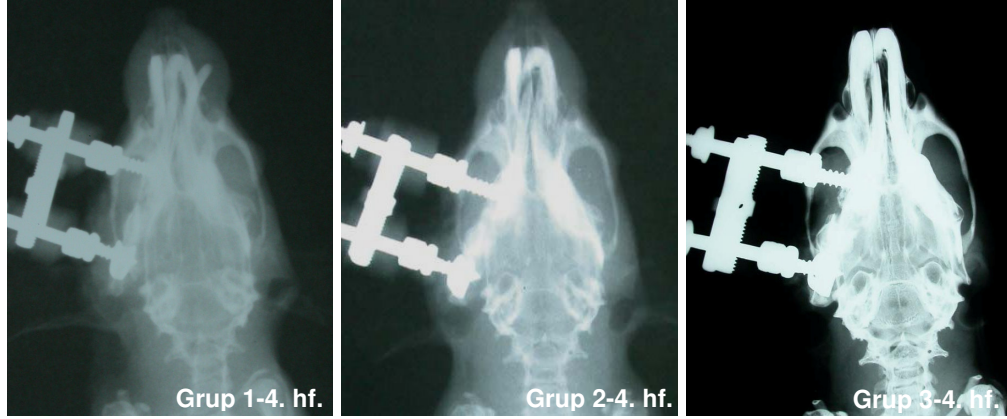
4.1. Radyolojik Değerlendirme Sonuçları

Radyolojik değerlendirmede, konsolidasyon periyodunun 2. haftasında kontrol grubunda (grup 1), distraksiyon aralığında kaynamanın tam olarak gerçekleşmediği izlendi. Mezenşimal kök hücre uygulanan grup 2 ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan grup 3'ün 2. hafta radyolojik değerlendirmelerinde, distraksiyon aralığında kemik iyileşmesinin tama yakın olduğu izlendi (Resim 6).



Resim 6. Grupların 2. hafta radyolojik görüntüleri. Soldaki resimde kontrol grubunun 2. haftadaki radyolojik görüntüsünde kaynamanın tam olarak gerçekleşmediği izlenmektedir. Orta ve sağdaki resimlerde ise sırasıyla mezenşimal kök hücre ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan grupların 2. haftadaki radyolojik görüntülerinde distraksiyon aralığındaki kaynamanın hemen hemen tama yakın olduğu görülmektedir.

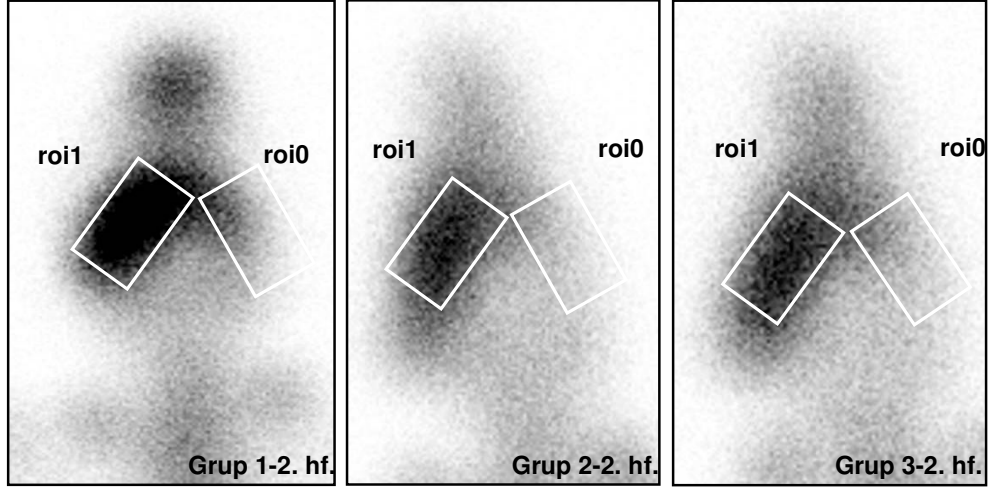
4. hafta sonunda radyolojik olarak gruplar değerlendirildiğinde iyileşmenin tüm gruplarda tam olduğu saptandı (Resim 7).



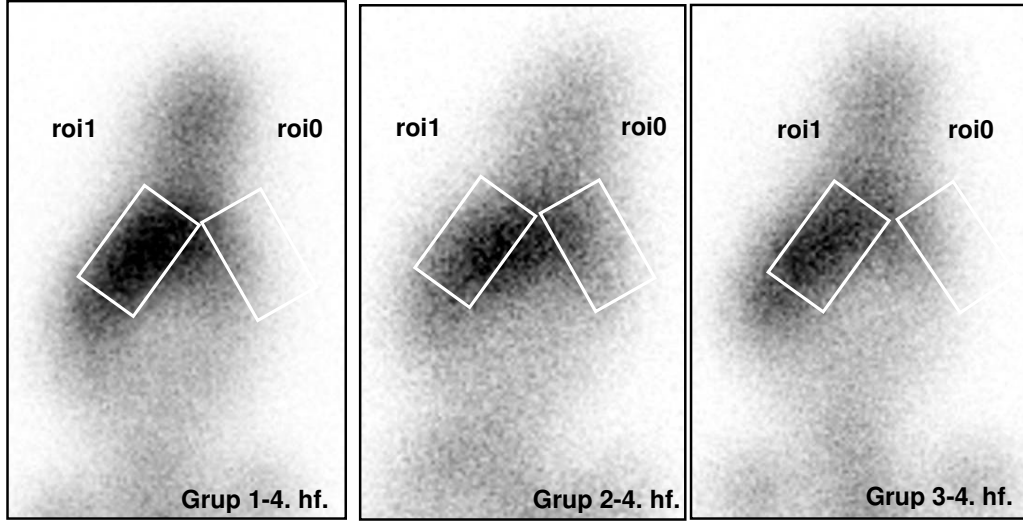
Resim 7. Grupların 4. hafta radyolojik görüntüleri. Kontrol grubu ve mezenşimal ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan grupların 4. haftadaki radyolojik görüntülerinde, distraksiyon aralığındaki kaynamanın tam olarak gerçekleştiği görülmektedir.

4.2.Sintigrafik Değerlendirme Sonuçları

Yapılan sintigrafik değerlendirme sonucunda, grup 1'deki (kontrol grubu) 2. ve 4. haftalardaki ortalama sintigrafik up-take oranları sırasıyla 5.02 ± 0.81 ve 3.71 ± 0.57 olarak bulundu. Bu değerler grup 2'de 3.20 ± 0.47 ve 2.70 ± 0.63 , grup 3'de 3.37 ± 0.62 ve 2.31 ± 0.63 olarak bulundu (Resim 8-9).



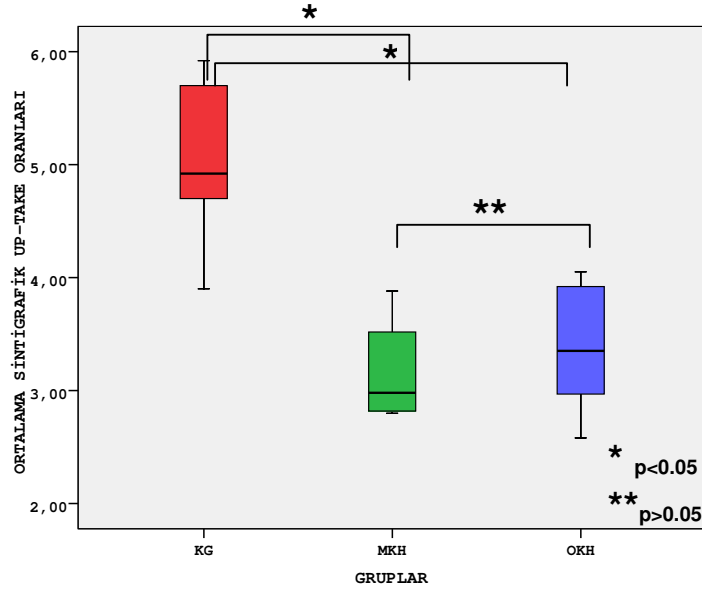
Resim 8. Grupların 2. haftadaki sintigrafik görüntüleri. Distraksiyon alanı ve karşı sağlam alan üzerinde eşit dikdörtgenler oluşturularak ortalama değerlerin sayım/pixel olarak hesaplanması.



Resim 9. Grupların 4. haftadaki sintigrafik görüntüleri. Distraksiyon alanı ve karşı sağlam alan üzerinde eşit dikdörtgenler oluşturularak ortalama değerlerin sayım/pixel olarak hesaplanması.

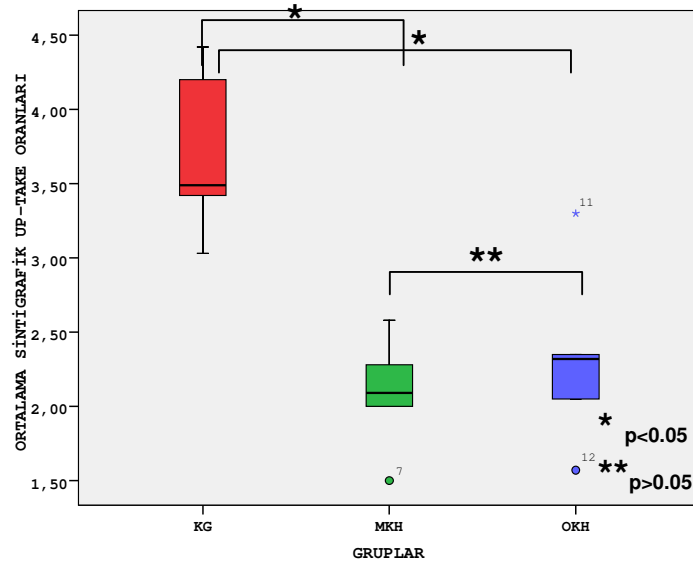
Mezenşimal kök hücre ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan 2. ve 3. gruptaki 2. haftalardaki sintigrafik up-take oranları kontrol

grubu (grup 1) ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$) (Şekil 10).



Şekil 10. 2.haftada gruplardan elde edilen ortalama sintigrafik up-take değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. Kontrol grubu (KG) ile mezenşimal kök hücre (MKH) ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre (OKH) uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). MKH ve OKH uygulanan gruplar arasında ise anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$).

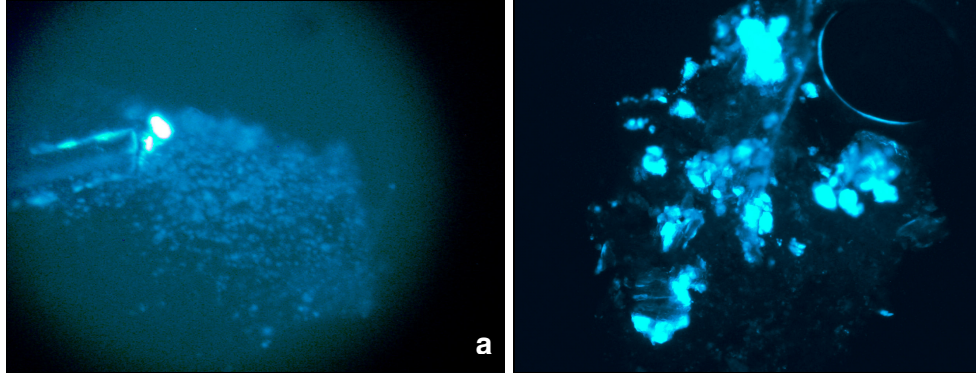
4. haftadaki sintigrafik up-take oranları değerlendirildiğinde ise kök hücre tedavisi uygulanan gruplar ile (grup 2 ve 3) kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. Grup 2 ve 3 arasında 2. ve 4. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0.05$) (Şekil 11).



Şekil 11. 4. haftada gruplardan elde edilen ortalama sintigrafik up-take değerlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi. Kontrol grubu (KG) ile mezenşimal kök hücre (MKH) ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre (OKH) uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). MKH ve OKH uygulanan gruplar arasında ise anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$).

4.3. İmmüno Floresan Görüntüleme

Konsolidasyon periyodunun 2. haftasında mezenşimal kök hücre ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre transplante edilen gruplardan elde edilen örnekler üzerinde yapılan immüno floresan incelemede DAPI ile işaretlenip distraksiyon aralığına transplante edilen ve mavi floresan veren kök hücre toplulukları görüldü. Elde edilen görüntüler verilen kök hücrelerin canlılığının göstergesi olarak değerlendirildi (Resim 10. a-b).

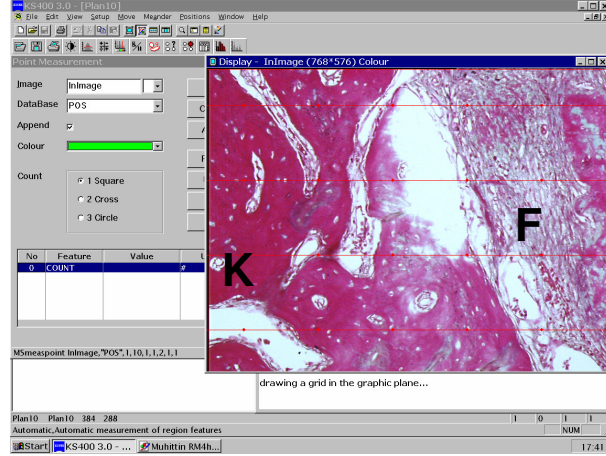


Resim 10. Konsolidasyon periyodunun 2. haftasında distraksiyon aralığından alınan örneklerden hazırlanan preparatlarda, DAPI ile işaretli kök hücrelerin immünfloresan mikroskopta mavi floresan veren görünüşleri izlenmektedir (a-b).

4.4.Histomorfometrik Değerlendirme Sonuçları

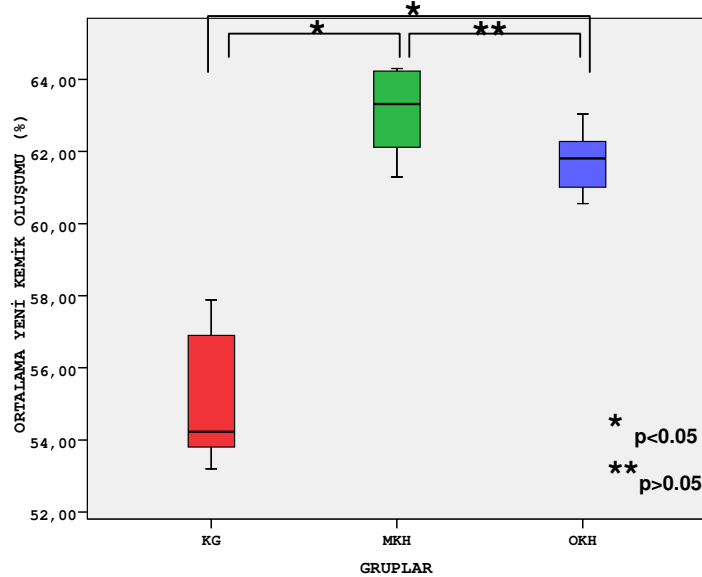
Histomorfometrik değerlendirmede ortalama yeni kemik oluşumu yüzdesi kontrol grubunda (grup 1) konsolidasyon periyodunun 2. ve 4. haftasında sırasıyla 55.20 ± 2.05 ve 87.03 ± 2.02 olarak saptandı.

Mezenşimal kök hücre uygulanan grupta ise bu değerler konsolidasyon periyodunun 2. ve 4. haftalarında sırasıyla 63.05 ± 1.32 ve 94.39 ± 3.52 olarak saptandı. Osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan grupta ise (grup 3) 2. ve 4. haftalarda yeni kemik oluşumu yüzdesi de 61.74 ± 0.98 ve 92.16 ± 1.97 olarak saptandı (Resim 11).



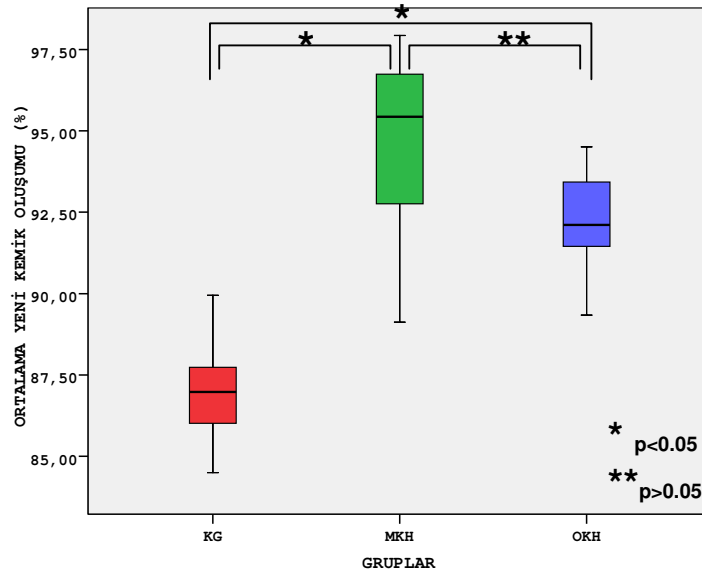
Resim 11. Mikroskop tabanlı görüntü analiz programı kullanılarak (Zeiss Vision KS 400 version 3.0 for Windows) yeni oluşan kemik/fibrozis oranlarının hesaplanması (K:kemik, F:fibrozis).

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonrasında konsolidasyon periyodunun 2. haftasında grup 2 ve 3 ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$). Grup 2 ile 3 arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p > 0.05$) (Şekil 12).



Şekil 12. Grupların 2. hafta histomorfometrik değerlerinin istatistiksel değerlendirmesi. Kontrol grubu (KG) ile mezenşimal kök hücre (MKH) ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre (OKH) uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). MKH ve OKH uygulanan gruplar arasında ise anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$).

Aynı şekilde konsolidasyon periyodunun 4. haftasında yapılan karşılaştırmada kök hücre uygulanan grup 2 ve 3 ile kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p < 0.05$). Mezenşimal kök hücre (grup 2) ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan (grup 3) gruplar arasında ise istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$) (Şekil 13).



Şekil 13. Grupların 4. hafta histomorfometrik değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi. Kontrol grubu (KG) ile mezenşimal kök hücre (MKH) ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre (OKH) uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). MKH ve OKH uygulanan gruplar arasında ise anlamlı fark bulunamadı ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Distraksiyon osteogenezis, kırık hattında oluşan kallus dokusuna aşamalı ve kontrollü olarak çekme-gerilme kuvvetinin uygulanması sonrası yeni kemik oluşması işlemidir. DO, konjenital veya edinsel kraniyofasyal iskeletsel anomalilerin cerrahi tedavisinde tercih edilen bir tedavi yöntemidir (1). DO ile başarılı sonuçlar elde edilmesine rağmen distraksiyon sonrası yeni kemik oluşumu için geçen süre yani konsolidasyon periyodunun uzun olması önemli bir dezavantajdır (6-8 hafta). Göreceli olarak uzun olan bu süreçte distraktörün takılı kalması en önemli problemlerden bir tanesidir. Buna ek olarak bu uzun süreçte ortaya çıkan ağrı, pinlerin gevşemesi ve buna bağlı distraktörün düşmesi, enfeksiyon ve kemik iyileşmesinin gecikmesi diğer önemli problemlerdir. Konsolidasyon periyodunun kısaltılmasına yönelik girişimlerin, bu problemlerin çözümünde önemli katkısı olacaktır.

Bu çalışmamızın sonucunda, rat mandibular distraksiyon modelinde distraksiyon alanına transplante edilen mezenşimal ve osteblast benzeri kök hücrelerin yeni kemik oluşumunu hızlandırdığı ve konsolidasyon periyodunu kısalttığı gözlemlendi. Radyolojik değerlendirmede, kök hücre transplante edilen gruplarda, kontrol grubuna göre, distrikte edilen kallus dokusunda kalsifikasyonun daha hızlı gerçekleştiği görülmekteydi. 2. haftada radyolojik olarak bu fark daha belirgin iken 4. haftada radyolojik olarak belirgin farklılık izlenmemekteydi. Sintigrafik değerlendirmede, ortalama sintigrafik up-take oranları, kök hücre uygulanan grup 2 ve 3'de 2. ve 4. haftalarda kontrol grubuna göre daha düşük olarak bulundu ($p<0.05$). Bu sonuçlara göre sintigrafik up-take oranının kemik iyileşmesi ile ters orantılı olduğu görüldü. 2. ve 4. haftada kök hücre uygulanan grup 2 ve 3'de sintigrafik up-take oranlarının daha düşük çıkması bu gruplarda yeni kemik oluşumunun kök

hücre uygulanmayan gruba göre daha hızlı olduğu anlamına gelmekteydi. Kök hücre uygulanan grup 2 ve 3 arasında ise 2. ve 4. hafta ortalama sintigrafik up-take oranları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Histomorfometrik değerlendirmede kök hücre uygulanan grup 2 ve 3' de, 2. ve 4. haftalarda ortalama yeni kemik oluşum oranının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görüldü. Bu istatikselsel olarak da anlamlıydı ($p<0.05$). Kök hücre uygulanan grupların 2. ve 4. hafta histomorfometrik değerlerinin karşılaştırmalarında ise aralarında istatikselsel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Histomorfometrik analiz sonuçları da göstermektedir ki hem mezenşimal kök hücreler hem de osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücreler distraksiyon aralığındaki yeni kemik oluşumunu arttırmaktadır.

Qi ve arkadaşları (66) yaptıkları çalışmada mandibular distraksiyon uyguladıkları ratlarda, distraksiyon aralığına, kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücre transplante etmişler ve sonuçta transplante ettikleri bu hücrelerin kallus dokusu ve yeni kemik oluşumunu arttırdığını ve konsolidasyon periyodunu kısalttığını bildirmişlerdir. Benzer diğersel bir çalışmada, distrikte edilen tavşan mandibulalarında distraksiyon aralığına osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre enjekte edilmiş ve enjekte edilen bu hücrelerin konsolidasyon fazını kısaltarak tedavi süresini ve olası komplikasyonları azalttığını bildirmişlerdir (67). Kitoh ve arkadaşları (65) akondroplazili ve konjenital tibial psödoartrozlu hastalarda, alt ekstremitede uyguladıkları distraksiyon işleminin sırasında distraksiyon aralığına kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücrelerin uygulanmasının, distraksiyon aralığının ortalama iyileşme indeksini 38.7 ile 23.0 gün/cm oranında arttırdığını göstermişlerdir.

Kök hücrelerin kemik iyileşmesinde ve yeni kemik oluşumunda nasıl etkili olduğu halen araştırılmaktadır. DO'de yeni kemik oluşumu, primitif mezenşimal hücreler, fibroblastlar, osteoklastlar, osteoblastlar ve bunların prekürsörleri gibi birçok hücreyi içeren kompleks bir süreçtir. Bu süreç içerisinde uygun mekanik uyarılar ile primitif mezenşimal hücreler klonal ekspansiyona uğrarlar ve sonrasında kemiği şekillendirecek olan hücrelere

farklılaşarak distraksiyon alanında yeni kemik oluşumunda anahtar bir rol oynarlar (69). Distraksiyon alanında oluşan yeni kemiğin yetersiz olması muhtemelen bu primitif hücrelerin hareketi, çoğalması veya farklılaşmasındaki bir problemden kaynaklanmaktadır. Bunun nedeni özellikle primitif hücre havuzunun azalması veya bu hücrelerin yerleşeceği bölgenin şiddetli travma veya radyoterapi nedeniyle hasarlanmış olmasıdır (70). Henüz lokal primitif mezenşimal hücrelerin kaynağına dair bir görüş birliği yoktur fakat kemik iliği muhtemel kaynak olarak düşünülmektedir (71). Kemik kırığı, kaynamaması veya kemik defekti olan alanlara kök hücre uygulanmasının kemik iyileşmesine yardımcı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (72,73).

Osteoblasta kadar farklılaştırılmış mezenşimal kök hücre veya osteoblast benzeri hücreler kemik iliği, periost, kortikal veya kansellöz kemikten izole edilebilir. Kemik iliği tercih edilen kaynaktır çünkü buradan hücreleri üretmek diğerlerine göre daha basit olmaktadır.

Mezenşimal kök hücreler ve mezenşimal kök hücre kaynaklı osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hücrelerin hepsinin nonimmünojenik oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (74). Allojenik olarak transplante edilen mezenşimal kök hücrelere karşı donörün alloreaktif lenfositlerinde herhangi bir artış saptanmamıştır (74-76). Bu fenomenin altında yatan mekanizma henüz tam olarak anlaşılammıştır. Her denekten kök hücre üretilmesinin zorluğu ve mezenşimal kök hücrelerin ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücrelerin nonimmünojenik olmaları nedeni ile biz çalışmamızda allojenik kök hücre kullandık.

Distraksiyon aralığına transplante edilen hücrelerin ne kadarının burada canlı kaldığı ve transplantasyon sonrası yeni kemik oluşumunda görev aldığıyla ilgili çalışmalar yapılmamıştır. Bununla birlikte bromodeoksiüridin veya radyoaktif izotoplar, kök hücrelerin yerlerinin ve canlı kalma oranlarının karşılaştırılmasında kullanılabilir. Bromodeoksiüridin seviyesi ve immünfloresan görüntüleme kök hücrelerin üreme

potansiyellerinin ve farklılaşma eğilimlerinin doğrulanmasında kullanılabilir. Hücrelerin distaksiyon alanının dışına yayılmasını önlemek için hücreler kollajen jel veya fibrin glue gibi bir taşıyıcı içerisinde verilebilir. Takamina ve arkadaşları (64), osteoblast benzeri hücrelerin distaksiyon aralığına kollajen jel ile karıştırılarak verilmesinin, yeni kemik oluşumu üzerine, hücrelerin tek başına verilmesinden daha etkili olduklarını göstermişlerdir.

Bu çalışmada tarafımızdan daha önce tasarlanmış ve modeli tanımlanmış rat mandibula distraktörü ve modeli kullanılmıştır (68). Bu modelin uygulanabilme kolaylığı ve avantajları daha önceki çalışmalarda ayrıntıları ile sunulmuştur (68, 77). Buna ek olarak küçük hayvan modellerinin büyük hayvan mandibular distaksiyon modelleri ile karşılaştırıldığında (koyun, tavşan, köpek, domuz gibi) önemli avantajları vardır. Sayılarının çokluğu ve daha kolay üretilip yetiştirilmeleri, daha ucuz olmaları, veri elde edebilmek için daha fazla hayvan kullanılabilmesi bu avantajlardan bazılarıdır. Bu çalışmada tanımlanan model çok başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Floresan bir boya olan 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) DNA' ya güçlü bir şekilde bağlanır, mavi floresan ışık verir. Distaksiyon osteogeneziste kök hücre uygulaması ile ilgili yapılan çalışmalarda, verilen kök hücrelerin distaksiyon aralığındaki varlığı gösterilmemiştir(63-67). Bu çalışmada diğer çalışmalardan farklı olarak kök hücreler DAPI ile işaretlenip transplante edilerek distaksiyon aralığındaki canlılıkları, immünfloresan mikroskopta, konsolidasyon periyodunun 2. haftasında gösterildi.

DO sırasında oluşan yeni kemiğin değerlendirilmesi amacı ile değişik görüntüleme yöntemleri kullanılmıştır (77, 78-80). Konvansiyonel radyolojik teknikler ile kallus dokusu ve yeni oluşan kemik hakkında yeterli bilgi elde edilememektedir. Kantitatif kemik sintigrafisinin, küçük hayvan modellerinde, distaksiyon osteogenezis sırasında oluşan yeni kemiğin değerlendirilmesinde etkili bir görüntüleme yöntemi olduğu daha önce

yapılmış olan çalışmada gösterilmiştir (77). Bu yöntem ek olarak yeni kemik oluşumu histomorfometri ile değerlendirilmiştir. Glowacki ve arkadaşları domuzlarda yaptıkları mandibular distraksiyon çalışmasında (81), histomorfometrik verilerin distrakte edilen kemiğin klinik olarak stabilitesi ile belirgin olarak uyduğunu göstermişlerdir. Distraksiyon aralığında yeni oluşan kemik miktarının, klinik olarak kemik stabilitesinin bir göstergesi olabileceğini savunmuşlardır. Bu çalışmada da histomorfometrik veriler klinik stabilite indeksi gibi kullanılmıştır.

Mezenşimal kök hücre ile osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre tedavisinin yeni kemik oluşumu üzerine etkileri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı. Ancak 2. ve 4. haftadaki ortalama sintigrafik up-take oranları mezenşimal kök hücre uygulanan 2. grupta osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre uygulanan 3. gruba göre rakamsal olarak daha düşüktü. Benzer şekilde yine grup 2 ve 3 de 2. ve 4. haftada elde edilen ortalama yeni kemik oluşum oranlarının rakamsal değerleri karşılaştırıldığında, her iki haftada da 2. grupta bu oranların daha yüksek olduğu saptandı. Bu fark her ne kadar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da mezenşimal kök hücrenin DO'de yeni kemik oluşumunda osteoblast benzeri hücrelerden daha etkili olabileceğini düşünmekteyiz. DO'de yeni kemik oluşumunun, primitif mezenşimal hücreler, fibroblastlar, osteoklastlar, osteoblastlar ve bunların prekürsörleri gibi birçok hücreyi içeren kompleks bir süreç olduğu ve mezenşimal kök hücrelerin yalnız osteoblasta farklılaşmayıp aynı zamanda bu bölgede kemik oluşumunda etkili diğer hücrelere de farklılaşarak daha etkili olabileceklerini düşünmekteyiz. Mezenşimal kök hücrelerin distraksiyon aralığında ihtiyaç duyulan farklı sitokinleri de salgılayarak iyileşme sürecini hızlandırabileceğine inanıyoruz. Mezenşimal kök hücre ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücrelerin distraksiyon aralığındaki davranışlarını inceleyen daha ayrıntılı çalışmalar yapılarak bu konu aydınlatılabilir.

Bu çalışmada, rat mandibular distraksiyon modelinde kök hücre tedavisi başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Rat mandibular distraksiyon modelinde allojenik mezenşimal ve osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücre tedavisinin, yeni kemik oluşumunu arttırdığı saptanmıştır. Bu tedavi yönteminin daha ayrıntılı çalışmalar sonrasında konsolidasyon periyodunun kısaltılması ve kemik iyileşmesinin hızlandırılması amacıyla kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. KAYNAKLAR

1. McCarthy J.G., Stelnicki E.J., Mehrara B.J., et al., Distraction osteogenesis of craniofacial skeleton, *Plast Reconstr Surg.*, 107: 1812-1827, 2001.
2. Ashinoff R.L., Cetrulo C.L., Galiano R.D. et al., Bone morphogenic protein-2 gene therapy for mandibular distraction osteogenesis, *Ann Plast Surg.*, 52: 585-590, 2004.
3. Cho B.C., Moon J.H., Chung H.Y. et al., The bone regenerative effect of growth hormone on consolidation in mandibular distraction osteogenesis of a dog model, *J Craniofac Surg.*, 14: 417-425, 2003.
4. Okazaki, H., Kurokawa T., Nakamura K., et al., Stimulation of bone formation by recombinant fibroblast growth factor-2 in callotaxis bone lengthening of rabbits, *Calcif. Tissue Int.*, 64: 542-545, 1999.
5. Bianco P., Riminucci M., Gronthos S., et al., Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications, *Stem Cells.*, 19:180, 2001.
6. Colter D.C., Class R., Digirolamo C.M., et al., Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow, *Proc Natl Acad Sci USA*, 97: 3213-3217, 2000.
7. Aronson J., Shen X.C., Gao G.G., Miller F., Quattlebaum T., Skinner R.A., Badger T.M., Lumpkin Jr.C.K., Sustained proliferation accompanies distraction osteogenesis in the rat, *J Orthop Res*, 15: 563–569, 1997.

8. Samchukov M.L., Cope J.B., Cherkashin A.M., Craniofacial Distraction Osteogenesis, Mosby Co. St Louis, 2001.
9. Meyer U., Wiesmann H.P., Kruse-Lösler B., Handschel J., Stratmann U., Joos U., Strain-Related Bone Remodelling in Distraction Osteogenesis of the Mandible. *Plast. Reconstr. Surg.*, 103: 800-807,1999.
10. Codivilla A., On the Means of Lengthening, in the Lower limbs, the Muscles and Tissue Which are Shortened Through Deformity, *Am. J. Orthop. Surg.*, 2: 353,1905 (29 no'lu kaynaktan alınmıştır).
11. Abbott L.C., The Operative Lengthening of Tibia and Fibula, *J. Bone Joint Surg.*, 9:128, 1927 (29 no'lu kaynaktan alınmıştır).
12. Kazanjian V.H., The Interrelationship of Dentistry and Surgery in the Treatment of Deformities of the Face and Jaws. *Am. J. Orthod. Oral Surg.*, 27:10-30,1941 (29 no'lu kaynaktan alınmıştır).
13. Crawford M.J., Selection of Appliances for Typical Facial Fractures, *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.*, 1: 442-451, 1948 (29 no'lu kaynaktan alınmıştır).
14. Trauner R., Obwegeser H., The Surgical Correction of Mandibular Prognathism and Retrognathia with Consideration of Genioplasty: Part I, Surgical Procedures to Correct Mandibular Prognathism and Reshaping of the Chin. *Oral Surg. Oral Med. Oral Path.*, 10: 677-689, 1957 (29 no'lu kaynaktan alınmıştır).
15. Cedars M.G., Linck D.L., Chin M., Toth B.A., Advancement of the Midface Using Distraction Techniques, *Plast. Reconstr. Surg.*, 103: 429-440,1999.

16. Snyder C.C., Levine G.A., Swanson H.M., Browne E.Z., Mandibular Lengthening by Gradual Distraction: Preliminary Report, *Plast. Reconstr. Surg.*, 51: 506-508,1973 (29 no'lu kaynaktan alınmıştır).
17. Michieli, S., Miotti, B.: Lengthening of Mandibular Body by Gradual Surgical-Orthodontic Distraction. *J. Oral. Surg.*, 35:187-192,1977 (29 no'lu kaynaktan alınmıştır).
18. Panikarovski V.V., Grigorian A.S., Kaganovich S.I., Osipian,E.M., Antipova, Z.P., Characteristics of Mandibular Reperative Osteogenesis under compression-distraction osteosynthesis: An experimental study, *Stomatolog*, 61:21-25,1982.
19. Karp N.S., McCarthy J.G., Schreiber J.S., Sissons H.A., Thorne OH., Membranous Bone Lengthening: A Serial Histological Study. *Ann. Plast. Surg.*, 29: 2,1992.
20. McCarthy J.G., Schreiber J., Karp N., Thorne C.H., Grayson H., Lengthening the Human Mandible by Gradual Distraction. *Plast. Recons. Surg.*, 89: 1-10, 1992.
21. Aytemiz C, Şengezer M., Gradual Distraction Technique in the Correction of Mandibular Deformities, *Plast. Recons. Surg.*, 11: 297-298,1992.
22. Polley .J.W., Figueroa A.A., Management of Severe Maxillary Deficiency in Childhood and Adolescence Through Distraction Osteogenesis with an External, Adjustable, Rigid Distraction Device. *J. Craniofac. Surg.*,8:181-185,1997.
23. Cohen S.R., Rutrick R.E., Burstein F.D., Distraction Osteogenesis of The Human Craniofacial Skeleton: Initial Experience with New Distraction System, *J Craniofac Surg.*,;6(5):368-74,1995.

24. Chin M., Toth B.A., Le Forte III Advancement with Gradual Distraction Using Internal devices , *Plast. Reconstr. Surg.*, 100: 819-832,1997.
25. Molina F., Combined Maxillary and Mandibular Distraction Osteogenesis, *Semin Orthod.* 5(1):41-5,1999.
26. De Bastiani G., Aldegheri R., Renzi-Brivio L., Trivella G., Limb Lengthening by Callus Distraction (callotaxis), *J Pediatr Orthop.* 7(2):129-34, 1987.
27. Monasterio F.O., Molina F., Andrade L., Rodriguez C., Arregui J.S., Simultaneous Mandibular and Maxillary Distraction in Hemifacial Microsomia in Adults: Avoiding Occlusal Disasters. *Plast. Reconstr. Surg.*, 100: 852-861,1997.
28. Hulth A., Current Concepts of Fracture Healing. *Clin Orthop Relat Res.*, (249):265-84,1989.
29. Cope J.B., Samchukov M.L, Cherkashin A..M., Mandibular Distraction Osteogenesis: A Historic Perspective and Future Directions. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 115: 448-460,1999.
30. Smith S.W., Sachdeva R.C.L, Cope J.B., Evaluation of the Consolidation Period During Osteodistraction Using Computed Tomography. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 116: 254-263,1999.
31. Cedars M.G., Linck D.L, Chin M., Toth B.A., Advancement of the Midface Using Distraction Techniques, *Plast. Reconstr. Surg.*, 103: 429-440,1999.

32. Samchukov M.L., Cope J.B., Harper R.P., Ross J.D., Biomechanical Considerations of Mandibular Lengthening and Widening by Gradual Distraction Using a Computer Model. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 56: 51-59,1998.
33. Ilizarov G.A.: The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues: Part II. The Influence of the Rate and frequency of Distraction. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 239: 263-85,1989.
34. Annino D.J., Goguen L.A., Karmody C.S., Distraction Osteogenesis for Reconstruction of Mandibular Symphyseal Defects. *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.*, 120:911-916,1994.
35. Cope J.B., Samchukov M.L., Mineralization Dynamics of Regenerate Bone During Mandibular Osteodistraction. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 30:234-242, 2001.
36. Al Ruhaimi K.A., Comparison of Different Distraction Rates in the Mandible: An Experimental Investigation. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 30:220-227,2001.
37. Dessner S., Razdolsky Y., El-Bialy T., Evans C.A., Mandibular Lengthening Using Preprogrammed Intraoral Tooth-bome Distraction Devices *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 57: 1318-1322, 1999.
38. Illizarov G.A., The Tension-Stress Effect on the Genesis and Growth of Tissues: Part I), The Influence of the Rate and Frequency of Distraction. *Clin. Orthop. Rel. Res.*, 239: 263-285,1989.
39. Cope J.B., Samchukov M.L., Regenerate Bone Formation and Remodelling During Mandibular Osteodistraction, *Angle Orthod.*, 70: 99-111,2000.

40. Samchukov M.L., Cope J.B., Cherkasbin A.M., The Effect Of Saggital Orientation Of The Distractor On The Biomechanics Of Mandibular Lengthening. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 57: 1214-1222, 1999.
41. Ahn J., Figueroa A.A, Braun S., Polley J.M., Biomechanical Considerations in Distraction of the Osteotomized Dentomaxillary Complex. *Am. J. Orthod. Dentofacial. Orthop.*, 116: 264-270,1999.
42. Douglas L.R., Dougless J.B., Nakeeb S., Smith P.J., Al Rubaiya A., Intraoral Distraction Osteogenesis in the Boboon Mandible Using a Tooth and Bone-Anchored Appliance. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 58: 48-54, 2000.
43. Molina F., Monasterio F.O., Mandibular Elongation and Remodelling by Distraction: A Farewell to Majör Osteotomies. *Plast. Reconstr. Surg.*, 96:825-840,1995.
44. Yen L.K., Wei S., Li, S., Shuler C, Yamashita D.D., Bending of the Distraction Site During Mandibular Distraction Osteogenesis in the Rabbit: A Model for Studying Segment Control and Side Effects. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 59: 779-788,2001
45. Aksakoğlu G, Sağlıkta Araştırma Teknikleri ve Analiz Yöntemleri, DEÜ Rektörlük Matbaası, İzmir, 2001.
46. Yasui N., Kojimoto H, Shimizu H., Shimomura Y, The Effect of Distraction upon Bone, Muscle, and Periosteum. *Orthopedic Clinics of North America*, 22: 563-567,1991.
47. Fisher, E., Staffenberg D.A., McCarthy J.G., Miller D.C., Zeng. J.: Histopathologic and Biochemical Changes in the Muscles Affected by Distraction Osteogenesis of the Mandible. *Plast Reconstr. Surg.*, 99: 366-371, 1997.

48. Block M.S., Daire J., Stover J., Matthews M., Changes in the Inferior Alveolar Nerve Following Mandibular Lengthening in the Dog Using Distraction Osteogenesis. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 51. 652-660,1993.
49. Haftek J., Stretch Injury of Peripheral Nerve. Acute effects of stretching on rabbit nerve. *J Bone Joint Surg Br.* 52(2):354-65,1980.
50. Figueroa A.A, Polley J.W., Management of Severe Cleft Maxillary Deficiency with Distraction Osteogenesis: Procedure and Results. *Am. J. Orthod. Dentofacial Orthop.*, 115: 1-12, 1999.
51. Ascherman J.A., Marin V.P., Rogers L., Prisant N., Palatal Distraction in a Canine Cleft Palate Model, *Plast. Reconstr. Surg.*, 105:1687-1694, 2000.
52. Kessler P., Wiltfang J., Schultze-Mosgau S., Hirschfelder U., Neukam F.W., Distraction Osteogenesis of the Maxilla and Midface Using a Subcutaneous Device: Report of Four Cases. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 39:13-21, 2001.
53. Kramer F.J., Mueller M., Rahmstorf M., Swennen G., Dempf R.Schierle H., Craniofacial Reconstruction By Transport Distraction Osteogenesis: Corticotomy Versus Osteotomy-An Experimental Study: *The Journal of Craniofacial Surgery.*15(4):556-565, 2004.
54. Swennen G., Schutyser F., Mueller MC., Kramer FJ., Eulzer C., Schliephake D., Effect Of Platelet-Rich-Plasma On Cranial Distraction Osteogenesis in Sheep: Preliminary Clinical and Radiographic Results, *Int. Oral Maxillofac.Surg.*, 34:294-304, 2005.

55. Cohen S.R., Craniofacial Distraction with a Modular Internal Distraction System: Evolution of Design and Surgical Techniques. *Plast. Reconstr. Surg.*, 103:1592-1608, 1999.
56. Gateno J., Teichgraeber J.F., Aguilar E., Computer Planning for Distraction Osteogenesis, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 105:873-882, 2000.
57. Weissman I.L., Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities, *Science* 287:1442-1446, 2000.
58. Verfaillie C.M., Adult stem cells: assessing the case for pluripotency, *Trends in Cell Biology*, 12:502-508, 2002.
59. Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284:143-147, 1999.
60. Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F. et al. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep, *Nat Med* 6:1282-1286, 2000.
61. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey PG., Shi S., Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo, *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13625–13630, 2000.
62. Halvorsen Y.D., Franklin D., Bond A.L. et al., Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 7: 729–741, 2001.
63. Tsubota S., Tsuchiya H., Shinokawa Y., Tomita K. and Minato H., Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *Br. J. Bone Joint Surg. (Br.)* 81: 125, 1999.

64. Takamine Y., Tsuchiya H., Kitakoji T. et al. , Distraction osteogenesis enhanced by osteoblastlike cells and collagen gel, *Clin. Orthop.* 399: 240, 2002.
65. Kitoh H., Kitakoji T., Tsuchiya H. et al. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis: A preliminary result of three cases, *Bone* 35: 892, 2004.
66. Qi M., Hu J., Zou S., Zhou H., Han L. Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone marrow mesenchymal stem cells in rats, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 34: 283-289, 2006.
67. Shao Z., Liu B., Peng Q., Liu W., Liu Y., Liu R., Xu Y., Liu L. Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. *Plast. Reconstr. Surg.* 119: 500-507, 2007.
68. Eski M., Nişancı M., Cil Y., Şengezer M., Ozcan A., A custom-made distraction device for experimental mandibular distraction osteogenesis. Brief clinical notes. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 16(4): 675-83, 2005.
69. Aronson J., Shen X.C., Gao G.G., Miller F., Quattlebaum T., Skinner RA., Badger T.M., Lumpkin Jr. C.K., Sustained proliferation accompanies distraction osteogenesis in the rat, *J Orthop Res* 15: 563–569, 1997.
70. Holmes S.B., Lloyd T., Coghlan K.M., Newman L., Distraction osteogenesis of the mandible in the previously irradiated patient, *J Oral Maxillofac Surg* 60: 305–309, 2002.
71. Yoo JU., Johnstone B., Mesenchymal stem cells and musculoskeletal repair, *Curr Opin Orthop* 11: 391–396, 2000.

72. Nolan P. C., Nicholas R. M., Mulholland B. J. et al. , Culture of human osteoblasts on demineralised human bone: Possible means of graft enhancement. *J. Bone Joint Surg. (Br.)* 74: 284, 1992.
73. Krzymanski G., Kalczak M. and Wiktor-Jedrzejczak W. , The use of bone-marrow-derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: An experimental study, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 26: 55, 1997.
74. Le Blanc K.C., Tammik K. ,Rosenthal E., Zetterberg and O. Ringde´n., HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol.* 31: 890–896, 2003.
75. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al., Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* , 30:42–48, 2002.
76. Maitra B., Szekely E., Gjini K. et al., Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* , 33: 597–604, 2004.
77. Eski M., Ilgan S., Cil Y., Sengezer M., Ozcan A., Yapici K. Assessment of distraction regenerate using quantitative bone sintigraphy, *Annals of Plastic Surgery* 58 (3): 328-34, 2007.
78. Swennen G.R.J., Eulzer C., Schutyser F. et al., Assessment of the distraction regenerate using three-dimensional quantitative computer tomography, *Int J Oral Maxillofac Surg.*, 34: 64 –73, 2005.
79. Troulis M.J., Coppe C., O'Neill MJ. et al. Ultrasound: assessment of the distraction osteogenesis wound in patients undergoing mandibular lengthening, *J Oral Maxillofac Surg.* 61: 1144 –1149, 2003.

80. Schwartz D.A., Arman K.G., Elmeligy A. et al., Dual energy x-ray absorptiometry vs MCT analysis of BMD in mandibular distraction osteogenesis, *Plast Reconstr Surg.* 116(suppl):37, 2005.
81. Glowacki J., Shusterman M.E., Troulis M. et al., Distraction osteogenesis of the porcine mandible: histomorphometric evaluation of bone. *Plast Reconstr Surg.* 113: 566 –573, 2004.