

**T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI**

**SPİNAL FÜZYONDA MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE VE
ERİTROPOETİN KOMBİNASYONUNUN ETKİNLİĞİ**

**Ahmet Burak BİLEKLİ
Dz. Tbp. Yzb.**

**Ortopedi ve Travmatoloji Uzmanlık Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**ANKARA
2014**

T.C.
GENELKURMAY BAŞKANLIĞI
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ
ASKERİ TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

SPİNAL FÜZYONDA MEZENŞİMAL KÖK HÜCRE VE
ERİTROPOETİN KOMBİNASYONUNUN ETKİNLİĞİ

Ahmet Burak BİLEKLİ
Dz. Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi
Askeri Tıp Fakültesi'nin
Ortopedi ve Travmatoloji Uzmanlık Programı
için öngördüğü
TIPTA UZMANLIK TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Doç. Hv. Tbp. Kd. Alb. Erbil OĞUZ

ANKARA
2014

GATA Askeri Tıp Fakültesi Dekanlığına;

“Spinal Füzyonda Mezenşimal Kök Hücre ve Eritropoetin Kombinasyonunun Etkinliği” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı’nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Hv. Tbp. Kd. Alb. Erbil OĞUZ (GATA)

Başkan : Prof. Dz. Tbp. Alb. Servet TUNAY (GATA)

Üye : Prof. Hv. Tbp. Alb. Cemil YILDIZ (GATA)

Üye : Doç. Hv. Tbp. Kd. Alb. Erbil OĞUZ (GATA)

Yedek Üye : Doç. Hv. Tbp. Alb. Doğan BEK (GATA)

ONAY:

Dz. Tbp. Yzb. Ahmet Burak BİLEKLİ’nin 04.07.2014 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu’nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Mustafa BAŞBOZKURT

Prof. Tbp. Tuğgeneral

GATA Komutan Bilimsel Yardımcısı

Askeri Tıp Fakültesi Dekanı ve

Eğitim Hastanesi Baştabibi

TEŞEKKÜR

“Spinal Füzyonda Mezenşimal Kök Hücre ve Eritropoetin Kombinasyonunun Etkinliği” adlı tez çalışması, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanlığı’nın “12 Mart 2013 tarih ve ORT. ve TRAVM.: 95646640–3700–302–13/İd.İşl. (1572)-302” sayılı emri gereği Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı’nda yapılmış ve GATA Araştırma Bilimsel Kurulu’nun 07 Mart 2014 tarih ve (231) 02 sayılı toplantısında kabul edilen AR–2014/04 numaralı araştırma projesi kapsamında yürütülmüştür.

Türkiye’nin öncü Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği olan Gülhane Askeri Tıp Akademisi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği ailesinin bir ferdi olmak benim için her zaman mutluluk ve gurur kaynağı olacaktır. Askeri tıbbın “en zorlu” branşlarından biri olarak görülen bu yuvada geçirdiğim beş yıllık süre içerisinde cerrahi bilgi ve prensipler, özgüven ve disiplin adına çok şeyler kazandım.

Bu süreçte önderliği, engin bilgi birikimi ve tecrübesi ile bana yol gösteren Sayın Dekan’ımız Prof. Tbp. Tuğg. Mustafa BAŞBOZKURT’a; titizliği, cerrahi disiplini ve hasta takibi konusunda bizlere örnek olan Anabilim Dalı Başkan’ımız Prof. Dz. Tbp. Alb. Servet TUNAY’a; hoşgörüsü, sabrı ve güler yüzü ile hepimize örnek olan, yaratıcı fikirleri ve tasarımları ile bilimsel araştırma ve geliştirme konusunda ufkumu açan, bana olan güveni ile omurga cerrahisi konusunda birçok işlemi uygulamamı sağlayan ve kendime olan inancımı kaybettiğimde bile bana inanmaktan vazgeçmeyip bu çalışmayı ve uzmanlık eğitimimi tamamlamama destek olan tez danışmanım, değerli hocam Doç. Hv. Tbp. Kd. Alb. Erbil OĞUZ’a; cerrahi bilgi, beceri ve tecrübelerini bizimle paylaşan Prof. Hv. Tbp. Alb. Cemil YILDIZ, Doç. Hv. Tbp. Alb. Doğan BEK, Doç. Tbp. Alb. Hüseyin ÖZKAN, Doç. Tbp. Yb. Mustafa KÜRKLÜ, Doç. Hv. Tbp. Alb. Yalçın KÜLAHÇI, Doç. Tbp. Yb. Yüksel YURTTAŞ, Doç. Tbp. Yb. Kenan KOCA, Yrd. Doç. J. Tbp. Bnb. Tolga EGE,

Uzm. Tbp. Alb. Adnan PARKAN ve Uzm. Tbp. J. Yb. Selim TÜRKKAN'a teşekkürlerimi bir borç bilirim.

GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği'ne atanan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli ağabeyim Doç. J. Tbp. Yb. Serkan BİLGİÇ ve hocam Prof. J. Tbp. Alb. İbrahim YANMIŞ'a; mecburi hizmetini tamamlayıp aramızdan ayrılan değerli ağabeyim Uzm. Tbp. Bnb. Erden KILIÇ'a; emekli olması nedeniyle aramızdan ayrılan, ancak her zaman ağabeyliğini ve desteğini yanımda hissettiğim değerli hocam Prof. Dr. Bahtiyar DEMİRALP'e; kişiliği ve karizması ile hepimize örnek olan, birçok kişiye doktor olması için ilham veren ve bana omurga cerrahisini sevdiren değerli hocam Prof. Dr. M. Ali ŞEHİRLİOĞLU'na minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca 2009 yılında aramızdan ayrılan ve az da olsa birlikte çalışma şansını yakaladığım değerli hocam Prof. Dz. Tbp. Alb. A. Sabri ATEŞALP'i rahmetle anıyorum.

Oldukça meşakkatli ve yorucu bir çalışma süreci olan bu hayvan deneyini tamamlayabilmem için birçok Anabilim Dalı Öğretim Üyesi ve personelinin desteğini gördüm. Bu süreçte:

İntörnken birlikte çalışabilme şansına eriştiğim ve o tarihten itibaren benden yardımlarını ve güler yüzünü esirgemeyen, değerli ağabeyim, Nefroloji Bilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Tbp. Alb. Tayfun EYİLETEN ve misafirperverlikleri için tüm Nefroloji Bilim Dalı personeline teşekkürlerimi sunarım.

Mezenşimal kök hücre üretimi ve uygulaması konusunda bana Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nin imkân ve kabiliyetlerinin ne kadar geniş olduğunu gösteren; Kanser ve Kök Hücre Kısım Başkanı ve Hematoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dz. Tbp. Alb. Ferit AVCU ve Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kanser ve Kök Hücre Kısım Başkanlığı'ndan

Svl. Me. Uzm. Biyolog Pınar ELÇİ ve Svl. Me. Uzm. Biyolog Meral SARPEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Radyolojik incelemeler konusunda desteğini aldığım Radyolojik Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Tbp. Kd. Alb. Şahin UĞUREL ve Radyoloji Anabilim Dalı'nda görevli Tek. Hv. Kd. Bçvş. Murat OĞUZ, Tek. Bçvş. Engin DÖNMEZ, Tek. Dz. Bçvş. Erman DOĞRU, Tek. Bçvş. Evren ULAŞ, Tek. J. Kd. Üçvş. Özkan ŞİMŞEK, Tek. Dz. Kd. Üçvş. Harun ÇAKMAK, Tek. Hv. Üçvş. Sadık ERKOÇ, Svl. Me. Burcu ERYILMAZ ve Svl. Me. Adem YAZKAN'a teşekkürlerimi sunarım.

Yoğun çalışma temposu içerisinde hafta sonu bile bana vakit ayıran değerli ağabeyim Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Tbp. Yb. Yıldırım KARSLIOĞLU'na ve preparatların hazırlanması konusundaki destekleri için Patoloji Anabilim Dalı'ndaki görevli tüm personele teşekkürlerimi sunarım.

Misafirperverlikleri ve yardımları nedeniyle kendimi evimde gibi hissettiğim; mesaimin büyük bir kısmını birlikte geçirdiğim Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Kısmı'ndan Vet. Hekim Alb. Ali KARABACAK, Vet. Hekim Atđm. Murat KARAKAYA, Svl. Me. vet. Hekim Berk Alp GÖKSEL'e; Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Cerrahi Araştırma Kısmı'ndan Dr. vet. Hekim Tđm. Enes ATMACA, Dr. vet. Hekim Atđm. Fatih YAZICI, Tek. Kd. Bçvş. Enver KUNTAY ve görevli tüm personele; GATA Medikal Tasarım ve Üretim Merkez Başkanlığı'ndan Yük. Mak. Müh. Osman DEMİR, Eikt. Müh. Burcu VARDAR, Bme. Müh. Erhan Murat ASLAN, Bil. Müh. Ezgi ŞAHİN, Mkt. Müh. Safi Serdar ÇINAR, Mak. Müh. Ahmet Murat DURSUN ve Sağ. Kd. Bçvş. Sadık TÜRKMEN'e minnet ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca, tezin istatistiksel analizlerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Biyoistatistik Bilim Dalı Başkanı Doç. Tbp. Alb. Cengizhan AÇIKEL'e; bilgisayarlı tomografi protokollerinin belirlenmesi sırasındaki teknik desteklerinden dolayı Türkiye Toshiba Tıbbi Sistemlerden BT Klinik

Aplikasyon Müdürü Sayın Vural DİLER ve BT Aplikasyon Uzmanı Sayın Alper Aktepe'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Başarılı kurs programları sayesinde deney hayvanları ile çalışma konusunda birçok pratik ve teorik bilgi edindiğim Gazi Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nin tüm çalışanlarına teşekkürlerimi sunuyorum.

Tez çalışmamda en büyük desteği veren, çalışmaların tüm aşamalarında mesai mevhumu gözetmeksizin yanımda olan ve kahrımı çeken değerli kardeşim Hv. Tbp. Yzb. Çağrı NEYİŞÇİ'ye ayrıca teşekkürlerimi sunuyorum.

Uzmanlık eğitimim süresince, birlik ve beraberlik ruhu içerisinde çalıştığım dönem arkadaşlarım Tbp. Bnb. Nuri MENEKŞEOĞLU, Tbp. Yzb. Yusuf ERDEM ve Tbp. Ütğm. Arsen ARSENİSHVİLİ başta olmak üzere tüm asistan ağabeylerime ve kardeşlerime teşekkürlerimi sunarım. Ratların cerrahisi sırasında mesai mevhumu gözetmeksizin bana yardımcı olan değerli kardeşlerim Hv. Tbp. Kd. Ütğm. Engin YALÇIN ve Hv. Tbp. Kd. Ütğm. Hakan ZEYBEK'e ayrıca teşekkür ediyorum.

Uzmanlık eğitimim boyunca bende emeği geçen bütün klinik, ameliyathane, poliklinik, suni aza laboratuvarı çalışanlarına, hemşire, fizyoterapist, sekreter ve diğer personellerimize teşekkür ederim.

Son olarak, teşekkürlerin en büyüğünü hak eden; fedakârlık ve destekleri ile bu günlere gelmemi sağlayan babam E. Dz. Topçu Kd. Bçvş. Can BİLEKLİ, annem Hatice BİLEKLİ ve kardeşim Kaan BİLEKLİ'ye sevgi, saygı ve minnetlerimi sunuyorum.

ÖZET

Ahmet Burak BİLEKLİ, “Spinal Füzyonda Mezenşimal Kök Hücre Ve Eritropoetin Kombinasyonunun Etkinliği”, Gülhane Askeri Tıp Akademisi Askeri Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Ankara, 2014.

Çalışmamızda EPO ve MSC’lerin birlikte kullanımının ratlarda posterior ve posterolateral spinal füzyona olan etkileri değerlendirilmiştir.

Çalışma için 77 adet Sprague-Dawley cinsi dişi rat kullanılmıştır. Sadece EPO uygulanan, sadece MSC uygulanan, EPO+MSC kombine olarak uygulanan ana çalışma grupları ve kontrol grupları erken ve geç dönem ile preoperatif/postoperatif EPO alt gruplarına bölünerek toplam 11 gruba ayrılmıştır. Negatif kontrol grubu hariç tüm gruplara L4-L5 posterior+posterolateral spinal füzyon cerrahisi uygulanmış ve sonuçlar direkt grafi, MDBT, manuel palpasyon ve histopatolojik inceleme ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak, 500 IU/kg/gün dozunda intraperitoneal EPO uygulamasının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında kırık ve kemik doku gelişimini geciktirerek füzyon oranlarını olumsuz etkilediği; osteoblastik farklılaşmaya uğratılmamış MSC’lerin skafold olmadan cerrahi bölgesine uygulanmasının kontrol ve EPO grupları ile karşılaştırıldığında füzyon oranlarını arttırdığı; bu iki uygulamanın kombine edilmesinin ise füzyon oranlarını daha çok arttırdığı bulunmuştur. Ek olarak, preoperatif 24. saat ve postoperatif 72. saat EPO uygulaması arasında anlamlı fark olmadığı saptanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: spinal füzyon, eritropoetin, mezenşimal kök hücre, MDBT, Mimics

Destekleyen Kurumlar: Gülhane Askeri Tıp Akademisi Araştırma Bilimsel Kurulu, AR–2014/04 numaralı araştırma projesi.

SUMMARY

Ahmet Burak BİLEKLİ, “Spinal Füzyonda Mezenşimal Kök Hücre Ve Eritropoetin Kombinasyonunun Etkinliği”, Gulhane Military Medical Academy Military Medical Faculty, Department of Orthopaedics and Traumatology, Orthopedics and Traumatology Residency Thesis, Ankara, 2014.

In this study, we investigated the efficacy of EPO and MSC combination at a rat posterior and posterolateral spinal fusion model.

77 female Sprague-Dawley rats were used for this study. Study groups were designed as “EPO only”, “MSC only”, “EPO and MSC combination” and “control” groups. A total of 11 groups were formed after designing “negative and positive (sham) control groups”, “preoperative 24th and postoperative 72th hour EPO administration groups” and “3th and 6th week groups”. All groups underwent L4-L5 posterior and posterolateral spinal fusion surgery, except the negative control group. Plain radiographs, MDCT scans, manuel palpation assesment and histopathological analyses were performed to assess fusion.

Our results suggest that, administration of intraperitoneal rhuEPO (500 IU/kg/day) decreases fusion rates compared to control groups. Also, administration of MSCs with no osteoblastic diffetantiation and without scaffold usage; increases fusion rates compared to control and EPO only groups. At last, combination of EPO and MSCs further increases fusion rates compared to control, EPO only and MSC only groups. Also there were no significant differance between preoperative 24th and postoperative 72th hour EPO administrations.

Keywords: Rat, spinal fusion, erythropoietin, mesenchymal stem cell, MDCT, Mimics.

Supported by: Gulhane Military Medical Academy Research Scientific Board, AR–2014/04 research project.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ONAY	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
İÇİNDEKİLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiv
ŞEKİLLER	xvi
TABLolar	xxi
GİRİŞ	1
1.1. Amaç.....	2
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Spinal Füzyon	3
2.1.1. Tanımı	3
2.1.2. Tarihçesi.....	4
2.2. Kemik Anatomisi ve Histolojisi	6
2.2.1. Osteoblastlar	6
2.2.2. Osteositler	6
2.2.3. Osteoklastlar	7
2.2.4. Hematopoetik Hücreler	7
2.2.5. Kemik Matriksi	7
2.2.6. Kemik Doku Mineralizasyonu	8
2.2.7. Kemik Tipleri.....	8
2.2.8. Kemik İyileşmesinin Biyolojisi	9
2.2.9. Kemik Metabolizmasının Düzenleyicileri	15
2.2.10. Hormon ve Vitaminler	16
2.2.11. Büyüme Faktörleri, Sitokinler ve Sinyal Molekülleri	16
2.3. Eritropoetin	22
2.3.1. Tanımı	22

2.3.2. Tarihçesi.....	23
2.3.3. Eritropoetin Üretiminin Düzenlenmesi	24
2.3.4. Eritropoetin Nöroprotektif Etkileri	26
2.3.5. Eritropoetin Kardiyoprotektif Etkileri.....	26
2.3.6. Eritropoetin Renal Protektif Etkileri	27
2.3.7. Eritropoetin Yara İyileşmesi ve Anjiyogeneze Etkisi	28
2.3.8. Eritropoetin ve Osteogenez	28
2.4. Kök Hücreler	31
2.4.1. Tanım	32
2.4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Tanımlanması	34
2.4.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Tedavide Kullanımı	35
2.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Kemik İyileşmesi ve Spinal Füzyonda Kullanımı	36
2.5.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin Sistemik İnfüzyonu	38
2.5.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Tedavi Bölgesine Direkt Enjeksiyonu	38
2.5.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Skafold Özellikli Maddelerle Kombinasyonu	39
2.5.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin Büyüme Faktörleri ve Sitokinler ile Kombinasyonu	40
2.5.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Genetik Modifikasyon Sonrasında Kullanımı.....	41
2.6. Eritropoetin ve Mezenşimal Kök Hücrelerin Birlikte Kullanımı.....	42
2.7. Hayvan Deneyleri ile İlgili Genel Bilgiler.....	44
2.8. Spinal Füzyonda Hayvan Deneyi Modelleri	46
2.8.1. Tavşan Modelleri	46
2.8.2. Rat Modelleri	47
GEREÇ VE YÖNTEM	49
3.1. Etik Kurul ve Proje Onayı	49
3.2. Örnek Büyüklüğünün Seçimi.....	49
3.3. Çalışma Tasarımı.....	49
3.3.1. Deney Hayvanları	49

3.3.2. Deney Grupları	50
3.3.3. Ratların İşaretlenmesi ve Randomizasyon	51
3.3.4. Anestezi.....	54
3.3.5. Radyolojik Değerlendirme	55
3.4. Mezenşimal Kök Hücre Elde Edilmesi	66
3.4.1. Mezenşimal Kök Hücre Uygulaması.....	69
3.5. Cerrahi Öncesi Hazırlıklar	69
3.5.1. Antibiyotik Profilaksisi	69
3.5.2. Cerrahi Aletlerin Hazırlanması.....	69
3.5.3. Cerrahi Alanın Hazırlanması	70
3.6. Cerrahi Teknik	71
3.7. Cerrahi Sonrası Bakım.....	73
3.8. Enjeksiyon Uygulamaları	74
3.8.1. Rekombinant İnsan Eritropoetini	74
3.8.2. Serum Fizyolojik	75
3.8.3. Sefazolin Sodyum.....	75
3.9. Ratların Sakrifikasyonu	78
3.10. Manuel Palpasyon	78
3.11. Histopatolojik İnceleme	79
3.11.1. Dekalsifikasyon	80
3.11.2. Örnekleme	80
3.11.3. Doku Takibi	81
3.11.4. Kesit alınması	81
3.11.5. Hematoksilen & Eozin ile Boyama.....	82
3.11.6. Değerlendirme	82
3.12. İstatistiksel Değerlendirme.....	82
BULGULAR.....	84
4.1. Direkt Grafi Bulguları.....	84
4.2. Bilgisayarlı Tomografi ve Hacim Ölçümü Bulguları	85
4.3. Manuel Palpasyon Bulguları	107
4.4. Histopatolojik İnceleme Bulguları	108
4.5. Komplikasyonlar.....	115

TARTIŞMA	116
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	125
KAYNAKLAR	127

SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	: Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu (<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>)
ALP	: Alkalen Fosfataz (<i>Alkaline Phosphatase</i>)
BMP	: Kemik Morfojenik Protein (<i>Bone Morphogenic Protein</i>)
BMP-R	: Kemik Morfojenik Protein Reseptörü (<i>Bone Morphogenic Protein Receptor</i>)
BMSC	: Kemik İliği Stromal Hücreleri (<i>Bone Marrow Stromal Cells</i>)
BT	: Bilgisayarlı Tomografi
C-EPO	: Karbamile EPO (<i>Carbamilated EPO</i>)
CFU-E	: Eritroid Koloni Oluşturucu Birim (<i>Colony Forming Unit - Erythroid</i>)
DBM	: Demineralize Kemik Makriksi (<i>Demineralized Bone Matrix</i>)
EPC	: Eritroid Öncül Hücre (<i>Erythroid Progenitor Cell</i>)
EPO	: Eritropoetin (<i>Erythropoietin</i>)
EPO-R	: Eritropoetin Reseptörü (<i>Erythropoietin Receptor</i>)
ESC	: Embriyonik Kök Hücre (<i>Embryonic Stem Cell</i>)
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GH	: Büyüme Hormonu (<i>Growth Hormone</i>)
GİS	: Gastrointestinal sistem
GLUT1	: Glukoz Taşıyıcısı 1 (<i>Glucose Transporter 1</i>)
GM-CSF	: Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü (<i>Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor</i>)
HIF1	: Hipoksi ile Uyarılabilen Faktör 1 (<i>Hypoxia-Inducible Factor 1</i>)
HOBIT	: İnsan Osteoblast benzeri Öncül Transfektan hücreleri (<i>Human Osteoblast-like Initial Transfectant Cells</i>)
HPC	: Hematopoetik Öncül Hücre (<i>Hematopoietic Progenitor Cell</i>)
HSC	: Hematopoetik Kök Hücre (<i>Hematopoietic Stem Cell</i>)
IGF	: İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (<i>Insulin-Like Growth Factor</i>)
IL-1	: İnterlökin-1

IL-6	: İnterlökin-6
iNOS	: İndüklenebilen Nitrik Oksit Sentaz (<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>)
İP	: İntraperitoneal
JAK/STAT:	Janus Kinaz/Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (<i>Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription</i>)
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
M-CSF	: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü (<i>Macrophage Colony Stimulating Factor</i>)
MDBT	: Multi Dedektör Bilgisayarlı Tomografi
MPC	: Mezenşimal Öncül Hücre (<i>Mesenchymal Progenitor Cell</i>)
MRG	: Manyetik Rezonans Görüntüleme
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asit (<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>)
MSC	: Mezenşimal Kök Hücre (<i>Mesenchymal Stem Cell</i>)
NF-kB	: Nükleer Faktör Kappa B
OP-1	: Osteojenik Protein-1 (<i>Osteogenic Protein-1</i>)
PDGF	: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (<i>Platelet-derived Growth Factor</i>)
PMNL	: Polimorfonükleer Lökosit
PTH	: Paratiroid Hormon
RANK	: Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü (<i>Receptor Activator of NF-kB</i>)
RANKL	: Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü Ligandı (<i>Receptor Activator of NF-kB Ligand</i>)
rhEPO	: Rekombinant İnsan Eritropoetini (<i>Recombinant Human Erythropoietin</i>)
Runx2	: Runt İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2 (<i>Runt-Related Transcription Factor 2</i>)
TGF- β	: Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (<i>Transforming Growth Factor-β</i>)
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
β cR	: Ortak β Reseptörü (<i>Common β Receptor</i>)

ŞEKİLLER

Sayfa No

Şekil 2.1.	Hipoksi ile üretimi uyarılan eritropoetin hematopoetik öncül hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve canlılığının korumasını sağlayarak eritrosit üretimini kontrol eder.....	22
Şekil 2.2.	Eritropoetin sadece eritroid seri üretiminden sorumlu olmayan, vücutta birçok dokuya etki eden sitoprotektif bir faktördür. (<i>Savino ve arkadaşlarının çalışmasından (38) Türkçeleştirilmiştir</i>).....	25
Şekil 2.3.	Endotelyal öncül hücreler (EPC) ve Hematopoetik öncül hücreler (HPC) CD34+ kök hücrelerden köken alıp eritrosit, trombosit lökosit ve endotelyal hücrelere farklılaşırlar.	27
Şekil 2.4.	Eritropoetin, hematopoez ve osteogenez ilişkisi:	31
Şekil 2.5.	Kök hücrelerin farklılaşabilme kapasitelerine göre sınıflandırılması.	32
Şekil 2.6.	Çalışmamızda kullanılan kültüre edilmiş rat MSC ve HSC'lerinin inverted mikroskoptaki görüntüsü.	35
Şekil 3.1.	Ratların işaretlenmesi.	51
Şekil 3.2.	Ratların cerrahi öncesi ağırlıklarının ölçümü.....	52
Şekil 3.3.	İntraperitoneal enjeksiyon uygulaması.....	52
Şekil 3.4.	Direkt grafi incelemesi.	56
Şekil 3.5.	Direkt grafi incelemesi: Solda tüm vücut posteroanterior (PA) ve lateral grafi görülmektedir. Sağda aynı ratın lomber bölgesinin yakınlaştırılmış PA ve lateral grafi görülmektedir.....	57
Şekil 3.6.	Bilgisayarlı tomografi incelemesi.....	58
Şekil 3.7.	<i>Mimics Innovation Suite®</i> kullanılarak 3D model oluşturulması: a) “ <i>Thresholding</i> ” seçeneği ile kemik dokuya karşılık gelen Hounsfield Ünitesi (HU) aralığının seçilmesi (yeşil renkli alan),.....	60

Şekil 3.7.	b) Seçilen HU aralığının (yeşil renkli alan) “ <i>Calculate 3D</i> ” seçeneği ile üç boyutlu şeklinin hazırlanması,	60
Şekil 3.7.	c) Hazırlanmış olan 3D modelin koronal, aksiyel ve sagittal plandaki görünümü (sağ alt kare),	61
Şekil 3.7.	d) 3D modelin büyütülmüş; koronal, aksiyel ve sagittal planların çıkartılmış görünümü,.....	61
Şekil 3.7.	e) İstenilen her ekseninde döndürülebilen ve büyüklüğü değiştirilebilen 3D modelin AP plandaki görünümü,.....	62
Şekil 3.7.	f) Cerrahi işlem öncesi L4,L5,L6 ve pelvisinin arkadan görünümü,.....	62
Şekil 3.7.	g) Cerrahi işlem öncesi L4,L5,L6 ve pelvisinin önden görünümü,.....	63
Şekil 3.7.	h) L6-S1 aralığına “ <i>Create Plane</i> ” seçeneği ile sanal plan oluşturulması,	63
Şekil 3.7.	i) Oluşturulan plana göre “ <i>Reslice</i> ” seçeneği ile rekonstrükte edilen görüntü,	64
Şekil 3.7.	j) Oluşturulan planda L6-S1 aralığı ve distal kısmının silinmesi,.....	64
Şekil 3.7.	k) Şekil 3.7. a) ve j) arasında uygulanan adımların L2-L3 disk aralığı ve proksimali için uygulanmasından sonra seçilen ve L3,L4,L5,L6 vertebralardan oluşan segmentin görünümü (sarı renkli alan),.....	65
Şekil 3.7.	l) L2-L6 segmentinin 3D rekonstrüksiyonu sonrası görünümü,.....	65
Şekil 3.7.	m) L2-L6 segmentinin hacim bilgileri.	66
Şekil 3.8.	Kültüre edilmiş rat MSC’lerinin sırasıyla 3. (a), 7. (b) ve 14. (c) günlerde <i>inverted</i> mikroskoptaki CFU-F görüntüsü.	67
Şekil 3.9.	Mezenşimal kök hücre üretimi için rat tibialarının eksizyonu, steril kabin içerisindeki çalışmalar ve MSC’lerin üretim basamakları.	68

Şekil 3.10. Cerrahi intraperitoneal sefazolin uygulaması, cerrahi bölgesinin traş edilmesi, antiseptik solüsyon ile temizlenmesi ve steril olarak işaretlenmesi.....	70
Şekil 3.11. Cerrahi teknik.....	72
Şekil 3.12. Sakrifiye edilmiş ratın lomber bölgesindeki cerrahi insizyon skarı (solda) ve cilt geçildikten sonraki cerrahi alanın görünümü (sağda).	78
Şekil 3.13. Sagittal ve koronal planda uygulanan manuel palpasyon değerlendirmesi.	79
Şekil 3.14. Histopatolojik inceleme için preparatların hazırlanması.	81
Şekil 4.1. 1 puan (iki taraflı transvers çıkıntılarda belirgin lizis) verilen grafilere örnekler (beyaz oklar lizis bölgelerini göstermektedir).....	86
Şekil 4.2. 2 puan (belirgin lizis alanı veya füzyon kitlesi yok) verilen grafilere örnekler.....	86
Şekil 4.3. 3 puan (iki taraflı küçük, solid olmayan füzyon kitleleri) verilen grafilere örnekler (sarı oklar yeni kemik oluşumunu göstermektedir).....	87
Şekil 4.4. 4 puan (tek taraflı büyük, karşı tarafında küçük füzyon kitleleri) verilen grafilere örnekler (sarı oklar yeni kemik oluşumunu göstermektedir).	87
Şekil 4.5. Dört farklı rata ait lomber vertebraların aksiyel, sagittal ve koronal BT kesitleri.	89
Şekil 4.5(<i>devamı</i>). Dört farklı rata ait lomber vertebraların aksiyel, sagittal ve koronal BT kesitleri.	90
Şekil 4.6. Dört farklı rata ait lomber vertebraların 3D modelleri.	91
Şekil 4.6(<i>devamı</i>). Dört farklı rata ait lomber vertebraların 3D modelleri.	92
Şekil 4.7. PK_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.....	97
Şekil 4.8. PK_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.....	98

Şekil 4.9. EPO_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	99
Şekil 4.10. EPO_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	100
Şekil 4.11. MSC_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	101
Şekil 4.12. MSC_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	102
Şekil 4.13. pre24EPO+MSC_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	103
Şekil 4.14. pre24EPO+MSC_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	104
Şekil 4.15. MSC+post72EPO_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	105
Şekil 4.16. MSC+post72EPO_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.	106
Şekil 4.17. Sıfır puan verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Kranialde her iki tarafta paraspinal kas dokuları (PSK) ve orta hatta spinal kanal ve içerisindeki kauda ekina (KE) görülmektedir. Orta hatta intervertebral disk (IVD) ve komşuluğundaki nöral foramenden çıkan spinal sinir kökü (SS), hemen kaudalde ise vertebra korpusu (VK) ve her iki lateralinde transvers çıkıntılar (TÇ) görülmektedir. Transvers çıkıntılar arasında boş adacıklar mevcuttur.	109
Şekil 4.18. İki puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. x40 büyütme ile gösterilen sol taraftaki resimde fibröz doku (fb) ve fibrokıkırdak doku (fk) alanları görülmekte olup fibröz doku çoğunluktadır.	110
Şekil 4.19. Üç puan verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Fibrokıkırdak doku (fk) fibröz dokudan (fb) baskın haldedir. x40 ve x100 büyütmelerde sekestre kemik dokusu (s) görülmektedir.	110
Şekil 4.20. Dört puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. x40 ve x100 büyütmelerde ayrıntılı olarak	

- görülen füzyon bölgesinde fibrokıkırdak doku (fk) hakimiyeti görülmektedir.111
- Şekil 4.21. Beş puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Füzyon alanında sekestre kemik dokuları (s) ve yeni kemik (yk) oluşumu görülmekle birlikte fibrokıkırdak doku (fk) hakimiyeti mevcuttur.111
- Şekil 4.22. Altı puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Füzyon bölgesinde yaygın yeni kemik (yk) yapımı görülmekte olup az miktarda fibrokıkırdak (fk) doku da görülmektedir. Koyu pembe renkli orijinal kemik dokularının arası yeni kemik yapımıyla doldurulmaktadır. Aradaki fibrokıkırdak dokunun da ossifiye olmasıyla solid füzyon görünümü gelişecektir.112
- Şekil 4.23. Karşılaşılan çeşitli yara yeri komplikasyonları.....115

TABLULAR

Sayfa No

Tablo 3.1. Deney grupları, rat sayıları ve uygulanacak girişimlerin açıklamaları.	50
Tablo 3.2. Randomizasyon için kullanılan “Radyoloji” ve “Doku” numaraları.....	53
Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan anestezi madde ve dozları.	54
Tablo 3.4. Lenke ve arkadaşlarının radyolojik inceleme kriterleri.	56
Tablo 3.5. Çalışmamızda kullanılan radyolojik değerlendirme kriterleri.	57
Tablo 3.6. EPO enjeksiyonu yapılacak gruplardaki enjeksiyon dozları, enjeksiyona başlama zamanı ve tedavi süreleri.....	74
Tablo 3.7. Serum fizyolojik enjeksiyonu yapılacak gruplarda enjeksiyona başlama zamanları ve süreleri.	75
Tablo 3.8. Ratların ağırlıkları ve ağırlıklarına göre hesaplanan sefazolin dozu ve hacimleri.....	76
Tablo 3.8 (devamı). Ratların ağırlıkları ve ağırlıklarına göre hesaplanan sefazolin dozu ve hacimleri.	77
Tablo 3.9. Histopatolojik değerlendirme kriterleri.....	82
Tablo 4.1. Direkt grafi ile değerlendirme sonuçları.	88
Tablo 4.2. 3D modellerden yapılan hacim ölçümlerinin gruplara göre ortalama, ortanca, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.	93
Tablo 4.3. Gruplara göre 0-3 hafta ve 3-6 haftalar arasındaki hacim artışı ve yüzdeleri.....	94
Tablo 4.4. Manuel palpasyon ile değerlendirme sonuçları.....	107
Tablo 4.5. Histopatolojik değerlendirme sonuçları.	113

GİRİŞ

Spinal füzyon travma, deformiteler, dejeneratif hastalıklar, infeksiyöz hastalıklar ve tümörlerde günümüzde yaygın olarak uygulanan bir cerrahi yöntemdir. İmplantların ve cerrahi tekniklerin gelişmesi, daha ayrıntılı radyolojik görüntüleme teknikleri, kemik iyileşmesinin biyolojisinin daha iyi anlaşılması, preoperatif ve postoperatif bakım ile rehabilitasyon alanındaki gelişmeler sayesinde bu endikasyonların kapsamı giderek genişlemektedir. Bu gelişmelere rağmen psödoartroz oranları hala sıfıra indirilememiştir.

Günümüzde omurga cerrahisi alanındaki araştırmaların büyük bir bölümü füzyon oranlarını arttıracak faktörler ve osteoprogenitör kök hücrelere yoğunlaşmıştır. Burada amaç otolog kemik greftleri veya allogreftlerin kullanımını azaltarak morbidite ve mortaliteyi azaltmak, aynı zamanda da tekrarlayan cerrahileri ve bunlarla ilişkili komplikasyonları azaltıp ekonomik kayıpları en aza indirmektir.

Eritropoetin (EPO) hormonuyla ilgili klasik bilgilerimizin değişmesi ile artık sadece eritrositlerin üretiminden sorumlu olmadığını, değişik dokularda sitoprotektif etkisi olan bir hormon olduğunu bilmekteyiz. EPO'nun antioksidatif, antiapoptotik ve antienflamatuar etkileri ile nöroprotektif etkileri olduğu, anjiyogenez ve damar tamirini hızlandırdığı, myokard iskemisi sonrası kardiyak fonksiyonları düzeltebildiği, böbrek epitelyal hücrelerindeki iskemi reperfüzyon hasarını azaltabildiği, reepitelizasyon ve yara iyileşmesini hızlandırdığı bulgularından hareketle osteogenez üzerindeki etkileri araştırılmaya başlanmıştır.

Diğer bir geniş araştırma alanı olan mezenşimal kök hücre (MSC)'lerin kas iskelet sistemindeki yağ, kemik, kıkırdak, tendon/ligament, kas, stromal doku hücrelerinin hemen hepsine farklılaşabildiğinin bulunması ile kıkırdak, menisküs, sinir, tendon ve kas gibi iyileşme kapasitesinin kısıtlı olduğu dokuların yenilenmesi için araştırmalar hızlanmıştır. Diğer yandan geniş kemik defektleri ve kaynamama problemlerinin tedavisinde de etkinlikleri bildirilmiştir.

1.1. Amaç

EPO ve MSC'lerin birlikte kullanımıyla ilgili çalışmalar literatürde çok az olup; genellikle iskemik beyin hasarı ve böbrek iskemisiyle ilgilidir.

EPO ve MSC'lerin tek başlarına kırık iyileşmesinde ve spinal füzyonda etkili olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur. Ancak; bilindiği kadarıyla, spinal füzyonda birlikte kullanımlarını konu alan herhangi bir çalışma yoktur.

Bu çalışma; osteogenez, anjiyogenez, antienflamasyon, yara iyileşmesi ve reepitelizasyon konusunda ortak etkilere sahip olan EPO ve MSC'lerin birlikte kullanımının ratlarda spinal füzyona muhtemel etkilerini araştırmak amacıyla yapılmıştır.

Çalışmamızda füzyon hacminin değerlendirilmesi için ratlarda 320 dedektör sıralı Multi Dedektör Bilgisayarlı Tomografi (MDBT) kullanımı ve hacim ölçümlerinde Mimics Innovation Suite® kullanımı yöntemleri; bilindiği kadarıyla, literatürde ilk defa bildirilen diğer iki önemli özelliktir.

Çalışmamızdan elde edilecek bilgiler ile EPO, MSC ve EPO ile MSC kombine kullanımının füzyona olan etkileri, var ise bu etkinin erken ve geç dönemdeki farkı, bu etkinin kırık iyileşmesinin ilk safhası olan inflamasyon safhasına etki edip etmediği değerlendirilecektir.

EPO ve MSC birlikteliğinin etkinliği gösterilebilirse otolog veya allojenik greft kullanımına alternatif olması yönünde çalışmalara yol gösterecektir.

Ayrıca, ratlarda MDBT kullanımı ve Mimics ile ölçüm yöntemlerinin; ülkemizde çoğu kurumda bulunmayan ve pahalı olan mikroBT kullanımına alternatif yaratacağı ve diğer çalışmalara öncü olacağı değerlendirilmektedir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Spinal Füzyon

2.1.1. Tanımı

Spinal füzyon omurganın elemanlarının artrodezidir. Amacı omurgadaki patolojik segmental hareketi veya instabiliteyi gidermek, ağrıyı ve eşlik eden bulguları azaltmaktır. Spinal füzyon cerrahisi; travma, deformiteler, dejeneratif hastalıklar, infeksiyöz hastalıklar ve tümörlerde sıklıkla uygulanmaktadır. İmplantların ve cerrahi tekniklerin gelişmesi, daha ayrıntılı radyolojik görüntüleme teknikleri, kemik iyileşmesi biyolojisinin daha iyi anlaşılması, preoperatif ve postoperatif bakım ile rehabilitasyon alanındaki gelişmeler sayesinde bu endikasyonların kapsamı giderek genişlemektedir.

Füzyon cerrahisindeki amaç solid bir füzyon sağlanıncaya kadar omurganın dizilimini ve stabilitesini korumaktır. Bunun için uygulanan teknikler:

- Posterior füzyon,
- Posterolateral veya intertransvers füzyon,
- Lateral füzyon,
- Anterior füzyon,
- İnterbody füzyon,
- Minimal invazif anterior füzyondur.

Posterior ve posterolateral (intertransvers) füzyon omurganın arka elemanlarının füzyonu olup, Albee ve Hibbs tarafından 1911 yılında ortaya atılan prensiplere dayanmaktadır.

Başarılı bir spinal füzyon ideal bir biyolojik ortam ve mekanik faktörlere bağlıdır. Biyolojik faktörler; kırık dokuların temizlenmesi, dekortikasyon, bölgenin yeterli kanlanması sağlanması, greftleme ve füzyon uygulanan bölgenin hareketsiz bırakılmasıdır. Mekanik faktörler ise; bölgenin uygun dizilimini sağlayan ve hareketini engelleyen rod, plak, tel, kanca, alçı, korse

ve ortez gibi çeşitli tespit araçlarını internal veya eksternal olarak kullanarak sağlanmaktadır. Mekanik ve biyolojik faktörler tek başlarına füzyon oluşturamazlar ve ikisinin de ideal şartlarda olması gerekir.

İmplant teknolojisinin gelişmesi ve kemik iyileşmesi etkileyen biyolojik faktörlerin daha ayrıntılı bir biçimde anlaşılmasına rağmen psödoartroz oranları sifıra indirilememiştir. Literatürde %5–43 arasında değişen oranlarda bildirilmektedir (1). Bu oranlar altta yatan birçok lokal ve sistemik faktöre bağlı olabilir. Kısaca bu faktörler:

- Yeterli lokal kan akımı ve doku oksijenizasyonunun sağlanamaması,
- Kemik oluşumu için yeterli sayıda osteojenik hücrenin olmaması,
- Osteoindüktif ve osteokondüktif faktörlerin yeterli olmamasıdır.

Günümüzde araştırmalar osteoindüktif ve osteokondüktif faktörler ile osteoprogenitör kök hücrelere yoğunlaşmıştır. Kemik iyileşmesinin biyolojisi ve bunu etkileyen lokal ve sistemik faktörler ilerideki bölümlerde tartışılacaktır.

2.1.2. Tarihçesi

İlk spinal füzyon vakaları 1911 yılında Hibbs ve Albee tarafından skolyoz ve omurga tüberkülozundaki (Pott hastalığı) tedavi teknikleri ile bildirilmiştir (2, 3).

Hibbs spinöz çıkıntıların, lamina ve artiküler fasetlerin subperiostal açılımı ve faset eklemlerin kürete edilmesini takiben, laminadan kaldırılan kemik flepler ile füzyonun sağlandığını bildirmiştir. Ameliyat sonrası hastalara sekiz hafta boyunca yatak traksiyonu ve alçı korse uygulamış ve 1924'de 59 skolyoz olgusunda uyguladığı füzyon sonuçlarını yayınlamıştır. 1941'de *American Academy of Orthopaedic Surgeons* derneğinin kurduğu bir

komitenin incelemesinde 425 füzyon uygulanan hastanın 180'inde psödoartroz geliştiği ve %69 vakada kötü sonuç olduğu bildirilmiştir (4, 5).

Albee ise bir Pott olgusunda otolog tibia grefti kullanmış, spinöz çıkıntıları ayırarak tibial grefti spinöz çıkıntılarının arasına yerleştirmiştir.

Türkiye'de ilk Albee operasyonu 1925 yılında bir askerî doktor olan Dr. Mim Kemal Öke tarafından, Pott hastası olan iki olguya uygulanmıştır (6). Albee ve Hibbs'in 1911 yılında ilk olguları bildirdiği düşünülürse, bu çalışma o zamanın şartları için büyük bir başarıdır (7).

1926'da Dr. Burhaneddin Toker uyguladığı Albee operasyonunu bildirmiş (8) ve 1942'de Dr. Sadettin Onaran Pott hastalığı nedeni ile Albee operasyonu uyguladığı dokuz olguyu sunmuştur (9). Bu çalışma Türkiye'de ilk yayınlanan spinal füzyon serisidir (7).

1940'lı yılların sonunda ülkemizde yaygın olan kemik ve eklem tüberkülozu vakalarının etkin tedavisini sağlayabilmek için kemik hastaneleri kurulmuş ve bu kurumlarda yetişen değerli hocalarımız omurga cerrahisi alanında öncülük etmişlerdir. Dr. Veli Lök 1960'lı yılların başında Pott hastalarında Albee operasyonuna başlamış, GATA Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği'nin kurucusu Dr. Rıdvan Ege ise aynı dönemde Albee operasyonunu modifiye ederek uygulamıştır (7, 10-17).

1962'de Harrington sistemi tanıtılıp tüm dünyada yaygınlaşmaya başlaması (7) ve sonrasında modern implantların ve tekniklerin gelişmesi ile spinal füzyon işlemi çok sık uygulanan bir işlem haline gelmiştir.

Spinal füzyon temelde kemik iyileşmesi sürecidir. Bu süreci anlayabilmek için öncelikle kemik anatomisi, histolojisi ve kırık iyileşmesinin fizyolojisinin bilinmesi gerekir.

2.2. Kemik Anatomisi ve Histolojisi

Kemik vücudun hareketlerine destek sağlayan, mineral deposu olan, hematopoetik sistemle bağlantılı kompleks ve dinamik bir organdır. Kemik dokusunun bütünlüğü; eş zamanlı olarak devam eden osteoblastik ve osteoklastik aktivitelerin hassas dengesine bağlıdır.

Kemik iliği hematopoetik kök hücre (*Hematopoietic Stem Cell*, HSC), hematopoetik öncül hücre (*Hematopoietic Progenitor Cell*, HPC), mezenşimal kök hücre (*Mesenchymal Stem Cell*, MSC), mezenşimal öncül hücre (*Mesenchymal Progenitor Cell*, MPC), fibroblast, makrofaj, adiposit, osteoblast, osteoklast, retiküler hücreler ve endotelyal hücreleri içerir.

2.2.1. Osteoblastlar

Osteositlerle birlikte başlıca kemik doku oluşturan hücredir. Pluripotent MSC'lerden köken alırlar. Birçok lokal, sistemik ve mekanik uyarana yanıt verirler. Tip I kollajen, ALP, osteokalsin, kemik siyaloprotein sentezler ve PTH'a yanıt verirler. Osteoid adalarından mineralize olmamış bir organik matriks oluştururlar. Bu matriks daha sonra mineralize olur, kemiğe gücünü ve sertliğini verir. Mineralize olan kemik matriksi osteoblastın etrafını sardığında içerisindeki granüllü endoplazmik retikulum miktarı azalır, nükleus/sitoplâzma oranı artar ve osteosit haline gelir.

Birçok araştırmacı osteoblastların hematopoezi de düzenlediğini savunmaktadır. Bunun nedeni; kemik iliğinde osteoblastların HPC'lerden osteoklast oluşumunu ve gelişimini sağlaması ve sonuç olarak kemik rezorpsiyonunu uyarmasıdır (18, 19).

2.2.2. Osteositler

Kemik matriks içinde sıkışık kalmış olgun osteoblastlardır. Biyolojik aktiviteleri daha azdır. Kemik dokunun lameller kısmında bulunurlar ve uzantıları ile birbirleriyle birleşen hücre kümeleri oluştururlar. Birleşme yerlerinde sıkı bağlantılar (*tight junction*, *nexus*) bulunur. Bu bölgeler aracılığı

ile kan dolaşımından çeşitli maddelerin kemik içinde transportunu sağlarlar. Kalsiyumun ve fosforun ekstrasellüler yoğunluğunun kontrolünde aktif rol oynarlar.

2.2.3. Osteoklastlar

CD34+ hematopoetik hücreslerden köken alan multinükleuslu, büyük hücrelerdir. Osteoblastlar tarafından üretilen Nükleer Faktör Kappa B Reseptör Aktivatörü Ligandı (*Receptor Activator of NF-kB Ligand*, RANKL) osteoklast farklılaşması ve rezorptif aktivitesini düzenleyen önemli bir proteindir. Ayrıca osteoklastların mineralize yüzeylere doğru ilerlemesi ve tutunmasını sağlayacak kemotaktik sitokinler ile yüzey yapışma (adezyon) moleküllerinin sentezini düzenlerler.

Osteoklastlar kemik rezorpsiyonunun olduğu *Howship* Lakünaları'nda bulunur ve aktive olduklarında hücre duvarları tırtıklı hâle gelir. Tırtıkları oluşturan küçük sitoplazmik uzantıların içinde "tartrata dirençli asit fosfataz" enzimi bulunur ve kemik rezorpsiyonu bu enzim aracılığıyla olur.

Birincil kemik iyileşmesi sırasında kırık hattının bir tarafındaki osteoklastlar kesici koniler (*cutting cones*) adı verilen bir rezorptif kavite oluştururlar ve hidrolitik enzimler salarak kemiğin ve kalsifiye kıkırdağın inorganik ve organik matriksini çözerler (18, 19).

2.2.4. Hematopoetik Hücreler

Hematopoetik kök hücreleri, hematopoetik öncül hücreleri ve bunlardan farklılaşan hücreleri içerir.

2.2.5. Kemik Matriksi

Yaklaşık %70'ini inorganik kısım; %5'ini su ve kalan %25'ini organik kısım oluşturmaktadır.

İnorganik Kısım: Kemik matriksinin inorganik kısmı kalsiyum hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve kısmen karbonat, klorid veya florid

içermektedir. Ayrıca osteokalsiyum fosfat (brushite) da bulunmaktadır. Örgülü (*woven*) kemikte görülen kristaller lameller kemiktekine oranla daha küçüktür (18).

Organik Kısım: Tip I kollajen kemiğin organik kısmının çoğunluğunu oluşturur. Diğer proteinler; osteokalsin, osteonektin, kemik siyaloprotein ve çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinleri içerir.

2.2.6. Kemik Doku Mineralizasyonu

Kemiğin inorganik kısmı çoğunlukla kalsiyum hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Mineralizasyon; başlangıç (nükleasyon) ve büyüme şeklinde iki aşamada gerçekleşir. Minerallerin çökmesi kollajen molekülleri arasındaki deliklerde olur.

2.2.7. Kemik Tipleri

Kemik yapısal olarak, trabeküler (kansellöz, spongiöz) kemik ve kortikal kemikten oluşmaktadır. Kortikal kemiğin kütlesi kansellöz kemiğin yaklaşık 4 katı olup, kansellöz kemiğin döngüsü (turnover) kortikal kemiğin yaklaşık 8 katıdır. Yapısal farklılıkları üzerlerine yansıyan değişik kuvvetlere dayanmalarını sağlar. Kortikal kemik en iyi bükülme, torsiyon ve kompresyon güçlerine karşı koyarken; özellikle uzun kemiklerin metafizlerinde ve epifizlerde yüksek oranda görülen kansellöz kemik başlıca kompresif kuvvetlere karşı koyar. Ayrıca kansellöz kemik kemik trabekülleri yanında hematopoetik hücreleri de içerir.

Kemik mikroskobik olarak örgülü (*woven*) ve lameller kemik olarak incelenir. Örgülü kemik, kırık iyileşmesi ile fetal ve neonatal dönemdeki büyüyen kemiklerin metafizlerinde fizyolojik olarak görülürken; Paget hastalığı, Osteogenezis İmperfekta ve osteosarkom gibi çeşitli patolojik durumlarda da görülür. İçerdiği kollajen lifleri belirli bir yönelimde olmayıp organize halde değildir (izotropik özelliklere sahiptir). Öte yandan lameller kemik, örgülü kemiğin yeniden şekillenmesi (remodelizasyon) ile daha

organize hâle gelir ve üzerine binen kuvvetlere daha iyi karşı koyar (anizotropik özelliklere sahiptir).

lameller kemik kortikal veya kansellöz karakterde olabilir. 3–8 lamel birbirini dıştan sararak osteonu oluşturur. Kortikal kemiğin birincil yapısal ünitesi osteondur. Osteonun uzun eksenine boyunca ortasında uzanan vasküler boşluğa “Havers Kanalları” adı verilir. Lameller boyunca seyreden Havers kanallarını enine köprücükler halinde birbirine bağlayan kanallar “Volkman Kanalları”dır. Bu yapı ile periosttan gelen kan damarları endosteuma ulaşır.

Osteositler lameller arasında yer alan küçük kanalcıklarda bulunur ve protoplazmik uzantıları aracılığı ile birbirleri ve Havers kanalı boyunca transportu sağlarlar.

2.2.8. Kemik İyileşmesinin Biyolojisi

Kemik iyileşmesi lokal ve sistemik faktörlerin etkilediği karmaşık bir biyolojik süreçtir. Diğer dokulardaki yaralanmalarda görülen skar oluşumunun aksine; iyileşme süreci ideal şartlarda olduğunda kemik doku anatomik ve fonksiyonel olarak tamamen yaralanma öncesindeki haline dönebilir.

Günümüzde moleküler biyoloji ve genetik alanındaki ilerlemeler sayesinde bu karmaşık süreçlerde rol alan sinyal molekülleri, proteinler ve büyüme faktörleri hakkında daha çok bilgi sahibiyiz, ancak hala bilmediğimiz ve cevaplanmayı bekleyen birçok mekanizma mevcuttur.

Kemik iyileşmesi birincil kemik iyileşmesi ve ikincil kemik iyileşmesi olarak iki ana başlık altında incelenebilir.

İkincil Kemik İyileşmesi: İkincil (indirekt, sekonder) kemik iyileşmesi, daha sık görülen ve kırık hattında sağlam (rijid) bir tespitin olmadığı iyileşme şeklidir. İyileşme, hücrelerin özellikleri ve ekstrasellüler matriksteki değişiklikler göz önüne alınarak değerlendirildiğinde üç ana dönemde özetlenebilir:

- Kemik doku hasarından sonra öncelikle “inflamatuar evre” başlar,
- Sonraki “Tamir Evresi”nde intramembranöz ossifikasyon, kırıkta yapıyı (kondrogenez) ve endokondral ossifikasyon görülür,
- En son evre “Yeniden Şekillenme” evresidir.

İyileşme sürecindeki bu evreler iç içe geçmiş durumdadır; kırık bölgesinin bir bölümünde yeniden şekillenme görülürken, diğer bölümlerde inflamatuar evre veya tamir evresi görülebilir.

a) İnflamatuar Evre

Kemik hasarıyla birlikte dolaşımını sağlayan kan damarları ve sinirler dâhil etraftaki yumuşak dokularda da hasar görür. Yaralanmadan hemen sonra ilk 48 saat içerisinde en yüksek düzeye ulaşan ve bir hafta içerisinde kaybolan bir inflamatuar cevap oluşur. Bu cevap iki şekilde kırık hattında stabilizasyonu sağlamaya çalışır:

- Ağrı nedeniyle yaralanma bölgesi hareket ettirilemez,
- Oluşan ödem hidrostatik olarak kırık hattının hareketini azaltır.

Vasküler endotel hasarı ile bölgede pıhtılaşma faktörlerinin salınımı, kompleman sisteminin aktivasyonu, platelet agregasyonu ve içerdikleri sitokinlerin salınımı başlar. Polimorfonükleer lökositler (PMNL), lenfositler, dolaşımdaki monositler ve doku makrofajları yaralanma bölgesine doğru çağrılmaya başlar (kemoatraksiyon) ve bu hücrelerden yeni damar oluşumunu (anjyogenez) tetikleyen sitokinler salgılanır. Bu sitokinlerden Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü (*Platelet-Derived Growth Factor*, PDGF) ve Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (*Transforming Growth Factor- β* , TGF- β) periosttaki mezenşimal hücrelerin çoğalmasını uyarır (20, 21).

Erken dönemde kırık bölgesi hipoksik ve asidik bir ortamdır ve bu ortam PMNL'ler ve doku makrofajlarının fonksiyon görmesi için idealdir. Yeni damar oluşumunu tetikleyen Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (*Vascular*

Endothelial Growth Factor, VEGF) ilerde ayrıntılı olarak bahsedilecek EPO ile ortak özelliklere sahiptir. EPO ve VEGF'nin salgılanması hipoksi ile tetiklenir. VEGF uygulaması ile osteogenezin uyarılabildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (22, 23). Bu çalışmalar ile EPO'nun da osteogenezini uyarabileceği hipotezi ortaya atılmıştır.

Kırık uçları ve medüller kanal ile periost ve kas dokusu altında damar dışına çıkan (ekstravazasyon) kan pıhtılaşmaya başlar. Oluşan pıhtı daha fazla kanamayı engelleyen bir hemostatik tıkaç ve hücrelerin göçü için fibrin ağı görevi görür. Kırık hattında oluşan bütün bu süreçler "tamir granülomu" olarak da adlandırılan eksternal kallusu oluşturur.

b) Tamir Evresi

Tamir evresi ilk birkaç gün içinde, inflamatuvar evre bitmeden başlar ve birkaç hafta boyunca devam eder. Bu evre sonunda kırık hattı içerisinde ve çevresinde ilerde kemik doku ile değiştirilecek olan kallus dokusu oluşur. Kallusun görevi kırık hattı çevresinde mekanik stabiliteyi arttırmaktır. Kırık hattındaki osteositler beslenemedikleri için apoptoza uğrar ve histolojik olarak "boş lakünalar" şeklinde görülebilir. Hasar gören periost, kemik iliği ve çevreleyen yumuşak dokular rezorbe olmaya başlar ve tamir için pluripotent MSC'ler fibroblast, kondroblast ve osteoblastlara dönüşmeye başlar. Bu hücrelerin bir kısmı bölgedeki yaralanmış dokulardan açığa çıkar, bir kısmı da kan dolaşımı ile diğer dokulardan göç eder. Bu dönemde görülen kallus fibröz bağ dokusu, kan damarları, kırıkta, örgülü kemik ve osteoidden ibarettir ve "Yumuşak Kallus" olarak da adlandırılır.

Tamir süreci ilerledikçe ortamdaki pH giderek artar ve önce nötral, sonra hafif alkali hâle gelir. Bu pH değerleri kallusun mineralizasyonunda görevli olan alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi için idealdir. En erken oluşan kemik dokusunun, periostun kambiyum tabakasından oluştuğu gösterilmiştir.

Tamir dokusunun içeriği ve tamir hızı; kırığın kemikteki lokalizasyonu, etrafındaki yumuşak doku hasarı, mekanik stabilite gibi lokal faktörler ve hastanın genel sağlık durumuyla ilgili sistemik faktörlerden etkilenir.

Intramembranöz ossifikasyon, kırıktan sonraki ilk birkaç gün içerisinde başlar ve proliferatif aktiviteler kırıktan sonraki ilk 2 hafta içerisinde durur. Histolojik bulgular osteoblast aktivitesinin öncelikle kırık hattının karşı korteksine birkaç milimetre uzaklıktaki örgülü kemikte başladığını göstermektedir. Bu bölgedeki kemik oluşumu direkt olarak öncül hücrelerden farklılaşan osteoblastlar sayesinde olur ve arada kırık dokusu oluşumu görülmez.

Intramembranöz ossifikasyon oluşurken, kallusun dış kısmında daha düşük oksijen varlığında kondrogenez başlar. Kırık bölgesindeki granülasyon dokusu içerisinde komşu yumuşak dokular ve periosttan köken alan mezenşimal veya farklılaşmamış (andiferansiye) hücreler de görülür. Bu hücreler hacimce büyüyerek kırık dokusu görünümünü kazanmaya başlar ve epifizlerin proliferasyon bölgesinde görülen avasküler bazofilik bir matriks sentezlemeye başlarlar. Fibröz doku ve yeni kırıktan oluşan bu bölge (yumuşak kallus) ve kırık dokusu zamanla fibröz doku ile değiştirilir.

Kemik iyileşmesinin yaklaşık 10. gününde kırık hattını kaplayan yeterli miktarda kırık dokusu vardır ve endokondral ossifikasyon ile mineralizasyon başlar. Bu süreç büyüme plağında görülen ile benzerdir. Hipertrofik kondrositler bölgede yüksek miktarda olan ve mineralizasyonu engellediği gösterilen glikozaminoglikanları yıkan "nötral proteoglikanaz" enzimini salgırlar. Bu hücreler ve osteoblastlar, matriks içerisine kalsiyum fosfat kompleksleri içeren membran-kökenli vezikülleri salgırlar. Buna ek olarak nötral proteaz ve ALP enzimleri de salgılanır. Bu enzimler proteoglikandan zengin matriksi yıkar ve yüksek enerjili fosfat esterlerini hidrolize ederek kalsiyum ile birlikte çöken fosfatın kaynağını sağlarlar.

Mineralizasyon işlemi devam ettikçe kallus daha sert hâle gelmeye başlar ve kırık hattında "internal tespit" sağlar. Komşu kemik dokusundan

kapiller damarlar kalsifiye olmuş kırıkdağın içerisine ilerler ve lokal oksijen basıncını arttırmaları. Sonrasında osteoblastlar bölgeye gelir ve kırıkta ve örgülü kemikten oluşan “Birincil Spongioza” oluşur.

Son olarak, kallus sadece örgülü kemik içerecek hâle gelir ve iki kırık ucunu birbirine bağlar ve yeniden şekillenme evresi başlar.

c) Yeniden Şekillenme Evresi

Yeniden şekillenme (remodelizasyon); kemik iyileşmesinin son evresidir ve örgülü kemiğin lameller kemik ile yer değiştirmesi ve fazla miktardaki kallusun rezorpsiyonu ile başlar.

Bu evre kemiğin fizyolojik yeniden şekillenme sürecine benzese de çok daha hızlı biçimde gelişir. Örgülü kemiğin yapısındaki yetersiz miktardaki trabeküller osteoklastik aktivite ile yıkılır ve yerine kırık hattına binen stres kuvvetlerine uygun olarak lameller kemik yerleşir.

Yeniden şekillenme evresinin sonunda, mekanik yüklenmelerin etkisi ile kırık hattı aşamalı olarak kırık oluşmadan önceki “en optimal stabilitedeki” ve “anatomiyeye en yakın” haline geri döner.

Birincil Kemik İyileşmesi: Birincil (primer, direkt) kemik iyileşmesi rijid bir tespit gerektirir. İkincil kemik iyileşmesinin aksine rijid tespit kansellöz veya kortikal kemikte kallus oluşumunu baskılar. Günümüzdeki implantlar (eksternal fiksatörler, intramedüller çiviler vb.) ve konservatif yöntemlerinin (atel/alçı tespiti) çoğu rijid bir tespit sağlamadığı için, birincil kemik iyileşmesi nadir olarak görülmektedir.

Bazı yazarlar kırık iyileşmesinde birincil kemik iyileşmesinin hedeflenmesi gerektiğini savunurken, karşıt görüşteki yazarlar ikincil kemik iyileşmesine göre belirgin bir avantajının gösterilemediğini bildirmektedirler.

Birincil kemik iyileşmesi “aralık (*gap*) iyileşmesi” ve “temas (kontakt) iyileşmesi” olarak ikiye ayrılabilir. Her ikisinde de kırık hattında eksternal

kallus ve fibröz doku veya kırık dokusu oluşumu görülmeden iyileşme sağlanabilir.

a) Aralık (Gap) İyileşmesi

Aralık iyileşmesi, aralığın kemik dokuyla doldurulması ve yeniden şekillenmesi şeklinde iki aşamada gerçekleşir.

İlk aşamada kırık uçları arasındaki aralık birincil ossifikasyon ile doldurulur. Önce yapı iskelesi (scaffold) görevi görecek olan örgülü kemik yerleşir ve sonrasında paralel lifli lameller kemik doku destek olarak oluşur. İlk aşamada oluşan yeni kemiğin yönelimi (oryantasyonu) orijinal lameller kemik yönelimine transvers şekildedir. Bu aralıkta bağ dokusu veya fibrokartilaj doku görülmez.

İkinci aşama birkaç hafta sonra görülür, longitudinal yönelimde haversian yeniden şekillenme ile nekrotik kırık uçları düzenlenir ve transvers yönelimdeki örgülü kemik orijinal yönelimdeki osteonlar ile yer değiştirir. Sonuç olarak kırık hattı kırık öncesi anatomik ve fizyolojik durumuna geri döner.

b) Temas İyileşmesi

Aralık iyileşmesinin aksine; kırık uçları anatomik olarak karşı karşıyadır ve öncül bir transvers yönelimli kemik dokusu oluşmadan, osteonlar kemiğin uzun hattına paralel olarak kırık hattını direkt geçebilirler.

Kırık hattının bir tarafındaki osteoklastlar “kesici koniler (*cutting cones*)” adı verilen bir rezorptif kavite oluştururlar. Bu kavite kapiller damarların penetrasyonuna ve yeni bir haversian sistem oluşmasına izin verir. Endotelial hücreler ve osteoprogenitör hücreler osteoblastların kırık hattı boyunca osteonlar oluşturmasını sağlarlar. Sonuç olarak kırık hattı, kırık öncesindeki anatomik ve fizyolojik durumuna geri döner.

2.2.9. Kemik Metabolizmasının Düzenleyicileri

Kemik metabolizmasının düzenlenmesinde görevli çeşitli hormonlar, vitaminler, büyüme faktörleri, sitokinler, reseptörler ve sinyal moleküllerinden bahsetmeden önce osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenez kavramlarından bahsetmekte fayda vardır:

Osteoindüksiyon: Osteoprogenitör kök hücrenin osteojenik hücrelere farklılaşma yeteneğidir. Ayrıca uygulanan greft materyalinin matür kemik hücrelerine farklılaşacak kök hücreleri oluşturma yeteneğidir. BMP'ler ve DBM başlıca osteoindüktif materyallerdir. Daha az derecede otogreft ve allogreft kemiğin de osteoindüktif özellikleri mevcuttur.

Osteokondüksiyon: Greftin kemik iyileşmesi için uygun bir yatak oluşturma özelliğidir. Osteokondüksiyon, osteojenik öncül hücrelerin ve nörovasküler yapıların greft içerisine ilerlemesine izin verir. Kansellöz otogreft ve allogreftler ile DBM, hidroksiapatit, kollajen ve kalsiyum fosfat osteokondüktif maddelerdir.

Osteogenez: Osteojenik greft materyalleri canlı osteoprogenitör hücrelere sahiptir ve osteojenik hücrelere farklılaşma ve kemik oluşturma yetenekleri vardır. Osteogenez sadece taze otolog kemik ve kemik iliği hücrelerinde bulunan bir özelliktir.

Otolog Kemik Grefti: Otolog kemik grefti mekanik destek sağlaması, büyüme faktörleri, matris proteinleri ve osteojenik hücreleri içermesi nedeniyle osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktiftir. Bu üç özelliği nedeniyle günümüzde spinal füzyon cerrahisinde hala altın standarttır (24, 25).

İliak kanattan alınan kortikokansellöz kemik genellikle en sık kullanılan ve en başarılı grefttir. Miktarının kısıtlı olması, donör alanda ağrı, ilium kırıkları, enfeksiyon, vasküler ve nöral yaralanmalar nedeniyle artmış kan kaybı ve transfüzyon ihtiyacı ile hipoestezi, ameliyat süresinin uzaması gibi

morbiditeleri nedeniyle otolog kemik greftine alternatif olabilecek maddelerle ilgili çalışmalar yoğun şekilde devam etmektedir.

2.2.10. Hormon ve Vitaminler

Kemik metabolizması sistemik ve lokal faktörler ile sürekli düzenlenmektedir. Kemik metabolizmasını en çok etkileyen üç hormon PTH, vitamin D ve kalsitonindir.

PTH artışı kemikten kalsiyum ve fosfor salınımına yol açar ve vücudun ekstrasellüler kalsiyum düzeyini ayarlar. PTH reseptörü bulunan tek kemik hücresi osteoblastlardır.

Vitamin D intestinal ve renal kalsiyum bağlayan proteinleri stimüle eder ve aktif kalsiyum transportunu kolaylaştırır.

Kalsitonin, plazma kalsiyum düzeyinin artması ile tiroid bezinin parafoliküler hücreleri tarafından salgılanır ve osteoklastik aktiviteyi inhibe ederek kemikten kana kalsiyum salınım hızını azaltır.

Östrojen, testosteron, büyüme hormonu (*Growth Hormone*, GH), tiroid hormonları osteoblastik aktiviteyi arttırırken; immobilizasyon, glukokortikoidler, PTH ve asidoz osteoklastik aktiviteyi arttırır.

2.2.11. Büyüme Faktörleri, Sitokinler ve Sinyal Molekülleri

Kemik iyileşmesinin üç fazında da hücreler ve ekstrasellüler matriks arasındaki iletişim çeşitli büyüme faktörleri, sitokinler, reseptörler ve sinyal molekülleri aracılığıyla olur. Moleküler biyoloji ve genetik alanında ilerlemeler sayesinde günümüzde bu faktörler daha iyi anlaşılmaktadır ancak hala araştırılmayı bekleyen birçok husus mevcuttur. Aşağıda en fazla araştırılan ve bilgi sahibi olunan faktörler açıklanmaktadır.

Dönüştürücü Büyüme Faktörü- β (TGF- β): TGF- β kırık bölgesindeki plateletler, inflamatuvar hücreler (monosit ve makrofajlar), osteoblastlar, osteoklastlar, mezenşimal hücreler, endotelial hücreler ve kondrositlerce

üretir. Yaralanmayı takiben ilk 24 saat içerisinde kırık hematomunda görülmeye başlar ve inaktif öncül bir peptid halinde iken kırık hematomundaki asidik ortam ve proteazların etkisi ile aktifleşir.

Görevleri:

- Makrofajlar için en güçlü kemoatraktan maddedir,
- Kemik iyileşmesi için çok önemli olan yeni damar oluşumunu uyarır,
- Periosteal mezenşimal hücrelerin osteoblast ve kondroblastlara dönüşümünü uyarır,
- Matriksin kalsifikasyonu ve osteoblast aktivitesini düzenler,
- Osteoklastik aktiviteyi ve osteoklastların oluşumunu inhibe eder,
- Tip I, II, III, IV, VI ve X kollajen, fibronektin, osteopontin, osteonektin, thrombospondin, proteoglikanlar ve ALP üretimini uyarır.

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF): FGF'ler kırık bölgesindeki inflamatuvar hücreler (monosit ve makrofajlar), osteoblastlar ve kondrositlerce üretilir. FGF-I ve FGF-II kemik iyileşmesinin inflamatuvar fazında makrofajlar ve periosteal hücrelerden salınır. Görevleri:

- Yeni damar oluşumunu uyarır,
- Otokrin ve intrasellüler fonksiyonları vardır,
- Tip 4 kollajenazı uyarır,
- Ayrıca FGF-II kondrositler için kemoatraktan ve mitojen olup büyüme plağındaki kondrositlerin farklılaşmalarını düzenler.

Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü: PDGF'ler kırık bölgesindeki plateletler, monositler, aktif doku makrofajları ve endotelial hücrelerce üretilir. İnflamatuvar evrede az miktarda iken, tamir evresinde üretimi artar. Görevleri:

- Reseptörü tirozin kinaz aktivitesine sahiptir,
- Mezenşimal hücrelerin çoğalmasını uyarır,

- Kıkırdak ve intramembranöz kemik oluşumunu uyarır ve kallus oluşumunu başlatır,
- Plateletlerin α -granüllerinden salgılanarak bağ dokusu hücreleri için mitojen görevi görür,
- Osteosit ve osteoblastlarda DNA protein sentezini uyarır,
- Prostaglandin sentezi ile kemik rezorpsiyonunu uyarır
- İn vitro Tip I kollajen miktarını artırır,
- Kan akımını düzenler,
- Hücre çoğalması, büyümesi ve farklılaşmasını kodlayan nükleer proteinler olan c-myc ve c-fos protoonkogenlerinin ekspresyonunu artırır.

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF): IGF'ler somatomedinler veya sülfatasyon faktörleri olarak da adlandırılır. IGF ekspresyonu periost ve büyüme plağının gelişimi, kırık kallusunun iyileşmesi ektopik kemik oluşumu sırasında artar. Görevleri:

- Kollajen sentezini arttırıp yıkımını azaltır,
- Büyüme plağının proliferatif bölgesinde kondrositlerin çoğalmasını sağlar,
- Osteoblastik ve osteoklastik öncül hücrelerin çoğalmasını uyarar ve fonksiyonlarını düzenleyerek kemiğin yeniden şekillenmesinde görev alır.

Kemik Morfojenik Proteini (BMP): BMP'ler TGF- β ailesinin üyesi olup kemik matriksindeki suda çözünen ve osteoindüktif aktiviteye sahip nonkollajen proteinler olarak keşfedilmiştir.

Üzerinde en çok çalışma yapılanları BMP-2, BMP-4 ve BMP-7'dir. Kırık bölgesindeki primitif mezenşimal ve osteoprogenitör hücreler, fibroblastlar ve proliferen olan kondrositlerce üretilir. Embriyonik ve postembriyonik dokularda çeşitli fonksiyonları mevcuttur. Bunlardan bazıları:

- BMP-2 osteoblastlarda IGF-I ve IGF-II sentezini artırır,

- İnsan Osteoblast benzeri Öncül Transfektan Hücreleri'nde (*Human Osteoblast-like Initial Transfectant*, HOBIT) TGF- β ve IL-6 ekspresyonunu artırır,
 - BMP-4 monositlerde TGF- β ekspresyonunu artırır,
 - BMP-4 Tip 4 kollajen ve heparini bağlayarak yeni damar oluşumunda görev alır,
 - BMP-7, diğer adıyla Osteojenik Protein-1 (Osteogenic protein-1, OP-1) IGF tip 2 reseptör ekspresyonunu artırır,
 - BMP-7 erken osteoblast farklılaşmasında görev alan *Osf2/Cbfa1* adlı transkripsiyon faktörünün salınımını artırır,

Osteonektin: Kollajen olmayan ekstrasellüler matriks proteinlerinden en fazla miktarda bulunanıdır. Osteoblastlar ve plateletlerce üretilir, kalsiyum bağlayarak mineralizasyonu düzenler.

Osteokalsin: Osteoblastlara özgü bir ekstrasellüler matriks proteindir. İçerdiği λ -karboksiglutamik asit rezidüleri ile kalsiyum bağlayarak hidroksiapatit kristallerinin gelişiminde rol oynar.

Osteokalsin sentezi aktif vitamin D₃ (1,25-dihidroksivitamin D₃) ile artar, PTH ve kortikosteroidler ile inhibe edilir. Plazmadaki osteokalsin seviyeleri yeni kemik oluşumu ile koreledir ve biyokimyasal olarak ölçümü osteoblast aktivitesinin göstergesi olabilir.

Osteopontin: Kemik iyileşmesi sırasındaki hücreler arası iletişimi düzenleyen ekstrasellüler matriks proteindir. Hyalünorik asit, Tip I kollajen ve fibronektini bağlayan bir hücre yüzeyi glikoproteini olan CD-44 ile etkileşir. Ayrıca osteoklastların fibronektin reseptörleri üzerinden kemiğe tutunmasını ve rezorpsiyon yapmasını sağlar.

Fibronektin: Hücre yapışması (adezyon) ve göçünde (migrasyon) görev alan ekstrasellüler matriks proteindir. Fibroblast, osteoblast ve kondrositlerce üretilir.

Kemik Morfojenik Proteini Reseptörü (BMP-R): BMP-R'leri, BMP-R-I ve BMP-R-II inflamatuvar fazdaki farklılaşmamış mezenşimal hücreler, intramembranöz ossifikasyon sırasında çoğalan osteoblastlar ve kondrogenez ve endokondral ossifikasyon sırasında olgunlaşmış hipertrofik kondrositlerde gözlemlenmiştir.

Bu reseptörler aracılığıyla mezenşimal hücrelerin kondroblastik ve osteoblastik öncül hücrelere farklılaştığı düşünülmektedir.

İnterlökin-1 (IL-1): Erken inflamatuvar fazda makrofajlar tarafından az miktarda salgılanan ancak aktivitesi yüksek olan bir sitokindir. Tamir ve yeniden şekillendirme fazlarını başlatan IL-6, Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü (*Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor*, GM-CSF) ve Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü (*Macrophage Colony Stimulating Factor*, M-CSF) salınımını tetikler. Ayrıca kallus dokusunu yıkan nötral proteazları uyarır

İnterlökin-6 (IL-6): Tamir fazında osteoblastlarda üretilen bir sitokin olup IL-1 uyarısına çok duyarlıdır. Kemik rezorpsiyonunda görev aldığı düşünülmektedir.

Granülosit-Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktörü (GM-CSF): T-lenfositler ve osteoblastlarda salgılanarak osteoklast farklılaşmasını, T-lenfositlerin proliferasyonu ve sitokin sentezlemesini sağlar. Ayrıca fibroblast göçü ve kollajen sentezi ile granülosit öncülü ve monosit/makrofaj öncülü hücrelerin farklılaşmasını sağlar.

Kollajenler: Tanımlanmış en az 18 kollajen izotipi mevcuttur. Özetle:

- Tip I kemik doku,
- Tip II kıkırdak doku,
- Tip III ve Tip V granülasyon dokusu,
- Tip IV ve VI endotelyal matriks,
- Tip X hipertrofik kıkırdak dokusu ile ilişkilidir.

Mekanik olarak stabil kırıklar baskın olarak Tip I kollajen ile Tip II ve Tip V kollajen içerirler. İnstabil kırıklarda ise öncelikler Tip III ve Tip V kollajen üretilip sonrasında Tip II, Tip IX ve çok az miktarda Tip I kollajen ile yer değiştirirler.

Tip I kollajen kemikteki ana kollajen olup organik kısmının çoğunluğunu oluşturur. Çapraz bağlantılar ile kollajen fibrilleri ve kollajen lifleri oluşur ve kırıktan sonraki yaklaşık 10. günde bu bölgelere hidroksiapatit kristalleri mineralizasyon başlar.

Tip II kollajen kırıkdağın ana yapısal proteinidir.

Tip III kollajen kemik iyileşmesinin ilk haftasında özellikle kemik dokuda hızla artar. Üretimindeki problemler gecikmiş kaynama veya kaynamamaya yol açar.

Tip IV kollajen bazal membranın ana bileşeni olup Tip I ve Tip X kollajen ile birlikte mezenşimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasında rol alır.

Tip V kollajen yumuşak ve sert kallus yapısında görülür ve kırıkta ve kırıkta olmayan dokularda Tip I ve Tip II kollajenin büyüme ve yönelimini düzenler.

Tip IX kollajen kırıkta dokuda görülür ve kollajen fibrilleri ve proteoglikanların iletişimini düzenler.

Tip IX kollajen endokondral ossifikasyon sırasındaki hipertrofik kondrositlerin bir işaretleyicisi olup kırıkta dokunun mineralizasyonunda görev alır.

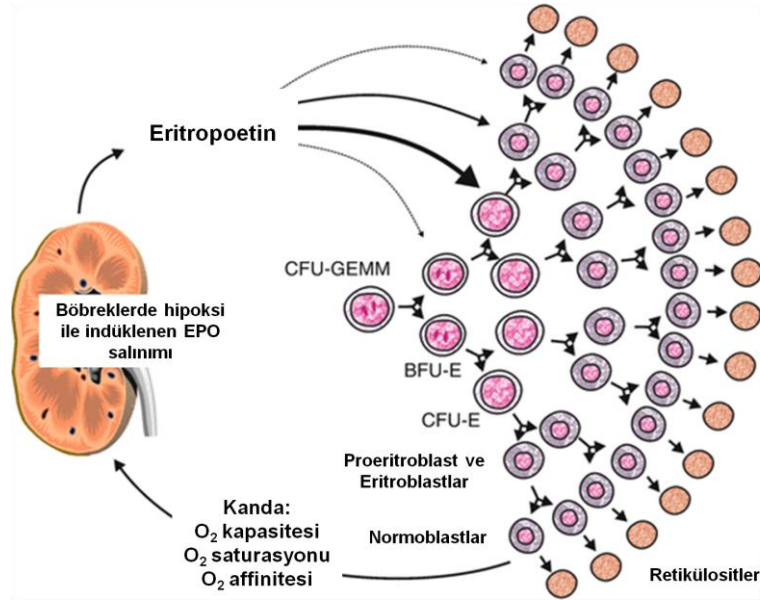
Tip XI kollajen kırıkta dokuda görülür ve kollajen fibrillerinin minör bir bileşenidir.

2.3. Eritropoetin

2.3.1. Tanımı

Eritropoetin (EPO), 34 kilodalton molekül ağırlığında glikoprotein yapısında bir hormon olup ilk klonlanan hematopoetik büyüme faktörüdür. Kemik iliğindeki eritrosit öncülü hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve canlılığının korumasını sağlayarak eritrosit üretimini kontrol eder (26, 27).

Eritrositlerin temel görevi akciğerlerden oksijeni periferik dokulara taşımaktır. Bu nedenle EPO üretiminin düzenlenmesi doku oksijenizasyonunun sağlanması açısından çok önemlidir. EPO başlıca böbrek kortekslerindeki peritübüler hücrelerden üretilir ve eritrosit üretiminin kontrolünden sorumludur (Şekil 2.1.). İntrauterin dönemde EPO üretiminin ana kaynağı karaciğerdir ve yetişkin çağda bu oran yaklaşık %20'lere düşer. Ayrıca az miktarda kemik iliği, dalak, gastrointestinal sistem (GİS), kalp, akciğer, testis, overler ve santral sinir sisteminde de sentezlenir (27).



Şekil 2.1. Hipoksi ile üretimi uyarılan eritropoetin hematopoetik öncül hücrelerin çoğalması, farklılaşması ve canlılığının korumasını sağlayarak eritrosit üretimini kontrol eder.

Eritropoetini kodlayan gen yedinci kromozom üzerinde yer alır ve 3000 baz çifti içerir. Dört intron ve beş ekzonlu 193 aminoasitli bir moleküldür. Salınımı sırasında 28 aminoasidini yitirir, matür protein 165 aminoasit içerir. Genin transkripsiyon hızı oksijen bağımlı bir mekanizma ile kontrol edilir.

2.3.2. Tarihçesi

İlk defa Fransız bilim adamları tarafından Bert ve Jourdanet tarafından doku hipoksisi ve eritrosit üretimi arasındaki ilişki ortaya konulmuş ve 1906 yılında Carnot ve Deflandre eritrosit üretiminin “hemopoetin” isimli hormon tarafından uyarıldığı hipotezini ortaya atılmıştır (28).

Erslev ve Lavietes (29, 30) 1953 yılında anemisi olan tavşanlardan aldığı serumun eritropoezi uyardığını göstermişlerdir. 1977 yılında Miyake ve arkadaşlarınca (31) aplastik anemili hastaların idrarlarından EPO’yu saflaştırılmış ve 1985 yılında Jacobs ve arkadaşlarınca (32) aminoasit sıralaması belirlenmiştir. Böylece memeli hücrelerinde eritropoetin geni ve gen ekspresyonu yapılabilmüş ve rekombinant insan eritropoetini (rhEPO) klinik kullanıma girmiştir.

EPO öncelikle kronik böbrek yetmezliği (KBY) ve kanser kemoterapötiklerine bağlı gelişen anemilerin tedavisinde kullanılmış; sonrasında çeşitli otoimmün hastalıklarda, Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu’nda (Acquired Immune Deficiency Syndrome, AIDS), kemik iliği nakli ve myelodisplastik sendromda görülen kemik iliği baskılanması sonucu oluşan anemilerde kullanılmıştır. EPO ayrıca hemoglobinopatilerin tedavisinde ve otolog kan transfüzyonu amacıyla da kullanılmaktadır. rhEPO’nun klinik kullanıma girmesinden 15 yıl önce, diyaliz tedavisi gören KBY hastalarının yaklaşık %25’ine düzenli olarak eritrosit süspansiyonu verildiği (33) göz önüne alındığında rhEPO’nun transfüzyonla ilgili riskleri belirgin olarak azaltmasının ne kadar önemli olduğu görülmektedir (34, 35).

2.3.3. Eritropoetin Üretimini Düzenlenmesi

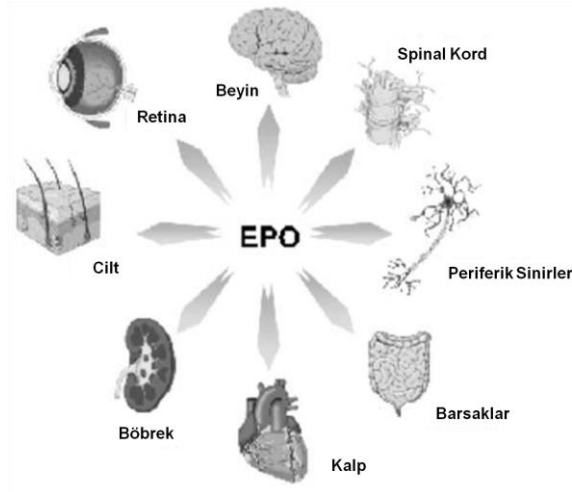
Vücutta önceden depolanmış halde bulunmayan EPO üretimini tetikleyen ana faktör, doku oksijenizasyonunda azalma, yani hipoksidir. Kan kaybı, arteriyel parsiyel oksijen basıncının (pO₂) azalması veya hemoglobinin oksijene olan bağlama kapasitesinin artması gibi nedenlerin hepsi periferik dokularda düşük oksijen konsantrasyonuna neden olur. Hücre DNA'sındaki Hipoksi ile Uyarılabilen Faktör 1 geni (*Hypoxia-Inducible Factor 1*, HIF1) ile HIF1 α , HIF2 α , HIF3 α gibi çeşitli proteinlerin transkripsiyonunu başlatır (36). Bu proteinler, EPO ve bununla birlikte VEGF, çeşitli glikolitik enzimler, Glukoz Taşıyıcısı 1 (*Glucose Transporter 1*, GLUT1), indüklenebilen Nitrik Oksit Sentetaz (*Inducible Nitric Oxide Synthase*, iNOS), hem oksijenaz ve transferrin gibi hipoksiyi düzenlemede etkin olan birçok enzim ve faktörlerin salgılanmasını sağlarlar (27).

EPO, hücre yüzeyindeki homodimer transmembran reseptörüne (Epo-R) bağlanarak hücre içi Janus Kinaz/Sinyal İleticisi ve Transkripsiyon Aktivatörü (*Janus Kinase/Signal Transducer and Activator of Transcription*, JAK/STAT) sinyal iletimi mekanizması ile etki eder. EPO reseptörleri, kemik iliğindeki eritrosit öncülü olan Eritroid Koloni Oluşturucu Birim (*Colony Forming Unit-Erythroid*, CFU-E) hücrelerinde daha fazla oranda görülür ve bu hücreler olgunlaşır eritrosite farklılaştıkça Epo-R reseptörleri azalır(37). Böylece dolaşımdaki eritrosit sayısı artar. Buna ek olarak EPO, HPC'lerin apoptozunu da engelleyerek eritrosit üretimini arttırmaktadır (38).

Karbamile EPO (C-EPO) gibi EPO türevlerinin EPO reseptörlerine bağlanmadığı, eritropoezi uyarmadığı ancak hala doku koruyucu etkiler gösterdiği in vivo ve in vitro çalışmalarla gösterilmiştir. Bu nedenle EPO'nun doku koruyucu etkilerinin başka bir reseptör üzerinden gerçekleştiği düşünülmektedir. Brines ve arkadaşları GM-CSF, IL-3 ve IL-5 reseptörlerinde ortak bir sinyal iletim alt ünitesi olan Ortak β Reseptörü'nün (*Common β receptor*, β cR) Epo-R ile birlikte doku koruyucu bir heteroreseptör olduğunu tespit etmiştir. β cR aynı zamanda CD131 veya GP130 olarak da adlandırılmaktadır (39).

Intrauterin gelişim sırasında Epo-R'lerin neredeyse tüm embriyonik dokularda görüldüğü ve organ gelişimi ve anjiyogenezde hayati bir rol oynadığı düşünülmektedir. Molekül ağırlığının yüksek olmasından dolayı kan beyin bariyerini geçemediği ancak beyinde ayrı bir parakrin EPO sistemi olduğu bildirilmiştir (28). Bu nedenle sistemik olarak uygulanan EPO dozlarının normal fizyolojik dozların çok üstünde olması gerektiği ve kullanım süresinin uzadıkça arteriyel kan basıncında artışa ve lokal tromboza neden olarak doku hasarına yol açabileceği bildirilmiştir (38). Bunun tersine, özel bir reseptör aracılı mekanizma ile EPO'nun kan beyin bariyerini aşabildiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur (40, 41).

Kemik iliği ve karaciğer dışında Epo-R mRNA ve/veya proteinlerinin endotel hücreler, epikardiyum ve perikardiyum hücreleri, renal mezengial ve epitelyal hücreleri, pankreatik ada hücreleri, plasenta, beyin, retina, periferik sinirler ve spinal kord, testisler, akciğerler, dalak gibi birçok dokuda bulunduğu gösterilmiştir (33, 36, 38). Hematopoetik olmayan dokularda eritropoetin reseptörlerinin saptanması ile EPO'nun sadece eritroid seri üretiminden sorumlu olmadığı ve değişik dokulara etki eden (pleiotrofik) ve doku koruyucu etkisi olan bir hormon olduğu hipotezi savunulmaya başlanmıştır (38, 42, 43) (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Eritropoetin sadece eritroid seri üretiminden sorumlu olmayan, vücutta birçok dokuya etki eden sitoprotektif bir faktördür. (Savino ve arkadaşlarının çalışmasından (38) Türkçeleştirilmiştir).

2.3.4. Eritropoetin Nöroprotektif Etkileri

Santral sinir sisteminin hipokampus, kapsula interna, korteks ve orta beyin bölgelerinde Epo-R mRNA ve proteinlerinin bulunduğu gösterilmiştir.

Sistemik olarak verilen rhEPO'nun deney hayvanlarında bölgesel beyin iskemisi, kontüzyona bağlı beyin hasarı, deneysel otoimmün ensefalomyelit ve kimyasal olarak oluşturulan epilepsi modellerinde nöroprotektif, antioksidatif, antiapoptotik ve antienflamatuar etkileri nedeniyle etkili olabileceği bildirilmiştir (33, 44). Ayrıca retina, spinal kord, periferik sinirlerde de benzer etkilerinden bahsedilmiştir.

Tsai ve arkadaşları (45) EPO ve Epo-R genleri baskılanan fare embriyolarında nöroblastların göçünün etkilendiği ve nöral tüp defektlerinin geliştiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde nöronal öncül hücrelerin azalması ve apoptozun artması ile beyin gelişiminin bozulduğu bildirilmiştir (38).

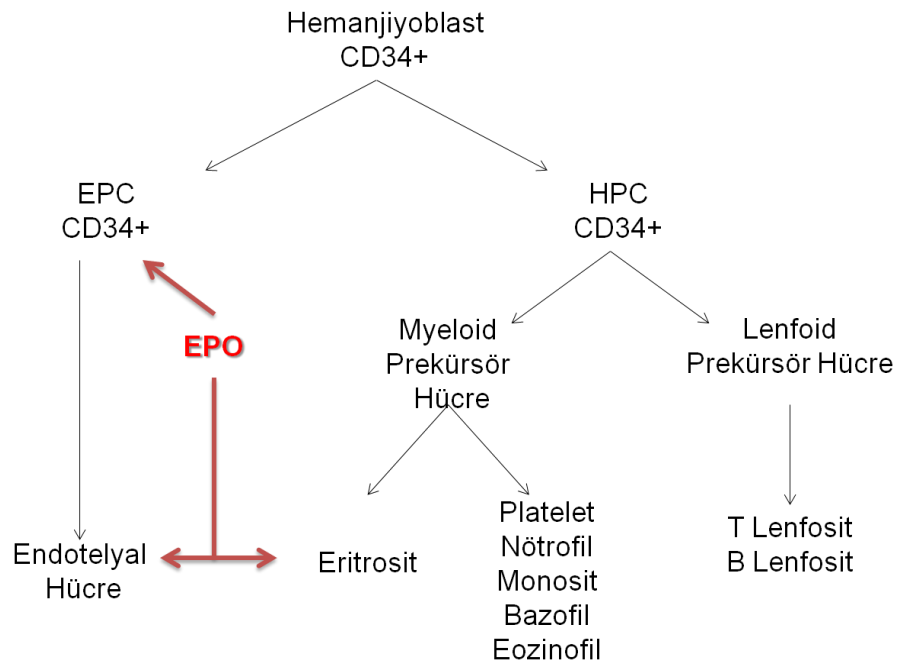
EPO'nun nöroprotektif etkileriyle ilgili hayvan çalışmalarının yanında klinik çalışmalar da mevcuttur. Ehrenreich ve arkadaşlarının (46) akut inme hastalarında yaptıkları çift kör randomize klinik çalışmada, 40 hastaya rhEPO veya serum fizyolojik uygulanmış ve sonuçları manyetik rezonans görüntüleme (MRG) ile değerlendirilmiştir. rhEPO uygulanan hastalardaki infarkt alanlarında kontrol grubuna göre belirgin azalma saptanmış ve 3 hafta sonraki klinik değerlendirmelerinde rhEPO grubundaki hastaların nörolojik bulguları ve klinik tablolarının daha çabuk düzeldiği tespit edilmiştir.

2.3.5. Eritropoetin Kardiyoprotektif Etkileri

EPO'nun endotelial hücreler üzerindeki biyolojik etkilerinin araştırılmasıyla endotelial öncül hücrelerin proliferasyonunu sağladığı ve apoptozunu engellediği ve bu özellikleri ile anjiyogenez ve damar tamirinde fonksiyonu olabileceği bildirilmiştir (28).

EPC'ler CD34+ kök hücrelerden kaynaklanıp farklı yollar ile eritrosit, trombosit lökosit ve endotelial hücrelere farklılaşırlar (Şekil 2.3.). Çoğunlukla

kemik iliğinde bulunur ancak vücutta anjiyogenez gereken yerlere dolaşım yolu ile göç edebilirler (47). Deneysel çalışmalar ile bu hücrelerin myokard iskemisi sonrası kardiyak fonksiyonları düzelttiği gösterilmiştir (48-53). Ayrıca EPO'nun iskemi reperfüzyon hasarı sonrası kardiyomyositlerin apoptozunu engellediği, sol ventrikülü yeniden şekillendirdiği ve bu terapötik etkileri nedeniyle myokard enfarktüsü veya myokardit geçirmiş hastalarda klinik kullanımı olabileceği bildirilmiştir (36).



Şekil 2.3. Endotelyal öncül hücreler (EPC) ve Hematopoetik öncül hücreler (HPC) CD34+ kök hücrelerden köken alıp eritrosit, trombosit lökosit ve endotelyal hücrelere farklılaşırlar.

2.3.6. Eritropoetin Renal Protaktif Etkileri

Kronik böbrek yetmezlikli hastaların çoğunluğu ateroskleroz, myokard enfarktüsü veya beyin enfarktüsüne bağlı komplikasyonlar nedeniyle

kaybedilmektedir. Bu komplikasyonların temelinde bozulmuş vasküler tamir mekanizmalarının olduğu düşünülmektedir.

rhEPO tedavisinin ileri dönem böbrek yetmezlikli hastalarda sol ventriküler yükü azalttığı, egzersizle ilişkili kardiyak iskemiye azalttığı ve klinik bulguları düzelttiği bildirilmiştir. EPO düzeyleri ve EPC'lerin sayısında veya fonksiyonlarında azalmanın bu hastalardaki yüksek kardiyovasküler morbidite ve mortalite nedeni olabileceği düşünülmektedir. EPO'nun diğer bir etkisi böbrek epitelyal hücrelerindeki iskemi reperfüzyon hasarı sonrası gelişen apoptozu engellemesidir (38).

2.3.7. Eritropoetin Yara İyileşmesi ve Anjiyogeneze Etkisi

Çeşitli çalışmalarla EPO ve Epo-R'lerin embriyogenezin erken aşamalarındaki anjiyogenez sırasında tespit edilebildiği ve EPO gen delesyonunun kardiyovasküler sistemde defektlere yol açıp erken ölüme neden olduğu bildirilmiştir (54). Ayrıca EPO'nun yara iyileşmesi, iskemik cilt lezyonları ve deneysel yanık lezyonları gibi hayvan modellerinde anjiyogenez ve reepitelizasyonu arttırdığı ve yara iyileşmesini hızlandırdığını bildiren çeşitli çalışmalar mevcuttur (55, 56).

2.3.8. Eritropoetin ve Osteogenez

Hematopoetik ve osteojenik hücrelerin birbirinin fonksiyonlarını etkilediği çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. EPO'nun nöroprotektif, kardiyoprotektif ve renal protektif etkilerinin gösterilmesi ile hematopoez ve osteogenez arasındaki iletişimden sorumlu sitokinlerden biri olabileceği hipotezi ortaya atılmıştır (36).

Kan kaybı sonrasında kaybedilen olgunlaşmış kan elemanlarını yenilemek amacıyla yağlı kemik iliği genişleyerek hematopoetik kemik iliği haline gelmeye başlar (Şekil 2.4.). Kavitenin genişlemesi için belirli bir oranda kemik yıkımı gerekmektedir. İlizarov ve arkadaşları 1986 yılındaki çalışmalarında, hayvanlarda akut kan kaybı sonrasında kemik rejenerasyon oranının arttığını bildirmişlerdir (57).

Shiozawa ve arkadaşları, HSC'lerin yüzeylerinde Epo-R ekspresyonu olduğu ve EPO'nun HSC'leri uyararak JAK2/STAT3 hücre içi sinyal iletimi mekanizması aracılığıyla BMP-2 ve BMP-6 sentezlenmesini sağladığını göstermişlerdir (58). Sonrasında BMP'ler Kemik Morfojenik Protein Reseptörü'ne (Bone Morphogenic Protein Receptor, BMP-R) bağlanarak osteojenik öncül hücrelerin osteoblastlara dönüşmesini ve kırık oluşumunun uyarılmasını sağlamaktadır. Aynı çalışmada EPO'nun diğer bir etkisinin kemik iliği kökenli MSC'lerin Runt İlişkili Transkripsiyon Faktörü 2 (*Runt-Related Transcription Factor 2*, Runx2) gen ekspresyonunu arttırmak, ALP düzeyini ve mineralizasyon artışını sağlamak olduğu bildirilmiştir. EPO'nun osteoklastik aktiviteyi de etkilediği ancak bunu direkt olarak osteoklastlara etki ederek değil, HPC'lerden osteoklast oluşumuna etki ederek yaptığı düşünülmektedir. Ayrıca osteoblastik aktiviteyi arttıran PTH'un serum EPO düzeylerini etkilemediği saptanmıştır. Bu nedenle EPO ve PTH'un kemik oluşumu üzerinde ayrı yollardan etki ettiği; PTH'un osteoblastik öncül hücreler ve olgunlaşmış kan hücrelerine, EPO'nun HSC'ler ve osteoblastik öncül hücrelerine etki ettiği bildirilmiştir. Sonuç olarak suprafizyolojik dozlarda EPO tedavisinin kemik mineral dansitesinde, kemik hacminde ve osteoblast sayısında artışa neden olduğu bildirilmiştir (58) (Şekil 2.4.).

Holstein ve arkadaşları (23) farelerde oluşturulan kapalı femur kırığı sonrasında 6 gün boyunca 5000 IU/kg/gün dozunda EPO tedavisi uygulamışlar ve 2. haftadan sonra kallustaki hipertrofik kondrositlerde Epo-R ekspresyonu olduğunu bildirmişlerdir. Çalışma sonunda EPO tedavisi gören farelerde biyomekanik olarak torsiyonel direnç ve kallus yoğunluğunda artış saptanmış ancak bu etkilerin 5. haftadan sonra görülemediği bildirilmiştir.

Aynı grubun bir sonraki çalışmasında farelerde oluşturulan segmental defektli kırık modelinde 500 IU/kg/gün'lük daha düşük dozun daha uzun süredeki (5 hafta) etkileri araştırılmış ve bükülme kuvvetlerine direnç ve radyolojik dansitede gelişme saptanmıştır. Bu etkilerin ilk iki haftalık periyoddan sonra da devam ettiği bildirilmiştir. Ayrıca EPO'nun önemli bir

inflamatuvar regülatör protein olan Nükleer Faktör Kappa B (NFkB) seviyelerini azaltarak inflamatuvar sitokinlerin salınımını azalttığı ve antienflamatuvar etkili olduğu da bildirilmektedir (59).

Türkiye'den Mihmanlı (60) ve arkadaşlarının çalışmasında, rhEPO'nun tavşanlarda mandibuler distraksiyon osteogenezi modelinde kemik kalitesini ve iyileşme hızını arttırdığını ve ayrıca yeni kemik oluşumu olan bölgelerde osteoblast sayısında ve anjiyogenezde artışa yol açtığını bildirmişlerdir.

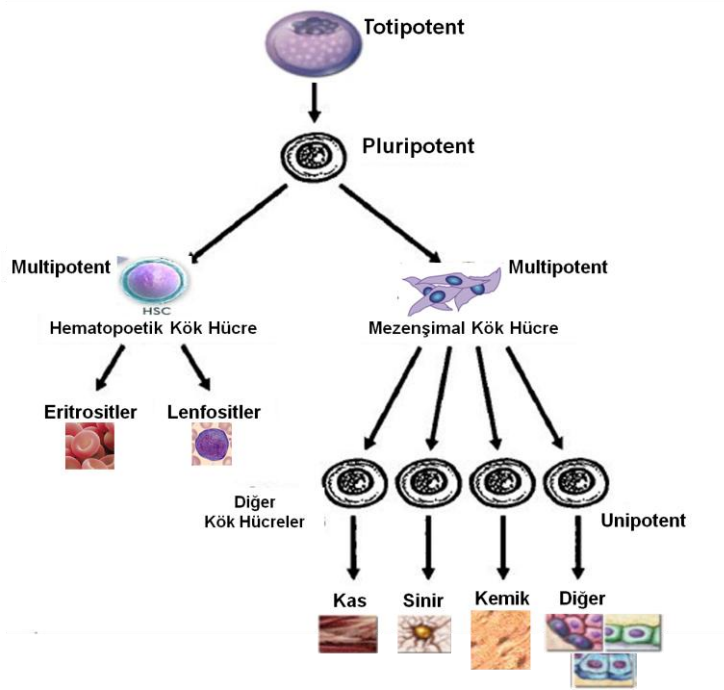
Lee ve arkadaşları EPO tedavisinin kemik iliğindeki endosteal yüzeylerdeki osteoklast sayısında artışa rağmen kortikal kalınlığı arttırdığını bildirmişlerdir (61).

Kırık iyileşmesinin ilk safhası olan inflamasyonun gereğinden fazla olmasının (62) veya azalmasının (63) da kemik iyileşmesini olumsuz etkileyebileceği hatırlanmalıdır. EPO'nun inflamasyonu hangi düzeyde etkilediği ve kırık iyileşmesi için gerekli inflamatuvar cevabın hangi ölçüde olması gerektiği araştırılması gereken bir konudur. Biz de bu çalışmamızda EPO'nun muhtemel antienflamatuvar özelliğinin füzyon oranlarına etkisini karşılaştırmak amacıyla, MSC ve EPO'nun birlikte uygulanacağı gruplara preoperatif 24. saatte ve postoperatif 72. saatte EPO uygulaması yapılmıştır.

geniş kemik defektleri, atrofik tendon rüptürleri gibi birçok konuda yenileyici tıp sayesinde alternatif tedavi seçenekleri geliştirilmiştir.

2.4.1. Tanım

Kök hücre terimi sıklıkla yanlış kullanılmaktadır. Tanım olarak, çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen ve kendini yenileyebilen hücelere kök hücre denir. Tüm kök hücreler aynı olmayıp farklılaşabilme kapasitelerine göre adlandırılırlar (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Kök hücrelerin farklılaşabilme kapasitelerine göre sınıflandırılması.

Totipotent Kök Hücre: Bir organizmadaki tüm embriyonik ve ekstra embriyonik hücelere (plasenta gibi) farklılaşabilen hücelerdir. Totipotent kök hücreler genellikle fetal gelişimin morula evresinde (embriyonun erken preimplantasyon evresindeki 2–32 hücreli hali) veya öncesinde elde edilebilirler.

Pluripotent Kök Hücre: Embriyo büyümeye devam ettikçe kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri kısıtlanmaya başlar. Blastokist evresinde

totipotent hücreler iki ayrı “pluripotent” kök hücre grubuna farklılaşmaya başlar. Bunlar embriyonik ve ekstra embriyonik hücrelerdir.

Embriyonik kök hücreler (ESC’ler) blastokistin iç tabakasında bulunur ve embriyodaki mezoderm, endoderm ve ektodermden köken alan tüm hücrelere farklılaşabilir. Blastokistin trofoektoderm bölümü ise ekstra embriyonik (trofoblast) kök hücreleri içerir ve bunlar plasentayı oluşturur.

Etik, siyasi ve dini sebepler ile ESC’lerin kullanımı çoğu ülkede yasaklanmıştır. Ülkemizde ise, in vitro fertilizasyon (IVF) uygulaması dışında ESC’ler ile çalışılmamaktadır.

Multipotent Kök Hücre: Belirli bir hücre grubunun öncülü olan “unipotent” kök hücrelere farklılaşırlar. Kemik iliğindeki hematopoetik kök hücreler, saç follikülü içerisindeki epidermal kök hücreler, intestinal villus kripleri içerisindeki intestinal kök hücreler yetişkin tip kök hücrelere örnektir.

Mezenşimal Kök Hücre: Multipotent kök hücrelerin ortopedik uygulamalar içerisinde en sık yer bulanıdır. Bunun nedeni kas iskelet sistemindeki yağ, kemik, kıkırdak, tendon/ligament, kas, stromal doku hücrelerinin hemen hepsine farklılaşabilme kapasiteleridir.

İlk defa Friedenstein ve arkadaşlarıncı 2002 yılında tanımlanmıştır (65, 66). MSC’ler kemik iliği, yağ dokusu, kas dokusu, endosteum, periosteum, perisitler (damar duvarlarındaki retiküler hücreler), kordon kanı, dental dokular ve sinovyal sıvı gibi birçok bölgede tespit edilmiştir. Bütün bu dokulardaki MSC miktarı az olup yaşla birlikte daha da azalmaktadır. Örneğin kemik iliğinde MSC’ler mono nükleer hücrelerin 1/10000–1/2000000’ini oluşturur (64). Kemik iyileşmesinde muhtemelen en önemlileri kemik iliği, endosteum, periosteum ve perisit hücreleri kaynaklı olanlardır (64, 67).

Tedavide kullanılacak ideal bir kök hücre donörden invazif olmayan bir şekilde alınabilip in vitro doku kültürlerinde hızla üretilip, konakçı kemik dokusuna yerleştirildiğinde canlı kalabilmeli ve oradaki dokuya entegre olabilmelidir. Ayrıca tümörojenik etkisi olmamalıdır (67).

Kemik iliğinde bulunan kök hücreler hematopoetik kök hücreler, hemanjioblastlar, multipotent erişkin öncül hücreler ve mezenşimal kök hücrelerdir. Kemik iliği kök hücrelerinin elde edilmesinin kolay olması, tümörojenik etkisinin düşük olması, etik sorunların daha sınırlı olması nedeniyle en fazla klinik kullanımı olan ve araştırma yapılan gruptur.

2.4.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Tanımlanması

Elde edilen hücrelerin MSC olduklarını gösterecek bir belirteç henüz ortaya konulamamıştır. Ancak bu işlemlerin in vitro ortamdaki kültürlerinin 7. gününde fibroblast kolonileri sayılarak 10^4 – 10^5 mononükleer hücre için 1 adet MSC olduğu kabul edilir.

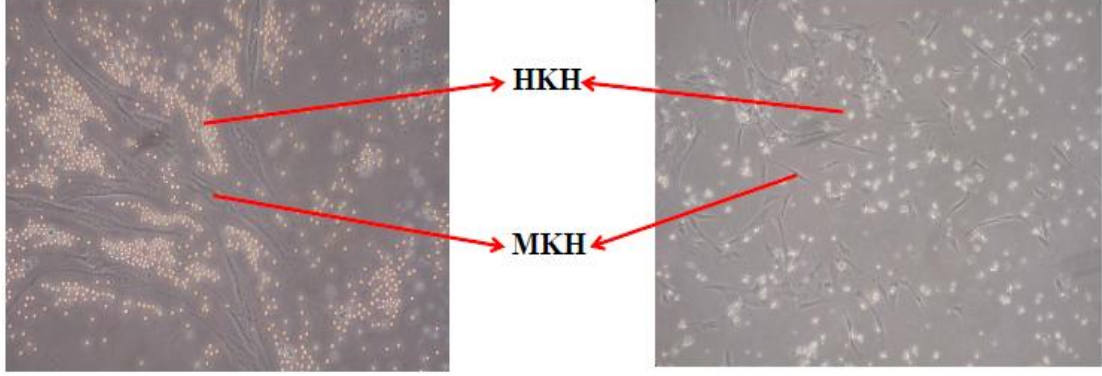
Akım sitometresinde MSC'ler hematopoetik hücrelerin en önemli belirteci olan CD45 ve CD34'ü taşımazlar. Fakat bu hücreler Thy–1 (CD90), CD106 (VCAM), β –1 integrin CD29/CD49, CD10 ve CD13 gibi markerleri ve PDGF, EGF, NGF ve IGF1 gibi reseptörleri taşırlar.

Çalışmamızda rat kemik iliğinden elde edilen hücrelerin MSC olduğunu göstermek için akım sitometrisi ile CD45 (-), CD34 (-), HLA-DR (-), CD73 (+), CD90 (+), CD105 (+) yüzey belirteçlerine bakılmıştır (Bkz. Bölüm 3.4.).

İmmün fenotipik karakteristikler ise birincil hücrelerde değil kültüre hücrelerde görünür hâle gelir. Bildirilen karakteristik belirteçler SH–2, SH–3 ve SH–4 dür. Ancak bu belirteçlerden hiçbiri MSC'ler için spesifik değildir. Ek olarak MSC'ler HLA class-1'leri de taşırlar.

MSC'lerin "*lineage*" (dizi) değiştirmesi - kemik, kıkırdak ve yağ doku-kullanılan diğer bir fonksiyonel ayırıcı yöntemdir. Kültüre edilmiş MSC'ler iğ şeklinde fibroblastik bir görünüme sahiptirler (Şekil 2.6.). Bunların osteojenik aktivasyonu için β -gliserol-fosfat, askorbik asit–2-fosfat, deksametazon ve fetal bovine serumu içeren osteojenik farklılaşma besiyeri kullanılır. Yaklaşık

üç haftalık kültür sonucunda osteoblastik hücre görünüşleri, kalsiyum birikimi ve ALP göstermesi osteoblastik farklılaşma olarak değerlendirilir.



Şekil 2.6. Çalışmamızda kullanılan kültüre edilmiş rat MSC ve HSC'lerinin inverted mikroskoftaki görüntüsü.

2.4.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Tedavide Kullanımı

MSC'ler spinal kord hasarı, amyotrofik lateral skleroz, multiple skleroz, Parkinson hastalığı, beyin iskemisi, myokard iskemisi, periferik arter hastalıkları, kardiyomyopatiler, Crohn hastalığı, ülseratif kolit, SLE, graft versus host hastalığı, kronik ülser ve yara tedavisi, siroz, mukopolisakkaridozlar, lösemi gibi tıbbın çok çeşitli alanlarındaki hastalıkların tedavisi amacıyla kullanılmakta ve araştırılmaya devam etmektedir.

İmmün yanıtı engellemek için geleneksel olarak allojenik hücre tedavileri öncesinde immüsupresif tedavi uygulanmaktadır. MSC'ler greft rejeksiyondan sorumlu T lenfositleri aktive eden Class II molekülleri ve B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) ve CD40 kostimulatuar moleküllerini hücre yüzeylerinde eksprese etmezler. Bu nedenle hipoimmunojeniktirler, konakçı immün sisteminden gizlenebilirler ve immüsupresyona gerek kalmadan kullanılabilirler. Ayrıca adiposit, osteoblast ve kondrositlere farklılaştıklarında da, stimüle edilseler bile nonimmunojenik kalmaya devam ederler (68, 69).

MSC'ler canlılıklarını ve osteoblastik farklılaşma özelliklerini kaybetmeden eksi 80 C° sıcaklıkta saklanabilmektedir (70).

MSC'lerin immün yanıt oluşturmamalarının yanında immüsupresif etkileri de gösterilmiştir. GATA' dan Nevruz ve arkadaşlarının çalışmasında, ratlarda kemik iliği nakli sonrası gelişen graft versus host hastalığında (GVHD) MSC'lerin immüsupresif etkileri gösterilmiş ve MSC'lerin klinik olarak GVHD tedavisi ve profilaksisinde kullanılabileceği bildirilmiştir (71). Benzer şekilde insanlarda yapılan klinik çalışmalarda da MSC'lerin steroid tedavisine dirençli refrakter GVHD'da etkili olabileceği bildirilmiştir (72).

Ortopedi alanında MSC'lerin kırık doku tamiri, menisküs tamiri, tendon ve kas tamiri, sinir dokusu tamirinde kullanımlarıyla ilgili birçok çalışma mevcuttur (64, 67, 68, 73-84).

GATA' dan Ural ve arkadaşlarının çalışmasında in vitro koşullarda farklılaştırılan MSC'ler ve okside selülozun tavşankulaklarında oluşturulan kırık doku defektlerinin iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (85). Kliniğimizde devam eden bir çalışmada; tavşanların her iki dizinde menisküs avasküler bölgesinde oluşturulan tam kat vertikal defektin diz içi MSC enjeksiyonu sonrası defektlerin kontrol grubuna göre makroskopik ve histolojik olarak daha fazla iyileşme gösterdiği gözlemlenmiştir (77).

MSC'lerin çok geniş bir kullanım alanı olması nedeniyle ilerleyen bölümlerde sadece kırık iyileşmesi ve spinal füzyondaki kullanımlarından bahsedilmiştir.

2.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Kemik İyileşmesi ve Spinal Füzyonda Kullanımı

Travma, enfeksiyon ve tümörler nedeniyle oluşabilen geniş kemik defektlerinin ve kaynamama problemlerinin tedavisi MSC kullanımının ana alanını oluşturmaktadır. Bu problemlerde günümüzde hala altın standart

otolog kemik greftlerinin kullanımınıdır. Ayrıca vaskülarize otolog kemik greftleri veya allojenik kemik kullanımı da yaygındır. Ancak bu yöntemlerin donör alan morbiditesi, kısıtlı kemik stoku, allojenik kemiklerdeki enfeksiyon riski veya rejeksiyon gibi çeşitli kısıtlamaları mevcuttur (64). Birçok çalışma kırık iyileşmesinin ve kemik defektlerinin MSC'lerin tek başına veya aşağıda belirtilen kombinasyonlarla hızlandırılabilceğini göstermektedir. Bu da otolog greftlere ihtiyacın azalacağı ve kaynamama problemlerinin azaltılabileceğini düşündürmektedir.

Kemik iyileşmesi ile ilgili ayrıntılı bilgiler Bölüm 2.2.8.'de verilmiştir. Burada hatırlanması gereken nokta, kemik iyileşmesinin başlarında oluşan düşük oksijen basıncı ve yüksek pH değerlerinin hipoksisinin düzeltilmesi için gerekli sitokinlerin salınımını sağladığıdır. Kırık bölgesindeki plateletler, inflamatuvar hücreler ve makrofajlar IL-1, IL-6, PDGF, VEGF ve BMP gibi çeşitli sitokinleri salgılayıp yeni damar oluşumunu, MSC'lerin yaralanma bölgesine toplanmasını ve sonuç olarak osteoblast ve kondrositlere farklılaşarak kemik iyileşmesini sağlarlar (67). MSC'lerin kırık iyileşme bölgesine nasıl göç ettiği tam olarak bilinmemekle birlikte çeşitli sitokin ve kemokinlerin görev aldığı ve MSC'lerde bu sitokinlere ait reseptörlerin olduğu gösterilmiştir.

Bu sitokinlerden TGF- β , kemik iliği kaynaklı MSC'ler için etkili bir kemotaktik sitokindir. MSC'lerin osteoblast ve kondroblastlara dönüşümünü uyarır. Ayrıca kollajen, fibronektin, osteopontin, osteonektin, proteoglikanlar ve ALP üretimini uyarır. TGF- β emdirilmiş kollajen hidrojelin tavşanlarda oluşturulan humerus başı defektlerinde iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (67). Diğer bir sitokin olan FGF, kemik iyileşmesinin erken safhalarında anjiyogenez ve mezenşimal hücre mitozunu uyararak önemli bir rol oynar. Eksojen FGF uygulaması, kallus yeniden şekillenmesini ve biyomekanik dayanıklılığı artırıp kemik iyileşmesini hızlandırabilir (67). Etkisi doz bağımlı olup tek bir enjeksiyonu kallus içerisindeki kondrojenik öncül hücrelerin çoğalmasını ve daha fazla kırıkta üretmesini sağlayabilir ancak kondrosit maturasyonu veya kırıkta dokunun kemik doku ile değiştirilmesini etkilemez

(86). PDGF ise inflamatuvar hücreler için güçlü bir kemotaktik madde olup MSC ve osteoblast çoğalması ve göçünde güçlü etkileri mevcuttur. PDGF ve BMP'lerin kombine kullanımının kemik iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir ancak klinik kullanım açısından uygunluğu tartışmalıdır (67).

MSC tedavisi:

- Sistemik infüzyon,
- Tedavi bölgesine direkt enjeksiyon,
- Skafold özellikli maddelerle kombinasyon,
- Çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler ile kombinasyon,
- Genetik olarak modifiye edilmiş (viral veya non viral vektörler kullanılarak transfekte edilmiş vb.) hücrelerin verilmesi şeklinde yapılabilmektedir.

2.5.1. Mezenşimal Kök Hücrelerin Sistemik İnfüzyonu

Sistemik infüzyonla MSC kullanımı osteogenezis imperfekta, kas distrofileri gibi çeşitli sistemik hastalıklarda bildirilmiştir (87-89). Sistemik olarak verilen MSC'lerin çoğunluğunun akciğerlerde tutulması nedeniyle lokal kullanımlar ön plana çıkmıştır (67).

2.5.2. Mezenşimal Kök Hücrelerin Tedavi Bölgesine Direkt Enjeksiyonu

Bu tedavi yöntemi genellikle psödoartroz ve nonunionlarda perkütan kullanım şeklindedir.

MSC izolasyonu ve kültürünün yaygınlaşmasından önce genellikle kemik iliğinden elde edilen aspiratın tedavi bölgesine enjeksiyonu uygulanmaktaydı. Connolly ve arkadaşları 1991 yılındaki çalışmalarında (90) 5 yıldan uzun süreli tibia psödoartrozu olan 20 vakada kemik iliği aspiratı ve İMN veya alçı tespitinin birlikte uygulamasının etkili olduğu ve otolog greft ve açık psödoartroz tamirine alternatif olabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmaya benzer şekilde Garg (91), Kettunen (92), Hernigou (93), Goel (94) gibi

araştırmacılar tibia ve femur gibi uzun kemiklerdeki nonunion veya gecikmiş kaynamalarda başarılı sonuçlar bildirmişlerdir.

Hücre kültürü ve MSC izolasyon tekniklerinin ilerlemesi ile çalışmalar izole MSC tedavilerine yönelmiştir. GATA' dan Ural ve arkadaşlarının çalışmasında tavşanlarda oluşturulan segmental tibia defektinde uygulanan lokal MSC enjeksiyonunun kontrol grubuna göre daha hızlı iyileşme sağladığı ve eksternal fiksator tutulma süresinin kısaltıldığı gösterilmiştir (95). Ayrıca MSC'lerin femur başı avasküler nekrozu tedavisinde(96-98), kemik defektlerinin kapatılmasında (99-101), basit kemik kistlerinin tedavisinde (102-104), osteokondral kemik defektlerinin kapatılmasında (105), yüksek tibial osteotomide iyileşmenin hızlandırılmasında (106), distraksiyon osteogenezinde iyileşmenin hızlandırılmasında (107) da etkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur.

2.5.3. Mezenşimal Kök Hücrelerin Skafold Özellikli Maddelerle Kombinasyonu

Güncel literatür incelendiğinde spinal füzyonla ilgili çalışmalarda genellikle skafoldlar ile kombinasyon yönteminin yaygın olduğu görölmektedir.

Huang ve arkadaşları (108) MSC'yle birlikte hidroksiapatit ve tip I kollajen skafold kombinasyonunun tavşan posterolateral spinal füzyon modelinde etkili ve başarılı bir biçimde kullanılabileceğini bildirmişlerdir. Benzer çalışmalarla MSC'lerin farklı skafoldlar ile posterolateral spinal füzyonda başarıyı arttırdığı bildirilmiştir (67, 81, 108-115).

Urrutia ve arkadaşları osteojenik olarak diferansiye edilmiş otolog kemik iliği kaynaklı MSC'lerin tavşan posterolateral spinal füzyon modelindeki etkinliğini inceledikleri çalışmalarında; sadece otolog kemik grefti ve otolog kemik greftiyle birlikte MSC pelleti kullanılan 15'er tavşanı karşılaştırmışlardır. Sadece otolog greft kullanılan grupta füzyon oranı %53; MSC ve otolog greft kombinasyonu kullanılan grupta füzyon oranı %0 ($p<0.05$) olarak bildirilmiştir.

Bu bulgulara dayanarak osteoblastik farklılaşma uygulanmış otolog kemik iliği kaynaklı MSC'lerin "scaffold" olmadan kullanımının füzyon oranlarını arttırmamakla birlikte kemik gelişimini tamamen inhibe ettiğini göstermişlerdir (116).

2.5.4. Mezenşimal Kök Hücrelerin Büyüme Faktörleri ve Sitokinler ile Kombinasyonu

Bu faktörlerden en çok çalışılanları BMP-2, BMP-7 ve BMP-4'tür.

Salamon ve arkadaşları, Sprague-Dawley ratlarda oluşturulan tek seviyeli posterolateral intertransvers füzyon modelinde BMP-7' nin etkinliğini araştırmışlar ve füzyonu doz bağımlı olarak arttırdığını göstermişlerdir (117).

Ohyama ve arkadaşları köpeklerde disektomi sonrası yerleştirilen lomber interbody füzyon kafeslerine beta-trikalsiyum fosfat (β -TCP) ve rhBMP-2'nin kombine olarak uygulanmasının etkili olduğunu ve klinik kullanımda kemik greftlerine alternatif olarak uygulanabileceğini bildirmişlerdir (118).

Grauer ve arkadaşları Yeni Zelanda cinsi tavşanlarda oluşturulan tek seviyeli lomber posterolateral intertransvers füzyon modelinde OP-1'in etkinliğini araştırmışlar ve kontrol gruplarına kıyasla 5 hafta içerisinde solid bir füzyon sağladığını göstermişlerdir (119).

Alanay ve arkadaşları ise BMP Bağlayıcı Peptid (*BMP Binding Peptide*, BBP) ve rhBMP-2 kombinasyonunun ratlarda oluşturulan posterolateral intertransvers füzyon modelinde etkinliğini araştırmışlar ve BBP'nin solid bir füzyon ve tatmin edici bir klinik sonuç için gerekli olan rhBMP-2 miktarını azalttığı ve yüksek dozla ilgili potansiyel yan etkilerini engelleyebileceğini bildirmişlerdir. Ayrıca çok yüksek fiyatlar ile satılan BMP'lerin daha az miktarda ve etkin bir biçimde kullanımını sağlayarak ekonomik açıdan da büyük fayda sağlayabileceğini önermişlerdir (120).

Cheng ve arkadaşları Yeni Zelanda cinsi tavşanlarda oluşturulan tek seviyeli posterolateral intertransvers füzyon modelinde rhBMP-4'ün etkinliğini araştırmışlardır. Farklı dozlardaki rhBMP-4 poröz bir hidroksiapatit-TCP seramik skafold ile kombine olarak füzyon hattına konulmuş ve rhBMP-4'ün doz bağımlı olarak füzyonu arttırdığını göstermişlerdir. Ayrıca rhBMP-4'ün etkin dozunun rhBMP-2 ve rhBMP-7'den 10 kat daha az olduğunu bildirmişlerdir (121).

2.5.5. Mezenşimal Kök Hücrelerin Genetik Modifikasyon Sonrasında Kullanımı

Skafold özellikli maddeler, çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinler ile kombinasyon şeklinde kullanımlar gelecek vaat etse de; MSC'lerin proliferasyonu ve canlılığını sürdürmesi ve büyüme faktörlerinin uzun süre salınımını sağlayabilmek hala bir problemdir. Bu nedenle MSC'lerin genetik olarak modifiye edildiği çalışmalar yapılmaktadır. Adenovirüs, lentivirüs gibi viral veya non viral vektörler kullanılarak MSC DNA'sı transfekte edilmekte ve istenilen büyüme faktörü veya sitokinin MSC'lerin bulunduğu bölgede uzun süre salınımı sağlanmaktadır (122).

Wang ve arkadaşları Lewis cinsi ratlarda oluşturulan tek seviyeli posterolateral intertransvers füzyon modelinde; ex vivo adenovirüs gen transferi ile oluşturdukları BMP-2 üreten kemik iliği hücrelerini füzyon bölgesine yerleştirmişlerdir. Farklı gruplarda skafold olarak guanidin hidroklorid ekstrakte DBM ve kollajen sünger kullanmışlardır. Sonuç olarak adenovirüs ile transfekte edilmiş kemik iliği hücrelerinin füzyon sağlayabilmek için yeterli miktarda BMP-2 üretebildiğini göstermişlerdir (123).

Zhu ve Boachie-Adjei ile arkadaşlarının ratlarda oluşturdukları tek seviyeli posterolateral intertransvers füzyon modelinde adenovirüs kullanılarak kombine BMP-2 ve BMP-7 gen transferleri yapılan kemik iliği hücrelerinin füzyona olan etkisini karşılaştırmışlar ve kombine gen transferinin tek başına olana kıyasla belirgin olarak daha çok sayıda ve

mekanik olarak daha stabil füzyon oluşturduğunu ve kemik hacmi ile mineralizasyonun 2 kat daha fazla olduğunu göstermişlerdir (124).

Miyazaki ve arkadaşları lentivirüs ve adenovirüs kullanılarak BMP-2 gen transferleri yapılan kemik iliği hücrelerinin ratlarda spinal füzyona olan etkisini karşılaştırmışlar ve lentivirüs kullanımının daha belirgin füzyon sağladığını bildirmişlerdir (25).

2.6. Eritropoetin ve Mezenşimal Kök Hücrelerin Birlikte Kullanımı

Eritropoetin sitoprotektif, antiapoptotik, antioksidatif, osteojenik, kondrojenik, anjiyojenik, antienflamatuar etkilerinden önceki bölümlerde ayrıntılı olarak bahsedilmiştir (Bkz. Bölüm 2.3.4., Bölüm 2.3.5., Bölüm 2.3.6., Bölüm 2.3.7. ve Bölüm 2.3.8.). Özetleyecek olursak:

- HSC'leri uyararak BMP-2 ve BMP6 sentezlenmesini sağlar. BMP'ler de BMP-R'lere bağlanarak öncül hücrelerde osteoblastik farklılaşmayı sağlar (58),
- MSC'lerde Runx2 gen ekspresyonunu artırır, ALP düzeyini ve mineralizasyon artışını sağlar (58),
- MSC'lerin apoptozunu engeller (125),
- HPC'lerden osteoklast oluşumuna etki ederek osteoklastik aktiviteyi de artırır (58),
- HSC'ler ve osteoblastik öncül hücrelere etki eder (58),
- NFkB seviyelerini azaltarak inflammatuar sitokinlerin salınımını azaltır ve antienflamatuar etki gösterir (59),
- Distraksiyon osteogenezinde kemik kalitesini ve iyileşme hızı ile anjiyogenezi artırır (60),
- Santral ve periferik sinir sisteminde oluşturulan nöronal hasar modellerinde nöroprotektif, antioksidatif, antiapoptotik ve antienflamatuar etki gösterir (33, 44),

- Akut inme hastalarında infarkt alanında küçülme, nörolojik bulgu ve klinik tablolarında düzelme sağlar (46),
- HSC ve EPC'lerin proliferasyonunu sağlar, apoptozunu engeller, mobilizasyonunu uyarır ve anjiyogenezi artırır (28, 126, 127),
- İskemi reperfüzyon hasarı sonrası kardiyomyositlerin apoptozunu engeller (36),
- Böbrek epitelyal hücrelerinde iskemi reperfüzyon hasarı sonrası gelişen apoptozu engeller (38),
- Yara iyileşmesi, iskemik cilt lezyonları, deneysel yanık lezyonları gibi hayvan modellerinde anjiyogenez ve reepitelizasyonu artırır (55, 56).

MSC'lerin antiinflamatuvar, immünsupresif, anjiyojenik, osteojenik, kondrojenik, etkilerinden önceki bölümlerde ayrıntılı olarak bahsedilmiştir (Bkz. Bölüm 2.5.). Özetleyecek olursak:

- IL-1, IL-6, PDGF, VEGF ve BMP gibi sitokinlerin salgılanmasını sağlayarak yeni damar oluşumu, MSC'lerin yaralanma bölgesine toplanmasını ve osteojenik ve kondrojenik farklılaşmayı sağlar (67),
- TGF- β tarafından uyarılıp osteoblast ve kondroblastlara dönüşür. Ayrıca kollajen, fibronektin, osteopontin, osteonektin, proteoglikanlar ve ALP üretimini uyarır,
- FGF anjiyogenez ve mezenşimal hücre mitozunu uyarır (86),
- PDGF MSC ve osteoblastların çoğalması ve göçünde etkilidir (67),
- İmmünsupresif etkileri mevcuttur (71, 72).

İnflamasyonun düzenlenmesi konusunda ortak özelliklere sahip EPO ve MSC'lerin birlikte kullanımıyla ilgili çalışmalar literatürde çok az olup, genellikle iskemik beyin hasarı ve böbrek iskemisiyle ilgilidir. İlk çalışmalar genellikle EPO geni ile transdükte edilmiş MSC'lerin kullanımı şeklindedir.

EPO'nun sistemik yan etkileri azaltmak amacıyla sadece nöral dokularda lokal EPO salınımı yapan genetik olarak modifiye edilmiş MSC'ler oluşturulmuştur (128). Bu hücrelerin iskemik beyin hayvan modellerinde nörotrofik, antioksidan, antiapoptotik ve antienflamatuar etki gösterdiği ve hematokrit seviyelerini yükseltmeden iskemiye belirgin oranda azalttığı bildirilmiştir (129). Burada dejenere SSS hücrelerindeki hipoksi, glutamat artışı ve beta amiloid birikiminin toksik bir ortam oluşturduğu ve MSC'lerin canlılığını, çoğalmasını ve farklılaşmasını etkilediği ve EPO'nun bu etkileri tersine çevirdiği düşünülmektedir.

Ratlarda oluşturulan ekstremite iskemisinde, EPO ve MSC'lerin birlikte kullanımının anjiyogenezi artırıp daha üstün bir şekilde iskemiye azalttığı ve periferik arter hastalıklarında kullanılabilir bir modalite olabileceğinden bahsedilmektedir (125). Benzer şekilde lokal EPO salınımı yapan MSC'lerin kardiyovasküler ve renal koruyucu etkilerinin belirgin bir şekilde arttığı bildirilmiştir (130, 131).

EPO ve MSC'lerin tek başlarına kırık iyileşmesi ve spinal füzyonda kullanımı ile ilgili birçok çalışma mevcuttur ancak bilindiği kadarıyla birlikte kullanımlarını konu alan herhangi bir araştırma yoktur. Yukarıdaki mekanizmaların kemik dokudaki ortak etkilerini araştırmak amacıyla çalışmamız yapılmıştır.

2.7. Hayvan Deneyleri ile İlgili Genel Bilgiler

Bilimsel araştırmalarda yeni fikir ve hipotezlerin öncelikle in vitro (laboratuvar deneyleri) ve in siliko (bilgisayar bazlı simülasyonlar) veya in vivo (hayvan modelleri) olarak etkili ve güvenli oldukları kanıtlandıktan sonra klinik çalışmalarla yapılmaktadır. Spinal füzyonun 20. yüzyılın başlarında bildirilmesinden günümüze kadar omurga cerrahisi alanında kaydedilen büyük ilerlemelerde hayvan deneyi modellerinin büyük bir payı vardır. Spinal

füzyonla ilgili bilinen ilk hayvan modeli Albee'nin 1913 yılında köpeklerde uyguladığı posterior füzyonun modelidir (132).

Hayvan deneyleri sayesinde füzyon biyolojisi, implantların geliştirilmesi, greft ve kemik yerine geçebilecek maddelerin geliştirilmesi, beslenme ve büyüme faktörlerinin etkisi, radyasyon maruziyetinin, NSAİİ'lerin ve nikotinin füzyona etkisiyle ilgili önemli bilgiler elde edilmiştir (133). İdeal bir hayvan deneyi modelinin özellikleri şunlardır (117):

- Deney hayvanının deneysel çalışmalara uygun olması,
- Kısa bir zaman diliminde birden çok deneğin gözlemine izin vermesi,
- Tekrarlanabilir olması ve sonuçlarının ekstrapolasyonuna izin vermesi.

Schimandle ve arkadaşlarına göre deney hayvanı seçiminde etkili olan faktörler şunlardır (134):

- Deney hayvanının biyolojik özellikleri ile ilgili mevcut geniş bir veritabanı olması,
- Deney hayvanının biyolojik özelliklerinin insanlarla benzer olması,
- Deney hayvanının elde edilebilirliği (gereken miktar, etik konular vb.),
- Deney hayvanının tür içerisindeki benzerliğin yüksek oranda olması,
- Deney hayvanının tutsaklığı tolere edebilmesi,
- Deney hayvanının yapılacak işlem için gerekli büyüklükte olması,
- Yapılacak işlemin deney hayvanına kolay uygulanabilmesi (deneğin korku düzeyinin az olması, saldırgan olmaması, kaçmaması),
- Deney hayvanının anestezi ve cerrahiye tolere edebilmesi,

- Deneysel hayvanının enfeksiyon ve hastalıklara dirençli olması,
- Deneysel hayvanının fiyatı ve günlük bakım ücretlerinin uygunluğu,
- Barındırma, besleme, bakım ve temizlik kolaylığı,
- Yeterli tesis ve personel desteğinin olmasıdır,
- Lojistik ve ekonomik olarak kabul edilebilir olması.

2.8. Spinal Füzyonda Hayvan Deneysel Modelleri

Spinal füzyon hayvan modeli için primat, koyun, keçi, domuz, köpek, kedi, tavşan, kobay, rat gibi çeşitli hayvanlar kullanılmıştır (118, 135-142). Bunlardan en sık kullanılanları tavşanlar ve ratlar olup ileriki bölümlerde bahsedilecektir.

İnsanlar dâhil, primatlarda kemik oluşumu filogenetik olarak daha alt basamaklarda olan hayvanlara göre daha kısıtlıdır. Daha büyük hayvanlarda füzyon oluşumunu sağlamak gittikçe güçleştiğinden hayvan modellerinde genellikle daha küçük hayvanlar seçilir. Köpekler gibi belirli türlerin endojen füzyon oranları çok yüksek olup sadece posterolateral elemanların dekortikasyonu ile sağlanabilir. Diğer sık yapılan hatalardan birisi iyileşme ve füzyon oluşturma yeteneği yüksek olan immatür hayvanların kullanımıdır. Elde edilen verileri insanlara yorumlayabilmek için temel olarak insanlarda görülen sonuçları gösterebilecek hayvan modelinin seçilmesi esastır (133).

Otogreft kullanımı spinal füzyonda altın standart olup iliak krest kullanımı gerekiyorsa yeterli derecede kemik stoku olan hayvanlar kullanılmalıdır.

2.8.1. Tavşan Modelleri

İliak krest otolog greftinin yeterli miktarda olduğu ve kontrol grubu olarak kullanılacak en küçük hayvan modeli tavşanlardır. Genellikle tek

seviyeli posterior spinal füzyon modeli için kullanılırlar. Patel ve arkadaşları (143) nikotinin spinal füzyon üzerindeki olumsuz etkilerini göstermişlerdir.

Tavşan modelleri posterolateral spinal füzyon açısından insanlara yakın sonuçlar gösterdiği için yaygın olarak greft benzeri maddeler, büyüme faktörleri ve farmakolojik ajanların etkilerini incelemek amacıyla kullanılmıştır. Sıklıkla Yeni Zelanda cinsi beyaz tavşanlar posterior ve posterolateral spinal füzyon modellerinde kullanılmaktadır. Nikotin ve NSAİİ'lerin spinal füzyona etkisi, manuel palpasyon ve füzyon kitlesinin mekanik olarak değerlendirilmesi gibi birçok çalışmada kullanılmıştır (144-146). Ancak, maliyetleri ratlara göre daha fazladır, bakımları daha güçtür ve cerrahi/anesteziye dayanıklılıkları daha azdır.

2.8.2. Rat Modelleri

Spinal füzyon çalışmalarında kullanılan en küçük hayvan olup bizim çalışmamızda olduğu gibi sıklıkla Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanılmaktadır.

Rat modeli en sık tek seviyeli posterior spinal füzyon için kullanılmaktadır. Küçük olmalarından dolayı sadece enstrümantasyonun kullanılmadığı posterior ve posterolateral spinal füzyon çalışmalarında kullanılmaktadır. İnsan kaynaklı greftler, DBM gibi maddelerin immün yanıt oluşturmaması için atimik ratlar; osteoporotik kemik iyileşmesi modeli oluşturmak için overektomili (ovaryumları eksize edilen) ratlar da çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ratların diğer hayvan modellerine göre avantajları:

- Daha ucuz olması,
- Daha kolay bulunabilmesi,
- Daha az bakım ve insan gücü gerektirmesi,
- Cerrahi stres ve anesteziye dayanıklı olması,
- Göreceli olarak enfeksiyona dirençli olması,

- Diğer hayvan modellerine kıyasla daha az etik problem oluşturmasıdır.

Dezavantajları ise (117):

- Küçük olması,
- Manipüle edilmesinin büyük hayvanlara göre daha güç olması,
- Anatomik ve biyolojik özellikleri açısından insanlarla ortak noktalarının çok az olması,
- Elde edilen doz ve etkinlik ile veriler direkt olarak insanlara uyarlanamaması (147),
- Omurga biyomekaniklerinin dörtayak üzerinde yürümelerinden dolayı (*quadruped*) insanlardan farklı olması,
- Cerrahi işlemde omurga stabilitesini tam olarak sağlamak için kullanılabilir bir internal tespit cihazı olmaması,
- Kullanılabilir otogreft miktarının çok az olmasıdır.

GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul ve Proje Onayı

Çalışma için GATA Hayvan Denepleri Etik Kurulu'nun 08 Şubat 2013 toplantı tarihli ve 13/26 numaralı kararı ile etik kurul onayı alınmıştır.

Bu çalışma AR-2014/04 numaralı araştırma projesi teklifi kapsamında; GATA Araştırma Bilimsel Kurulu'nun 07 Mart 2014 tarih ve (231) 02 sayılı toplantısı ile onaylanarak; Mart 2014 – Haziran 2014 tarihleri arasında yürütülmüştür. Proje kapsamında GATA Araştırma Bilimsel Kurulu'ndan MSC üretiminde kullanılacak laboratuvar sarf malzemeleri ve rhEPO tedavisi için 10.485,80 TL tutarında mali destek alınmıştır.

3.2. Örnek Büyüklüğünün Seçimi

Sonuç değişkeni olarak oluşan füzyon kütlesi hacmi kullanılması durumunda, gruplar arasında 400mm³ kütle farkı oluşması ve genel standart sapmanın 150 bulunması varsayımları ile %95 güven aralığı ve %80 güç için her bir grupta 6 adet rat kullanılması gerektiği hesaplandı. Olası kayıplar göz önüne alınarak her bir grupta 7 adet rat ile çalışmaya başlanması (11 grup için toplam 77 rat), ayrıca MSC elde edilmesi için 3 rat kullanımı planlandı. Örnek büyüklüğü hesaplamada *StudySize 2,0* yazılımı kullanıldı.

3.3. Çalışma Tasarımı

3.3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada GATA Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Deney Hayvanları Kısmı'nca üretilen ve bu merkezde bakılan 18–20 haftalık, ortalama 253,2±32 gr. ağırlığında 80 adet dişi Sprague-Dawley cinsi rat kullanıldı.

12 saatlik aydınlık ve karanlık siklusunun olduğu ve ısısının 19–20 C° arasında tutulduğu bu odada ratlar üçer ve dörderli gruplar şeklinde kafeslere kondu ve standart besin rejimi (*ad libitum* pellet yem ve su) ile beslendi. 3 günde bir kafes temizliği yapıldı ve su ile yemleri günlük olarak tazelendi.

3.3.2. Deney Grupları

Toplam 77 rat rastgele olarak 11 gruba ayrıldı (Tablo 3.1.).

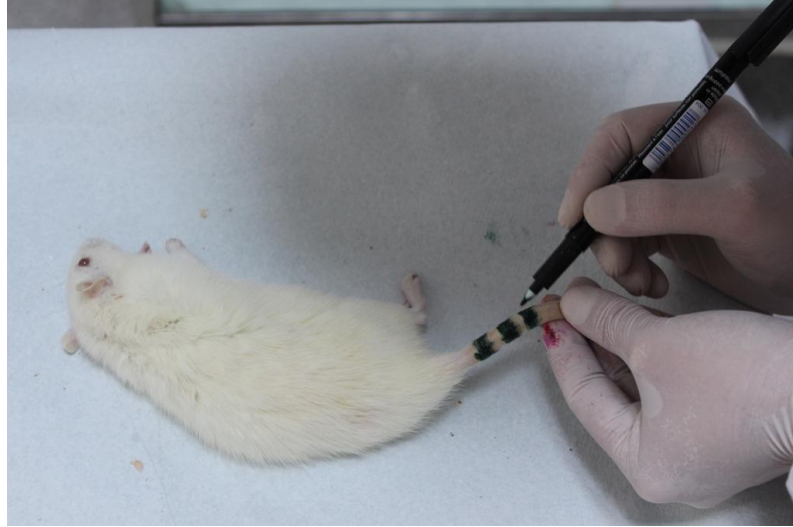
Tablo 3.1. Deney grupları, rat sayıları ve uygulanacak girişimlerin açıklamaları.

Grup Adı	Açıklama	Rat Sayısı
Grup 1 Negatif Kontrol (NK)	Herhangi bir cerrahi veya tıbbi işlem uygulanmayanlar	7
Grup 2 Pozitif Kontrol (PK_3)	Sadece cerrahi işlem uygulanan ve cerrahi sonrası 3. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 3 Pozitif Kontrol (PK_6)	Sadece cerrahi işlem uygulanan ve cerrahi sonrası 6. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 4 (EPO_3)	Cerrahiden 24 saat önce EPO uygulamasına başlanan ve cerrahi sonrası 3. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 5 (EPO_6)	Cerrahiden 24 saat önce EPO uygulamasına başlanan cerrahi sonrası 6. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 6 (MSC_3)	Cerrahi sırasında MSC uygulanan ve cerrahi sonrası 3. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 7 (MSC_6)	Cerrahi sırasında MSC uygulanan ve cerrahi sonrası 6. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 8 (pre24EPO+MSC_3)	Cerrahiden 24 saat önce EPO uygulamasına başlanan, cerrahi sırasında MSC uygulanan ve cerrahi sonrası 3. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 9 (pre24EPO+MSC_6)	Cerrahiden 24 saat önce EPO uygulamasına başlanan, cerrahi sırasında MSC uygulanan ve cerrahi sonrası 6. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 10 (MSC+post72EPO_3)	Cerrahi sırasında MSC uygulanan, cerrahi sonrası 72. saatte EPO uygulamasına başlanan ve cerrahi sonrası 3. haftada sakrifiye edilenler	7
Grup 11 (MSC+post72EPO_6)	Cerrahi sırasında MSC uygulanan, cerrahi sonrası 72. saatte EPO uygulamasına başlanan ve cerrahi sonrası 6. haftada sakrifiye edilenler	7

3.3.3. Ratların İşaretlenmesi ve Randomizasyon

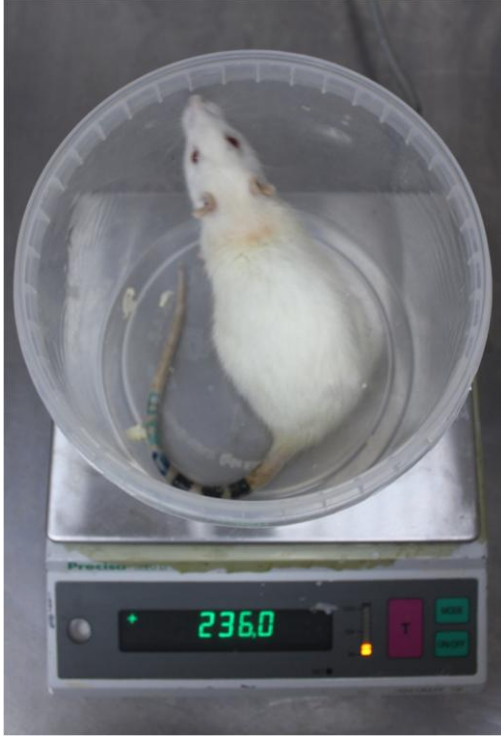
Ratların radyolojik, histopatolojik ve mekanik değerlendirmeler ile kafes değişimi, temizlik vb. nedenlerle karışmasını engellemek amacıyla anestezi uygulamasından hemen sonra kuyruklarına kalıcı asetat kalemi (Faber-Castell Multimark 1525 Permanent) ile aşağıdaki şekilde işaretleme yapıldı (Şekil 3.1). 3. haftaki radyolojik incelemeler sırasında ratlar anestezi altında iken işaretleri yenilenerek silinmeleri engellendi:

- 1. rat: 1 adet siyah halka
- 2. rat: 2 adet siyah halka
- 3. rat: 3 adet siyah halka
- 4. rat: 1 adet kırmızı halka
- 5. rat: 2 adet kırmızı halka
- 6. rat: 3 adet kırmızı halka
- 7. rat: 1 adet siyah ve 1 adet kırmızı halka



Şekil 3.1. Ratların işaretlenmesi.

Tüm ratların cerrahiden önceki gün ağırlıkları ölçülerek kaydedildi (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Ratların cerrahi öncesi ağırlıklarının ölçümü.



Şekil 3.3. İntraperitoneal enjeksiyon uygulaması.

Radyoloji, patoloji ve manuel palpasyon değerlendirmeleri sırasında randomizasyon ve körleme çalışabilmek amacıyla rastgele sayı sıraları üreten www.random.org/sequences/ sitesinden faydalanıldı. Radyolojik incelemeler için ratların PACS sistemine kaydı “Radyoloji No” ile yapıldı.

Histopatolojik inceleme ve manuel palpasyon ile mekanik değerlendirme için eksize edilen omurga segmentleri steril idrar kaplarına konuldu ve “Doku No” kullanılarak etiketlendirildi (Tablo 3.2.).

Tablo 3.2. Randomizasyon için kullanılan “Radyoloji” ve “Doku” numaraları.

Grup No	Rat No	Radyoloji No	Doku No	Grup No	Rat No	Radyoloji No	Doku No	Grup No	Rat No	Radyoloji No	Doku No
1	1	65	45	5	1	38	21	9	1	44	69
1	2	11	25	5	2	17	15	9	2	69	54
1	3	54	11	5	3	30	22	9	3	18	75
1	4	3	49	5	4	55	30	9	4	25	77
1	5	6	38	5	5	5	76	9	5	4	60
1	6	15	65	5	6	68	10	9	6	23	17
1	7	62	57	5	7	76	33	9	7	22	23
2	1	72	56	6	1	50	4	10	1	16	20
2	2	52	28	6	2	37	72	10	2	74	16
2	3	7	66	6	3	53	36	10	3	13	37
2	4	57	39	6	4	2	27	10	4	27	32
2	5	67	8	6	5	66	34	10	5	8	31
2	6	47	13	6	6	21	14	10	6	36	51
2	7	33	7	6	7	34	53	10	7	49	47
3	1	39	41	7	1	59	19	11	1	9	29
3	2	46	12	7	2	28	52	11	2	31	55
3	3	35	44	7	3	42	68	11	3	56	42
3	4	43	5	7	4	77	70	11	4	32	61
3	5	75	74	7	5	71	73	11	5	45	67
3	6	19	6	7	6	48	1	11	6	70	46
3	7	41	2	7	7	10	35	11	7	63	26
4	1	58	64	8	1	14	40				
4	2	60	62	8	2	29	9				
4	3	64	48	8	3	24	43				
4	4	1	71	8	4	51	24				
4	5	61	63	8	5	26	50				
4	6	40	59	8	6	73	18				
4	7	12	3	8	7	20	58				

3.3.4. Anestezi

Çalışma sürecinde deney hayvanlarına yapılan tüm radyolojik çalışmalar ve cerrahi işlemler GATA Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Cerrahi Araştırma Kısmı'nda görevli bir uzman veteriner hekim eşliğinde genel anestezi altında gerçekleştirildi. Anestezi altında geçen sürede gelişen ağrı yanıtı, solunum sıkıntısı gibi problemler uzman veteriner hekimce değerlendirilip gerektiği takdirde idame dozunda anestezi verildi ve nazal kanül aracılığıyla O₂ desteği sağlandı.

Cerrahi işlem için intraperitoneal olarak 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Alfazyne %2, Alfasan International B.V.,Woerden,Hollanda) ve 50 mg/kg ketamin hidroklorid (Brema-Ketamin %10, Bremer Pharma, Almanya) kullanıldı. Gerektiğinde idamesi için 5 mg/kg ksilazin hidroklorid ve 25 mg/kg ketamin hidroklorid kullanıldı (Tablo 3.3.) (Şekil 3.3.).

Radyolojik görüntülemeler için intraperitoneal olarak 10 mg/kg ksilazin hidroklorid ve 50 mg/kg ketamin hidroklorid kullanıldı. Gerektiğinde idamesi için 5 mg/kg ksilazin hidroklorid 10 mg/kg ketamin hidroklorid kullanıldı.

Tablo 3.3. Çalışmada kullanılan anestezi madde ve dozları.

	İndüksiyon Dozu	İdame Dozu	Veriliş Yolu
Cerrahi İşlem	10 mg/kg ksilazin 50 mg/kg ketamin	5 mg/kg ksilazin 25 mg/kg ketamin	İntraperitoneal
Radyolojik İncelemeler	10 mg/kg ksilazin 50 mg/kg ketamin	5 mg/kg ksilazin 10 mg/kg ketamin	İntraperitoneal
Sakrifikasyon	100 mg/kg ketamin	-	İntraperitoneal

3.3.5. Radyolojik Değerlendirme

Radyolojik görüntülemeler GATA Radyoloji AD. Başkanlığı'nda bulunan dijital mammografi cihazı ve bilgisayarlı tomografi cihazı kullanılarak genel anestezi uygulaması altında gerçekleştirildi.

Görüntülemeler ncesinde GATA Radyoloji A.D. başkanlığında görevli, ratlarda radyolojik incelemeler konusunda tecrübeli bir ğretim yesi ile koordinasyon sağlanarak görüntüleme protokolleri belirlenip standardize edildi ve görüntülemeler bu birimlerde görevli BT ve radyoloji teknisyenleriyle birlikte yapıldı. Anestezi ve vital fonksiyonlarının takibine GATA Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Cerrahi Araştırma Kısımı'nda görevli bir uzman veteriner hekim eşlik etti.

Negatif kontrol grubu olan 1. grup dışındaki tüm gruplarda radyolojik inceleme yapıldı.

Erken dönem füzyon oranının değerlendirilmesi amacıyla 3. haftada sakrifiye edilecek gruplardaki (2,4,6,8,10.gruplar) ratlara yüksek doz ketamin (100 mg/kg) enjeksiyonu ile sakrifikasyon sonrası görüntülemeler yapıldı.

İleri dönem füzyon oranının değerlendirilmesi amacıyla 6. haftada sakrifiye edilecek (3,5,7,9,11.gruplar) ratlara 10 mg/kg ksilazin ve 50 mg/kg ketamin karışımının intraperitoneal enjeksiyonu sonrası görüntülemeler yapıldı. Gerektiğinde idame dozu uygulandı.

Direkt Grafi: Dijital mammografi cihazı (Selenia® Hologic, Inc. ABD) kullanılarak, rat ile tp yüzeyi arası 30 cm olacak Şekilde, 30 kV 160 mAs dozunda tüm omurga posteroanterior (PA) grafisi alındı (Şekil 3.4., Şekil 3.5.).



Şekil 3.4. Direkt grafi incelemesi.

L4 ve L5 seviyesindeki füzyon veya yeni kemik oluşumunu değerlendirebilmek amacıyla cerrahi öncesinde (0. hafta) ve cerrahi sonrası 3. ve 6. haftalarda direkt grafiler alındı. Direkt grafilerin değerlendirilmesi için Lenke ve arkadaşlarının kullandığı radyolojik değerlendirme kriterleri (148) (Tablo 3.4.) çalışmamıza göre modifiye edilerek kullanıldı. Radyografik füzyon bulguları 5 evreye ayrılarak puan verildi (Tablo 3.5.):

Tablo 3.4. Lenke ve arkadaşlarının radyolojik inceleme kriterleri.

Evre	Füzyon Durumu	Açıklama
1	Kesin olarak füzyon yok	İki taraflı greft rezorpsiyonu veya belirgin psödoartroz
2	Muhtemel füzyon yok	İki taraflı küçük, solid olmayan füzyon kitleleri
3	Muhtemel füzyon mevcut	Tek taraflı büyük, karşı tarafında küçük füzyon kitleleri
4	Kesin olarak füzyon mevcut	İki taraflı solid trabeküle füzyon kitleleri

Tablo 3.5. Çalışmamızda kullanılan radyolojik değerlendirme kriterleri.

Puan	Füzyon Durumu	Açıklama
1	Kesin olarak füzyon yok	İki taraflı transvers çıkıntılarda belirgin lizis
2	Kesin olarak füzyon yok	Belirgin lizis alanı veya füzyon kitlesi yok
3	Muhtemel füzyon yok	İki taraflı küçük, solid olmayan füzyon kitleleri
4	Muhtemel füzyon mevcut	Tek taraflı büyük, karşı tarafında küçük füzyon kitleleri
5	Kesin olarak füzyon mevcut	İki taraflı solid trabeküle füzyon kitleleri



Şekil 3.5. Direkt grafi incelemesi: Solda tüm vücut posteroanterior (PA) ve lateral grafi görülmektedir. Sağda aynı ratın lomber bölgesinin yakınlaştırılmış PA ve lateral grafi görülmektedir.

Değerlendirmeler 2 bağımsız gözlemci tarafından yapıldı. Değerlendirme sırasında tarafsızlığı sağlayabilmek amacıyla önceden belirlenmiş rastgele sayı sırası kullanılarak oluşturulan “Radyoloji No” kullanıldı.

Bilgisayarlı Tomografi: Değerlendirmeler için 320 dedektör sıralı, Multi Dedektör Bilgisayarlı Tomografi (MDBT) cihazı kullanıldı (Toshiba Aquilion One® 320-Detector Row CT, Toshiba Medical Systems, Tokyo, Japonya). BT incelemeleri genel anestezi altında gerçekleştirildi. Direkt grafi incelemesi sonrası hâlen anestezi altında olan ratlara bu dönemde BT incelemesi yapıldı, gerekirse idame dozunda ek anestezik madde verildi.

L4 ve L5 seviyesindeki füzyon veya yeni kemik oluşumunu değerlendirebilmek amacıyla cerrahi öncesinde (0. hafta) ve cerrahi sonrası 3. ve 6. haftalarda BT incelemesi yapıldı.

0.5mm kesit kalınlığında; 100 kVP, 200 mA dozunda ve 500 milisaniye süre ile kemik ve yumuşak doku volüm protokolleri ile çekim yapıldı (Şekil 3.6.).



Şekil 3.6. Bilgisayarlı tomografi incelemesi.

3.3.6. Hacim Ölçümleri

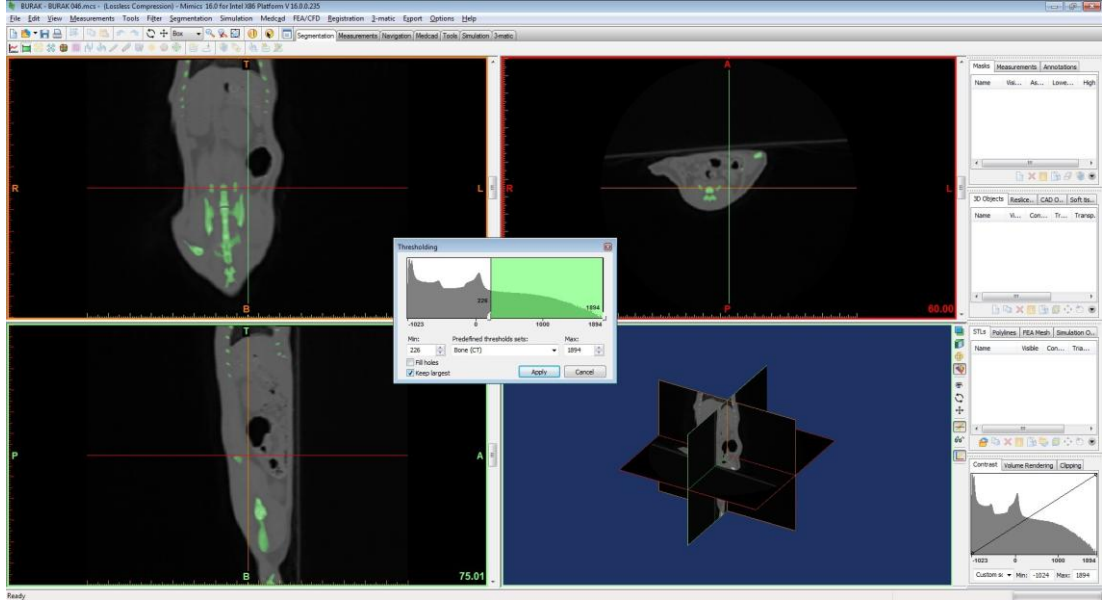
Elde edilen BT görüntülerinin değerlendirilmesi ve hacim ölçümleri GATA Medikal Tasarım ve Üretim Merkezi'nde (METÜM) yapıldı. Değerlendirmelerde biyomedikal mühendislik programı olan *Mimics Innovation Suite®* v16.0.0.235 (Materialise, Belçika) kullanıldı.

1. Programın "*New Project Wizard*" seçeneği kullanılarak BT görüntüleri Mimics programına aktarıldı,
2. "*Thresholding*" seçeneği ile kemik dokuya karşılık gelen Hounsfield Ünitesi (HU) aralığı seçildi (Şekil 3.7.a.),
3. Seçilen kemik bölgesinin "*Calculate 3D*" seçeneği ile üç boyutlu şekli hazırlandı (Şekil 3.7.b.). Bu 3D görüntü tüm eksenlerde (x,y,z) istenildiği gibi hareket ettirilip çevrilebilmekte ve büyüklüğü değiştirilebilmektedir (Şekil 3.7.c.-g.). Ayrıca üzerinde her türlü mesafe, alan ve hacim ölçümleri yapılabilmektedir.

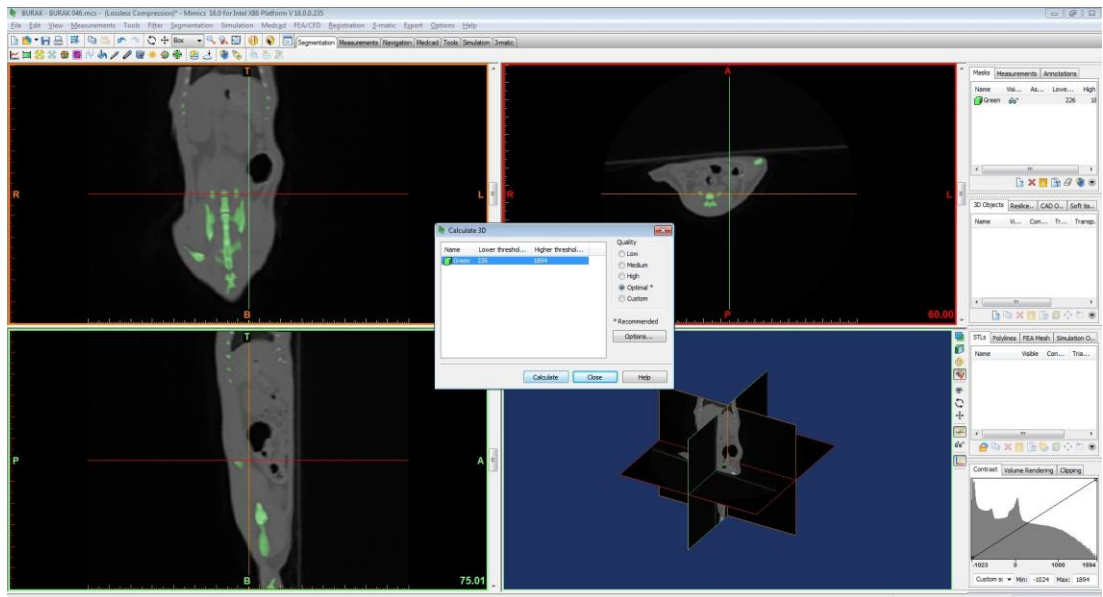
Sonrasında cerrahi uygulanan bölgedeki kemik hacminde ve alanında değişiklik olup olmadığının ölçülebilmesi için ilgili omurga segmenti disk aralıklarından çıkartıldı. Bunun için:

4. "*Create Plane*" seçeneği kullanılarak L6-S1 aralığına her üç eksen de paralel olacak şekilde sanal bir plan oluşturuldu (Şekil 3.7.h.),
5. Oluşturulan sanal plan referans alınarak "*Reslice*" seçeneği ile 3D görüntü rekonstrükte edildi (Şekil 3.7.i.),
6. Oluşturulan yeni kesitler üzerinde L6-S1 disk aralığı ve distal kısmı silindi (Şekil 3.7.j),
7. 4, 5 ve 6. adımlar L2-L3 disk aralığı ve proksimali için de uygulanarak L3,L4,L5,L6 vertebralardan oluşan segment hazırlandı (Şekil 3.7.k.),
8. Oluşan segment tekrar 3D rekonstrükte edilip (Şekil 3.7.l), üzerinde mesafe, alan ve hacim ölçümleri yapılabilmesi için hazır hâle getirildi (Şekil 3.7.m).

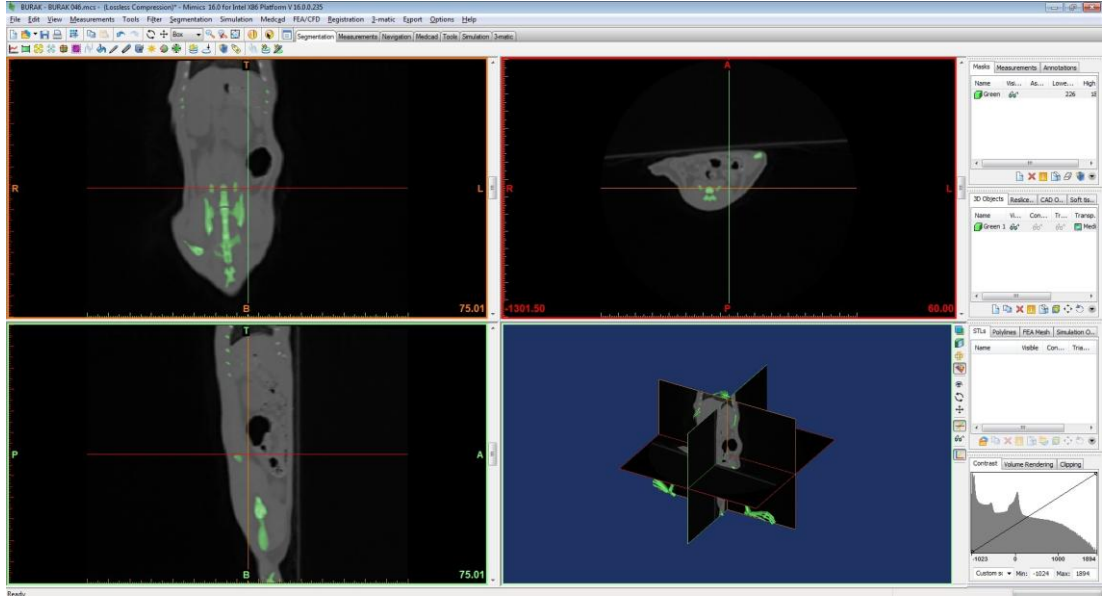
0, 3 ve 6. haftalarda yapılan tüm BT incelemeleri için yukarıdaki adımlar izlenerek 3D model oluşturuldu ve bu modellerden hacim ölçümleri yapıldı. Sonuçlar bulgular bölümünde sunulmuştur.



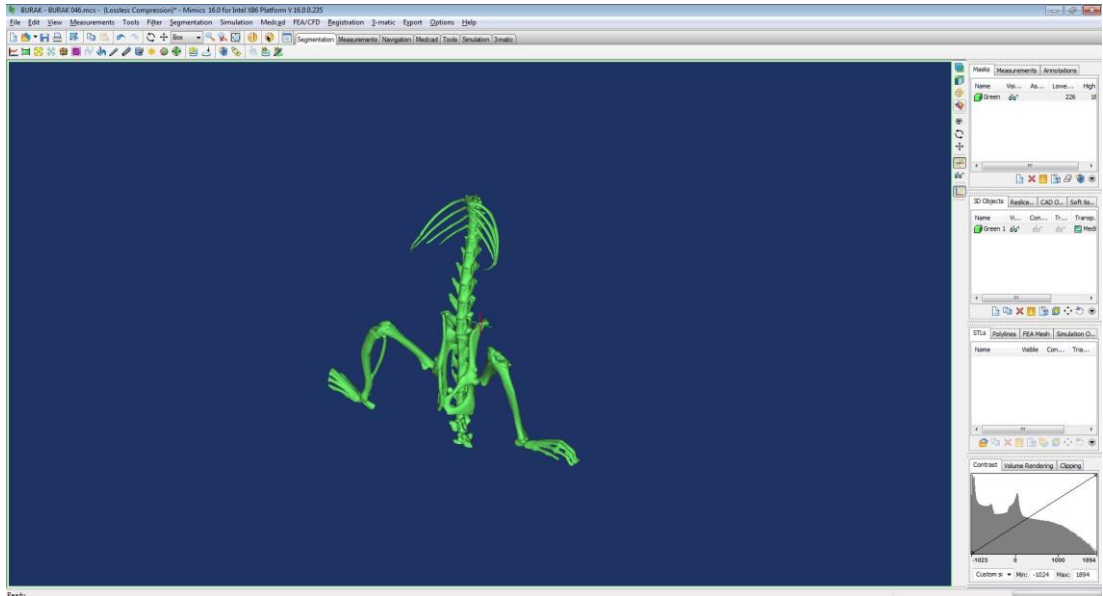
Şekil 3.7. *Mimics Innovation Suite®* kullanılarak 3D model oluşturulması:
a) “*Thresholding*” seçeneği ile kemik dokuya karşılık gelen Hounsfield Ünitesi (HU) aralığının seçilmesi (yeşil renkli alan),



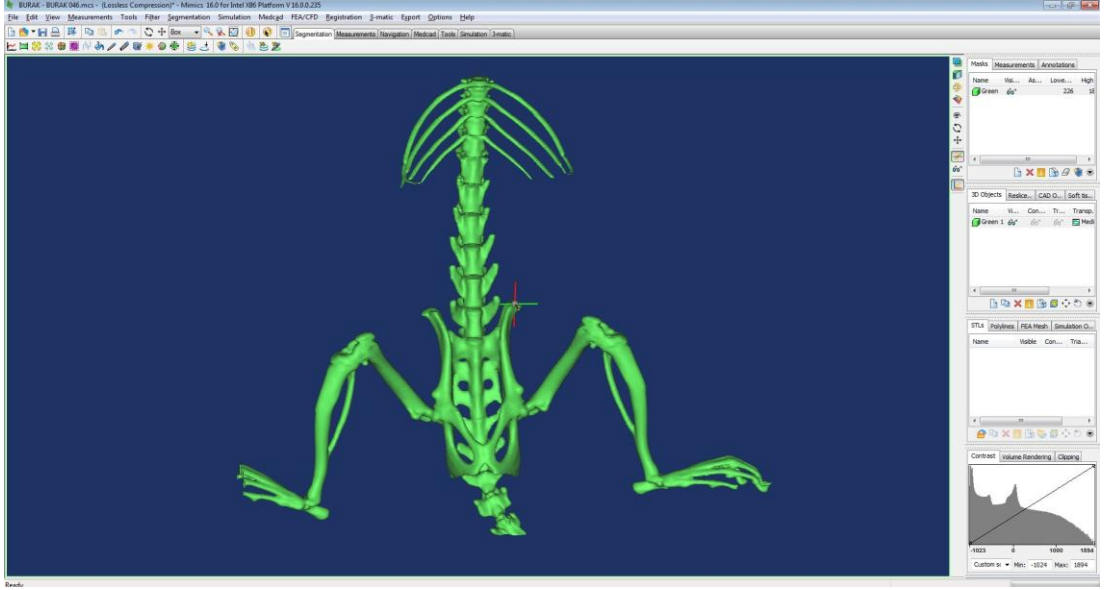
Şekil 3.7. b) Seçilen HU aralığının (yeşil renkli alan) “*Calculate 3D*” seçeneği ile üç boyutlu şeklinin hazırlanması,



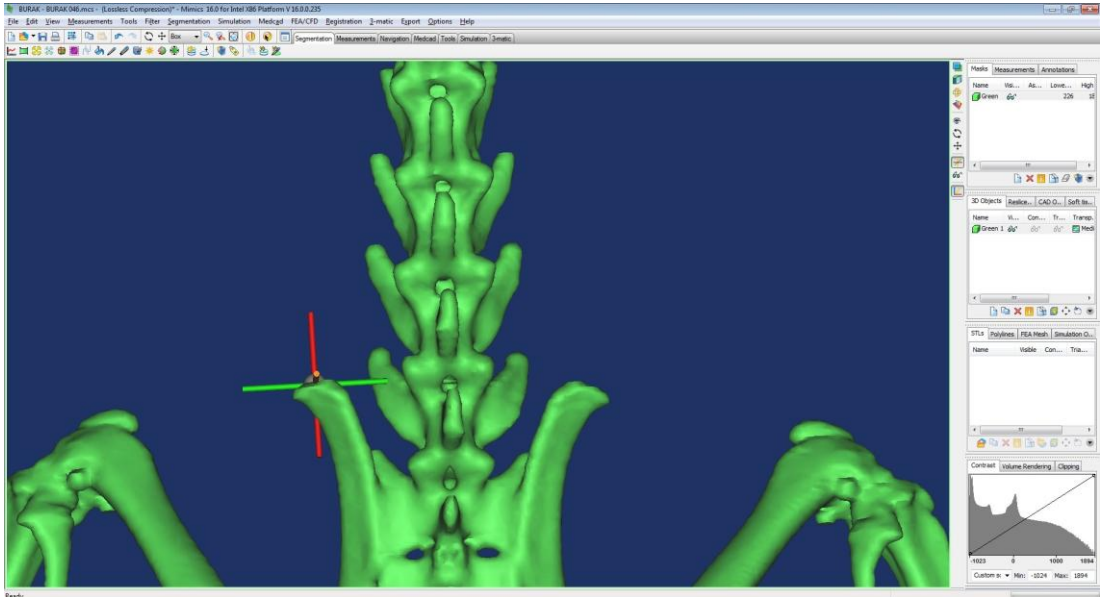
Şekil 3.7. c) Hazırlanmış olan 3D modelin koronal, aksiyel ve sagittal plandaki görünümü (sağ alt kare),



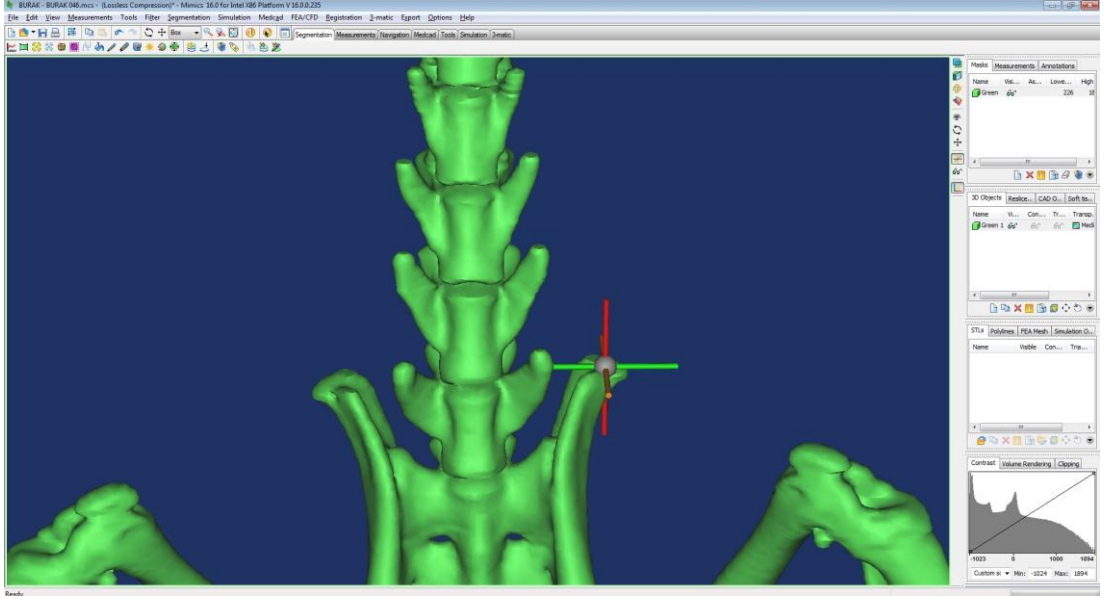
Şekil 3.7. d) 3D modelin büyütülmüş; koronal, aksiyel ve sagittal planların çıkartılmış görünümü,



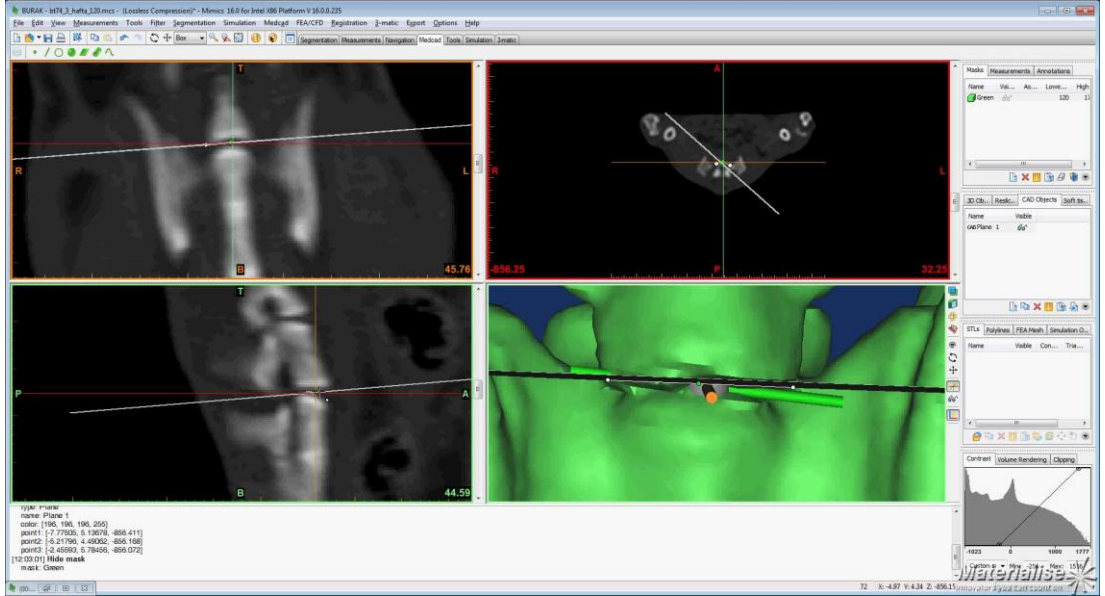
Şekil 3.7. e) İstenilen her ekseninde döndürülebilir ve büyüklüğü değiştirilebilir 3D modelin AP plandaki görünümü,



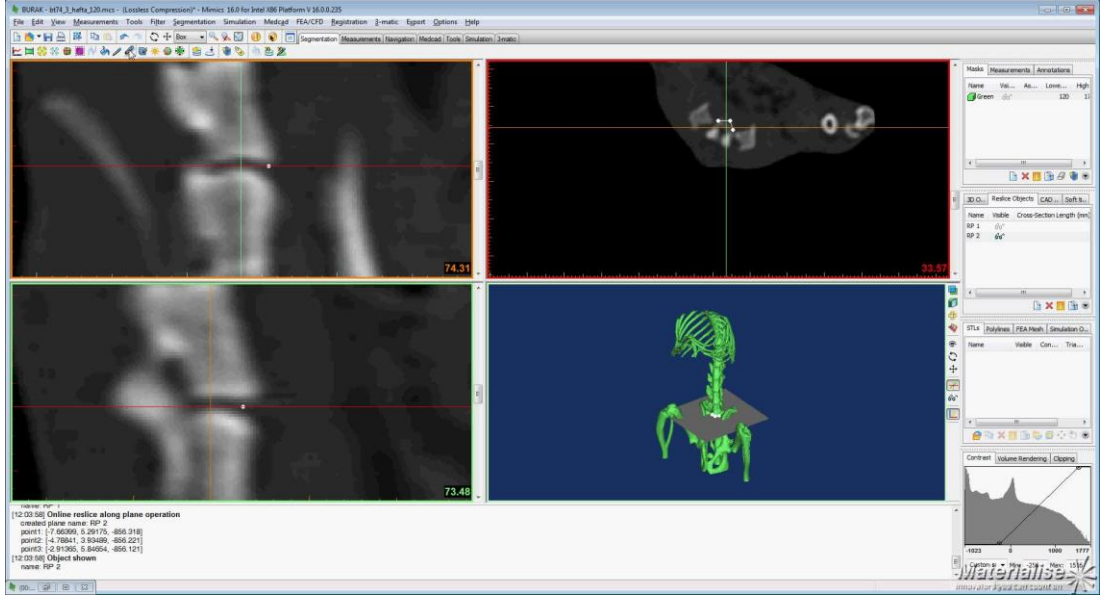
Şekil 3.7. f) Cerrahi işlem öncesi L4,L5,L6 ve pelvisinin arkadan görünümü,



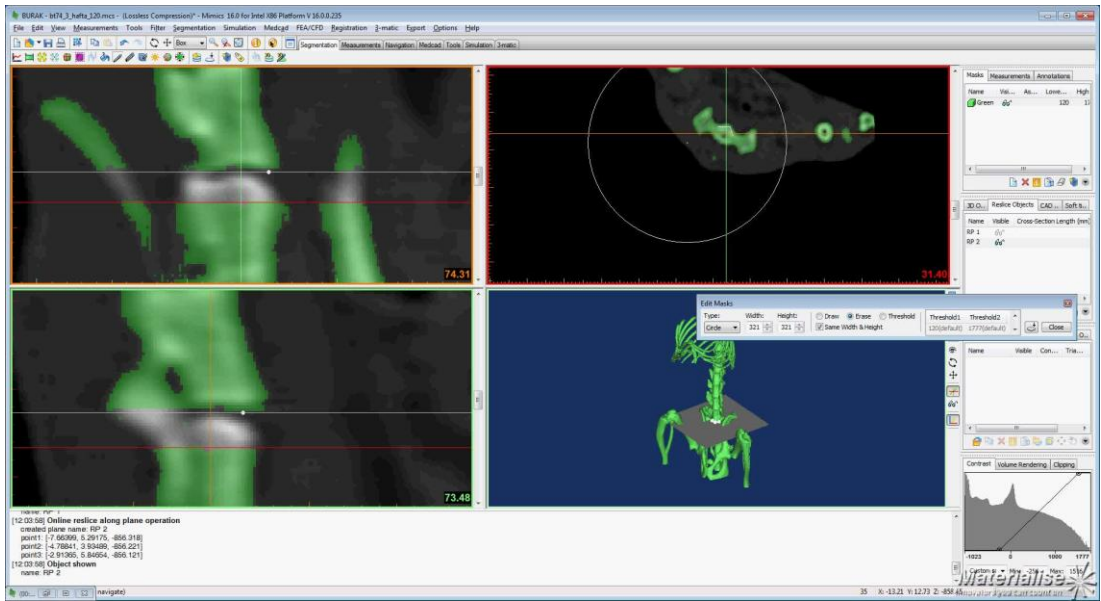
Şekil 3.7. g) Cerrahi işlem öncesi L4,L5,L6 ve pelvisinin önden görünümü,



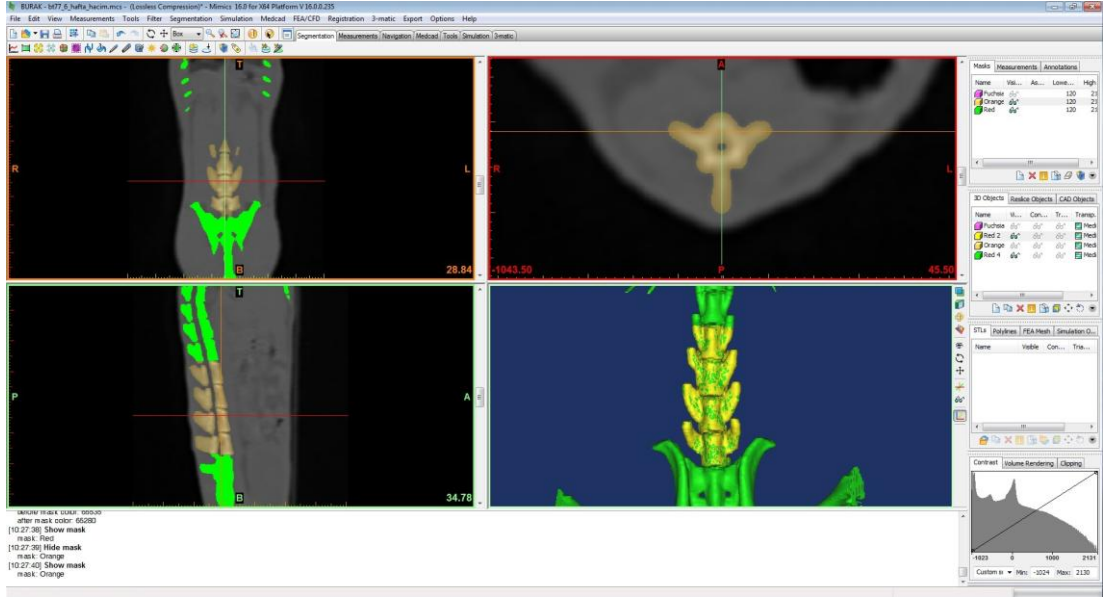
Şekil 3.7 h) L6-S1 aralığına “Create Plane” seçeneği ile sanal plan oluşturulması,



Şekil 3.7. i) Oluşturulan plana göre “Reslice” seçeneği ile rekonstrükte edilen görüntü,



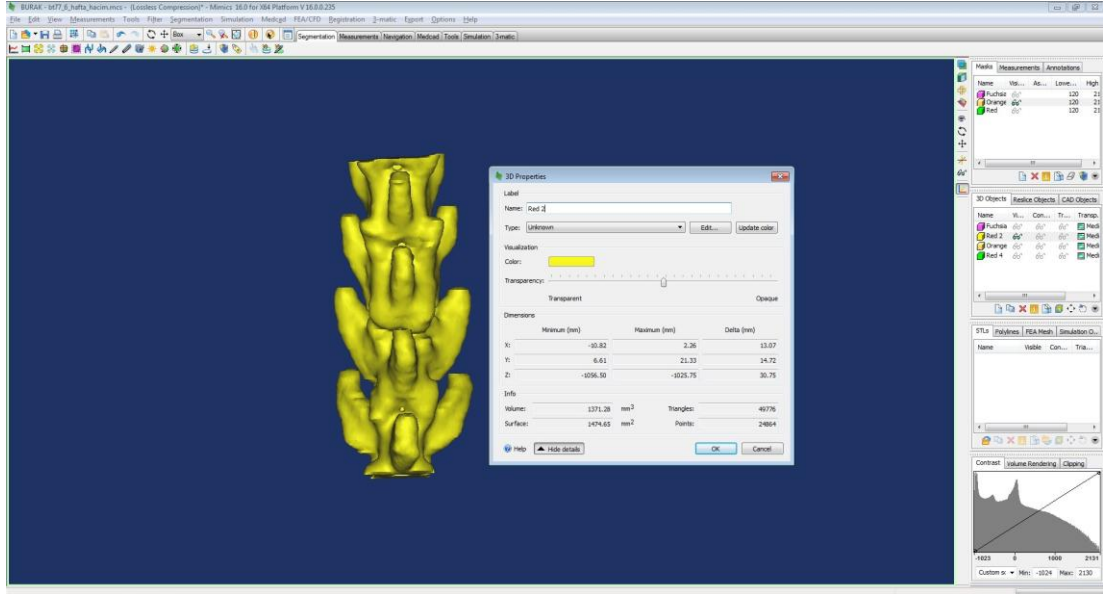
Şekil 3.7. j) Oluşturulan planda L6-S1 aralığı ve distal kısmının silinmesi,



Şekil 3.7. k) Şekil 3.7. a) ve j) arasında uygulanan adımların L2-L3 disk aralığı ve proksimali için uygulanmasından sonra seçilen ve L3,L4,L5,L6 vertebralardan oluşan segmentin görünümü (sarı renkli alan),



Şekil 3.7. l) L2-L6 segmentinin 3D rekonstrüksiyonu sonrası görünümü,



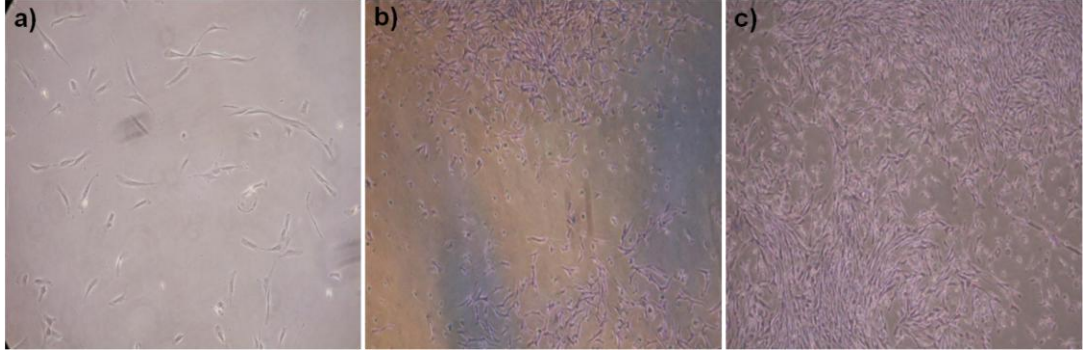
Şekil 3.7. m) L2-L6 segmentinin hacim bilgileri.

3.4. Mezenşimal Kök Hücre Elde Edilmesi

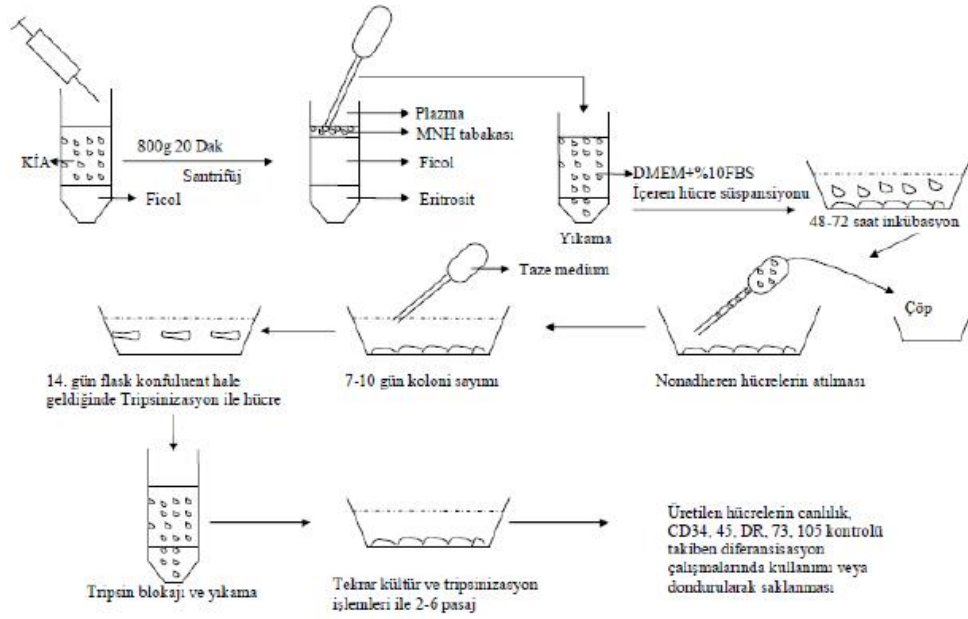
MSC'ler Dr. Oral Nevruz ve Dr. Ferit Avcu'nun önceki çalışmalarında kullandıkları teknik (71) ile GATA Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Kanser ve Kök Hücre Labotuaru'nda üretilmiştir. Bunun için 3 adet rat kullanılmıştır.

Yüksek doz anestezi ile sakrifiye edilmelerinden sonra ratların tibia ve femurları eksiz edilerek antibiyotikli taşıma solüsyonu içinde steril kabine alındı. 18 Gauge'lik bir iğne ile tibia ve femurların içinden kemik iliği aspire edilip santrifüj tüpü içerisinde toplanarak PBS ile 1:2 oranında dilüe edildi. Başka bir santrifüj tüpüne de kemik iliği volümünün 1:3 ü kadar Ficoll konup üzerine dilüe kemik iliği steril pipetle dikkatlice ilave edilerek tabakalandırıldıktan sonra oda ısısında 1800 rpm de 30 dakika süre ile santrifüj edildi. Santrifüj sonrası en üstte plazma, ortada mononükleer hücreler, altta ficoll ve en altta eritrosit ve granüositler kümeleşti, orta tabakadaki MSC'ler yeni bir tüpe alındı.

Toplanan bu hücreler 5 katı hacimde PBS ile en az 2 kez 1800 rpm de 5 dakika süre ile santrifüj edilerek ficoll uzaklaştırıldı, işlem sonunda elde edilen hücre pelleti 25 cm² lik flaska, %10 fetal calf serum, %6 100 U/ml penisilin ve 100 µg/ml streptomisin, %1 L-glutamin içeren medyaya ekilerek 37°C'de %5 CO₂ basıncı altında kültüre edildi. 3 günde bir media değişikliği yapıldı. Genellikle 7-10. günlerde koloniler oluşmaya başladı. 14. günde hücreler, kültür flaskının %70'ini kaplandığında tripsinizasyon yöntemi ile yerinden kaldırılarak 1. pasaj için 75 cm² lik flaska ekildi, 3. pasajdan sonra hücreler kullanıma hazır hâle geldi (149) (Şekil 3.8. ve Şekil 3.9.).



Şekil 3.8. Kültüre edilmiş rat MSC'lerinin sırasıyla 3. (a), 7. (b) ve 14. (c) günlerde *inverted* mikroskoptaki CFU-F görüntüsü.



Şekil 3.9. Mezenşimal kök hücre üretimi için rat tibialarının eksizyonu, steril kabin içerisindeki çalışmalar ve MSC'lerin üretim basamakları.

Bu hücrelerin MSC olduğunu göstermek için akım sitometrisi ile CD45(-), CD34(-), HLA-DR(-), CD73(+), CD90(+), CD105(+) yüzey belirteçlerine bakıldı. Bunun için kültüre edilen MSC'ler tripsinizasyon yöntemi ile izole edildikten sonra fosfat tamponu (PBS) ile yıkamak için 15 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 800 rpm'de 5 dakika santifüj edildi. Hücre pelletine 500 µl PBS eklenip nazik bir şekilde pipetleme yapılarak bu karışımın 100 µl'si akım sitometri tüplerine konularak üzerine 10 µl CD45, CD34, HLA-DR, CD73, CD90, CD105 monoklonal antikorlar eklenip vorteks yapılarak 20 dakika karanlıkta bekletildi, bu sürenin sonunda üzerlerine 2-3 cc lysing solüsyonu eklenerek 10 dakika karanlıkta beklendikten sonra akım sitometrisinde değerlendirildi.

3.4.1. Mezenşimal Kök Hücre Uygulaması

MSC uygulanacak grupların tümünde (Grup 6-7-8-9-10-11) dekortikasyon yapılan füzyon hattına herhangi bir taşıyıcı madde (skafold) kullanmadan, yaklaşık bir milyon adet MSC uygulanıp cerrahi alan kapatıldı. Bu sayı Minamide ve arkadaşlarının (150) ratlarda spinal füzyon modeli çalışmalarında kullandığı sayıdır.

3.5. Cerrahi Öncesi Hazırlıklar

3.5.1. Antibiyotik Profilaksisi

Cerrahi insizyondan 30 dakika önce olacak şekilde, 22 mg/kg dozunda intraperitoneal sefazolin uygulanmıştır (Şekil 3.10.a.). Cerrahi işlemler ortalama 30 dakika sürdüğü için tekrar dozlara ihtiyaç duyulmamıştır.

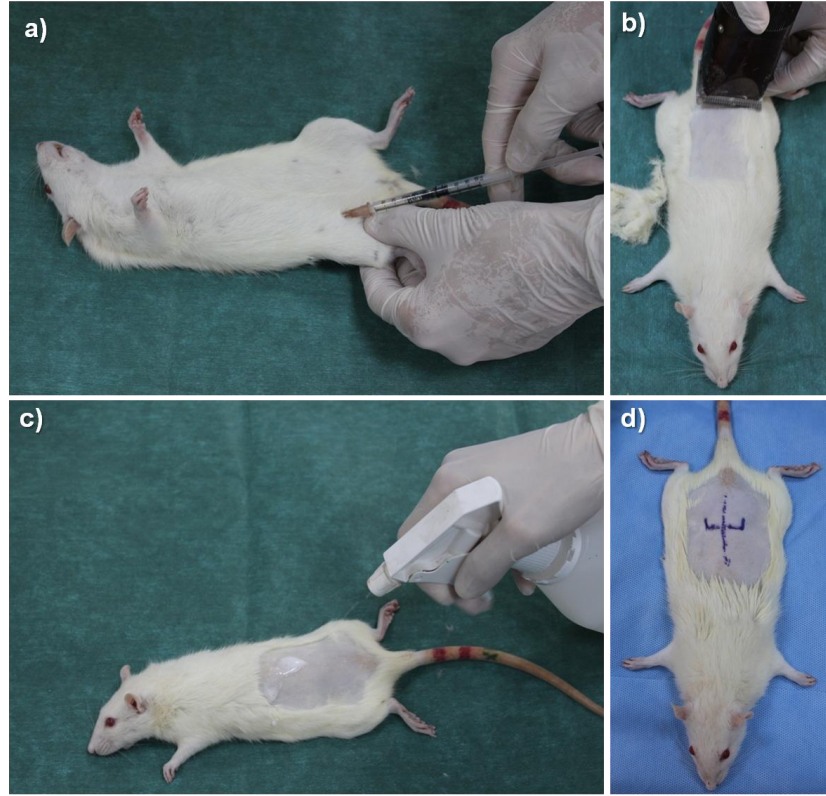
3.5.2. Cerrahi Aletlerin Hazırlanması

Cerrahi işlemler için birbirinin benzeri iki set kullanıldı. Otoklav ile ilk sterilizasyondan sonra ratların değişimlerinde setler dönüşümlü olarak %2 lik gluteraldehit (Derdevice Plus 204 A2, Deren İlaç Sanayi, Kocaeli, Türkiye)

içerisinde yaklaşık 30 dakika tutularak dezenfekte edildi ve sonrasında bol steril salin ile yıkandı.

3.5.3. Cerrahi Alanın Hazırlanması

Profilaktik antibiyotik uygulaması sonrası ratların lomber bölgesi traş edildi, yüzüstü pozisyon verilerek yatırıldı (Şekil 3.10.b.), cerrahi alan Octanisept® (Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Almanya) solüsyonu ile temizlendi (Şekil 3.10.c.) ve steril olarak örtüldü.



Şekil 3.10. Cerrahi intraperitoneal sefazolin uygulaması, cerrahi bölgesinin traş edilmesi, antiseptik solüsyon ile temizlenmesi ve steril olarak işaretlenmesi.

3.6. Cerrahi Teknik

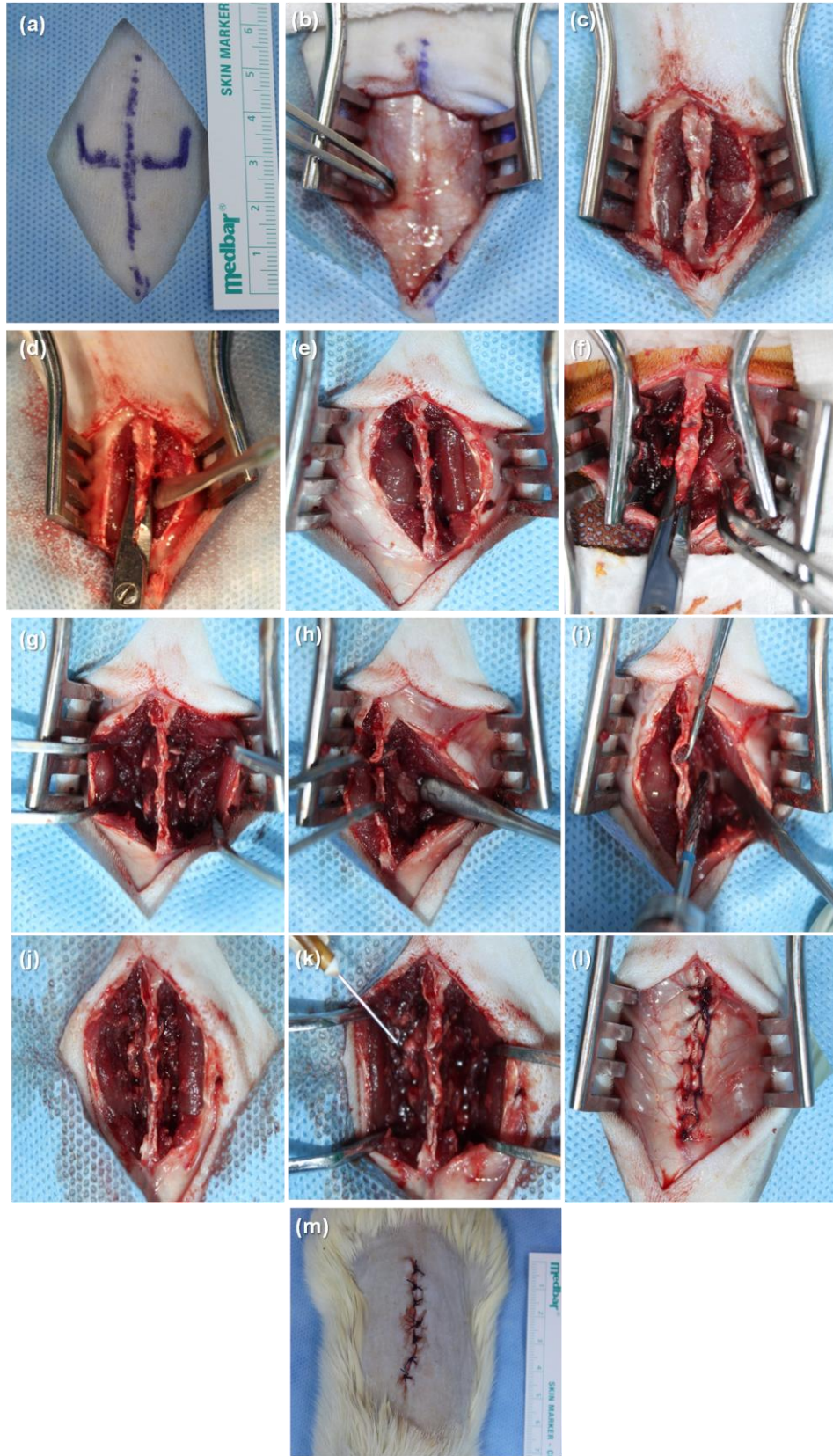
Tüm cerrahi işlemler GATA Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Cerrahi Araştırma Kısmı'nda gerçekleştirildi. Cerrahi işlemlere bu merkezde görevli iki uzman veteriner hekim ve deney hayvanları anestezi konusunda tecrübeli bir anestezi teknisyeni eşlik etti.

Negatif kontrol grubu olan 1.grup dışındaki tüm gruplarda (2,3,4,5,6,7,8,9,10,11.gruplar) aynı anestezi ve cerrahi teknik kullanılarak L4-L5 posterior+posterolateral spinal füzyon cerrahisi uygulandı. Tüm hayvanlarda cerrahi alanın açılımı, dekortikasyon ve MSC uygulaması aynı cerrah tarafından uygulandı.

Cerrahi saha steril olarak örtüldükten sonra L6 seviyesindeki iliak kanatları palpe edilerek işaretlendi (Şekil 3.11.a.). L4-S1 arası mesafede yaklaşık 4cm'lik orta hat cilt insizyonu ile cilt ve ciltaltı doku geçildi (Şekil 3.11.b.). Her iki tarafta lomber fasya spinöz çıkıntılarının hemen lateralinden birer insizyonla açıldı ve paraspinal kaslar künt diseksiyonla laterale diseke edildi (Şekil 3.11.c., Şekil 3.11.d. ve Şekil 3.11.e.). Faset eklemlere yapışan longissimus lumborum kaslarının tendinöz insersiyoları serbestlenerek L4 ve L5 transvers çıkıntıları ortaya çıkartıldı (Şekil 3.11.f.). Periost elevatörü ve rongeur yardımı ile transvers çıkıntılar ile faset eklemler üzerindeki yumuşak dokulardan temizlendi (Şekil 3.11.g. ve Şekil 3.11.h.).

Cerrahi açılım sırasında belirgin kanama olmadı, görülen kas dokusu kaynaklı minör kanamalar lokal bası ile durdurularak hemostaz sağlandı.

Cerrahi alanın serum fizyolojik ile irrigasyonu sonrası saha kurulandı ve transvers çıkıntılar, L4-L5 faset eklemleri, laminalar ve spinöz çıkıntıların lateral yüzeyleri 10000–15000 rpm devir ile burr kullanılarak noktasal mikro kanamalar görülene kadar dekortike edildi (Şekil 3.11.i. ve Şekil 3.11.j.). Dekortikasyon sırasında açığa çıkan kemik parçalarının otogreft olarak fonksiyon görmesi amacıyla sonrasında yıkama işlemi yapılmadı.



Şekil 3.11. Cerrahi teknik.

MSC uygulanacak gruplarda (6,7,8,9,10,11.gruplar) dekortikasyon uygulanan alana insülin enjektörü içerisinde süspansiyon haline getirilen yaklaşık bir milyon adet MSC uygulandı (Şekil 3.11.k.).

Sonrasında lomber fasya 3/0 emilebilen bir suture kullanılarak kilitli devamlı dikiş tekniğiyle (Şekil 3.11.l.), cilt ise 3/0 emilemeyen bir suture kullanılarak kapatıldı (Şekil 3.11.m.).

Cerrahi sonrası dönemde ratlarda sıklıkla görülen kanibalizmi (kan ve doku artıklarının etkisi ile kendileri ve hemcinslerini kemirmeleri) tetiklememesi için insizyon bölgesi serum fizyolojik ile özenle kan ve doku artıklarından temizlendi. İnsizyon alanına antiseptik-dezenfektan sprey (Viocid[®], Antiseptik Çözelti, Topikal Sprey, Provet[®], İstanbul, Türkiye) sıkılarak işleme sonra verildi.

Ortalama cerrahi süresi 20 dakika idi.

3.7. Cerrahi Sonrası Bakım

Cerrahi işlem sonrasında ratlar anesteziden uyanıp aktif hareketli hâle gelene kadar Cerrahi Araştırma Kısmı'nda bekletildi. Bu süreçte hipotermiden korunmaları amacıyla vücut ısıları ısıtıcılarla kontrol altında tutuldu. Sonrasında Deney Hayvanları Kısmı'ndaki cerrahi öncesi bakım şartlarına devam edildi. Ratların kafes içerisindeki hareketlerine izin verildi.

Cerrahi sonrasında uygulanan günlük EPO ve SF enjeksiyonları sırasında ratların kontrolleri yapıldı. Bu kontrollerde hareketlilikleri ve genel davranışları, nörolojik defisit varlığı, yara yeri durumu, dışkılama sıklığı ve yapısı takip edildi.

Yara iyileşmesi süresince düzenli olarak antiseptik-dezenfektan sprey ile pansuman yapıldı.

3.8. Enjeksiyon Uygulamaları

3.8.1. Rekombinant İnsan Eritropoetini

Çalışmamızda 500 IU/kg/gün dozunda Eritropoetin alfa (Eprex; 4000 IU/ml, Santa Farma, Türkiye) kullanıldı. Bu doz Garcia ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları dozdur (59).

EPO uygulanacak gruplarda (4,5,8,9,10,11. gruplar) enjeksiyonlara başlama zamanı ve süresi Tablo 3.6.'da gösterilmiştir.

0.4 ml lik hazır otomatik enjektör içerisindeki 4000IU EPO 7,6 cc serum fizyolojik içerisinde dilüe edildi (0,1 cc de 50 IU). Ratların ağırlıklarına göre 500 IU/kg/gün üzerinden doz hesaplaması yapıldı ve intraperitoneal olarak uygulandı. Ratların ağırlıkları ve ağırlıklarına göre hesaplanan ilaç dozları ve hacimleri Tablo 3.7.'de gösterilmiştir.

EPO'nun antienflamatuar ve inflamasyonu düzenleyici etkilerinin kemik iyileşmesinin ilk safhası olan inflamasyon fazındaki muhtemel etkinliğini değerlendirmek amacıyla, MSC ve EPO'nun birlikte uygulanacağı gruplar (8,9,10,11.gruplar) preoperatif 24. saatte ve postoperatif 72. saatte EPO uygulamasına başlanacak şekilde iki ayrı gruba ayrılmıştır.

Tablo 3.6. EPO enjeksiyonu yapılacak gruplardaki enjeksiyon dozları, enjeksiyona başlama zamanı ve tedavi süreleri.

Grup	Enjeksiyona Başlama Zamanı	Enjeksiyon Süresi (hafta)	Doz (IU/kg/gün)
Grup 4 (EPO_3)	Preoperatif 24. Saat	3	500
Grup 5 (EPO_6)	Preoperatif 24. Saat	6	500
Grup 8 (pre24EPO+MSC_3)	Preoperatif 24. Saat	3	500
Grup 9 (pre24EPO+MSC_6)	Preoperatif 24. Saat	6	500
Grup 10 (MSC+post72EPO_3)	Postoperatif 72. Saat	3	500
Grup10 (MSC+post72EPO_6)	Postoperatif 72. Saat	6	500

3.8.2. Serum Fizyolojik

EPO uygulanmayan gruplara (2, 3, 6 ve 7. gruplar) plasebo etki amacıyla 500 IU/kg/gün EPO dozuna eşdeğer hacimde (Bkz. Tablo 3.7.) günlük serum fizyolojik (% 0.9 NaCl) enjeksiyonu uygulandı.

Enjeksiyonlara enjeksiyonlara başlama zamanı ve süresi Tablo 3.6.'da gösterilmiştir:

Tablo 3.7. Serum fizyolojik enjeksiyonu yapılacak gruplarda enjeksiyona başlama zamanları ve süreleri.

Grup	Enjeksiyona Başlama Zamanı	Enjeksiyon Süresi (hafta)
Grup 2 Pozitif Kontrol (PK_3)	Preoperatif 24. saat	3
Grup 3 Pozitif Kontrol (PK_6)	Preoperatif 24. saat	6
Grup 6 (MSC_3)	Preoperatif 24. saat	3
Grup 7 (MSC_6)	Preoperatif 24. saat	6

3.8.3. Sefazolin Sodyum

Tüm cerrahi uygulanan ratlara cerrahi işlemden 30 dakika önce 22mg/kg dozunda intraperitoneal olarak sefazolin sodyum (İespor 1 gr IM/IV, İ.E. ULAGAY İlaç Sanayii TÜRK A.Ş, İstanbul, Türkiye) uygulandı.

Ratların ağırlıkları ve ağırlıklarına göre hesaplanan sefazolin dozları ve hacimleri Tablo 3.8.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.8. Ratların ağırlıkları ve ağırlıklarına göre hesaplanan sefazolin dozu ve hacimleri.

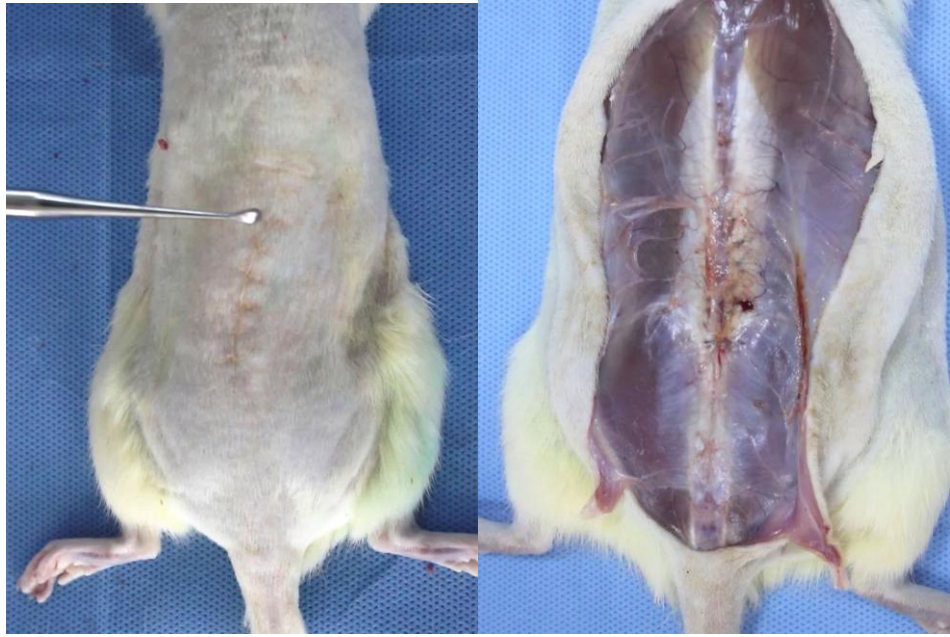
Grup	Rat No	Ağırlık (gr)	EPO Dozu (IU)	EPO Hacmi (cc)	Sefazolin Dozu (mg)	Sefazolin Hacmi (cc)	Grup	Rat No	Ağırlık (gr)	EPO Dozu (IU)	EPO Hacmi (cc)	Sefazolin Dozu (mg)	Sefazolin Hacmi (cc)
1 (NK)	1	217,2	108,6	0,22	4,78	0,24	4 (EPO_3)	1	235,7	117,85	0,24	5,19	0,26
	2	203,6	101,8	0,2	4,48	0,22		2	265,1	132,55	0,27	5,83	0,29
	3	273,2	136,6	0,27	6,01	0,3		3	254,3	127,15	0,25	5,59	0,28
	4	212,1	106,05	0,21	4,67	0,23		4	270,8	135,4	0,27	5,96	0,3
	5	295	147,5	0,3	6,49	0,32		5	256,2	128,1	0,26	5,64	0,28
	6	217,3	108,65	0,22	4,78	0,24		6	203,2	101,6	0,2	4,47	0,22
	7	262,1	131,05	0,26	5,77	0,29		7	249,5	124,75	0,25	5,49	0,27
2 PK_3)	1	233,5	116,75	0,23	5,14	0,26	5 (EPO_6)	1	207,2	103,6	0,21	4,56	0,23
	2	245,8	122,9	0,25	5,41	0,27		2	281,4	140,7	0,28	6,19	0,31
	3	239,4	119,7	0,24	5,27	0,26		3	203,9	101,95	0,2	4,49	0,22
	4	258	129	0,26	5,68	0,28		4	233,1	116,55	0,23	5,13	0,26
	5	248,6	124,3	0,25	5,47	0,27		5	256,4	128,2	0,26	5,64	0,28
	6	237,8	118,9	0,24	5,23	0,26		6	241,2	120,6	0,24	5,31	0,27
	7	249,5	124,75	0,25	5,49	0,27		7	297,7	148,85	0,3	6,55	0,33
3 (PK_6)	1	287,5	143,75	0,29	6,33	0,32	6 (MSC_3)	1	238,3	119,15	0,24	5,24	0,26
	2	229	114,5	0,23	5,04	0,25		2	285,7	142,85	0,29	6,29	0,31
	3	228,3	114,15	0,23	5,02	0,25		3	210	105	0,21	4,62	0,23
	4	231,9	115,95	0,23	5,1	0,26		4	225,9	112,95	0,23	4,97	0,25
	5	248,3	124,15	0,25	5,46	0,27		5	235,5	117,75	0,24	5,18	0,26
	6	223,6	111,8	0,22	4,92	0,25		6	260,5	130,25	0,26	5,73	0,29
	7	236,4	118,2	0,24	5,2	0,26		7	229,6	114,8	0,23	5,05	0,25

Tablo 3.8 (devamı). Ratların ağırlıkları ve ağırlıklarına göre hesaplanan sefazolin dozu ve hacimleri.

Grup	Rat No	Ağırlık (gr)	EPO Dozu (IU)	EPO Hacmi (cc)	Sefazolin Dozu (mg)	Sefazolin Hacmi (cc)	Grup	Rat No	Ağırlık (gr)	EPO Dozu (IU)	EPO Hacmi (cc)	Sefazolin Dozu (mg)	Sefazolin Hacmi (cc)
7 (MSC_6)	1	220,4	110,2	0,22	4,85	0,24	10 (MSC + post72EPO_3)	1	248,8	124,4	0,25	5,47	0,27
	2	236,1	118,05	0,24	5,19	0,26		2	249	124,5	0,25	5,48	0,27
	3	271,6	135,8	0,27	5,98	0,3		3	246	123	0,25	5,41	0,27
	4	309,6	154,8	0,31	6,81	0,34		4	286,9	143,45	0,29	6,31	0,32
	5	240	120	0,24	5,28	0,26		5	331,7	165,85	0,33	7,3	0,36
	6	295,6	147,8	0,3	6,5	0,33		6	265,8	132,9	0,27	5,85	0,29
	7	283,4	141,7	0,28	6,23	0,31		7	261,7	130,85	0,26	5,76	0,29
8 (pre24EPO+ MSC_3)	1	320,8	160,4	0,32	7,06	0,35	11 (MSC + post72EPO_6)	1	243,2	121,6	0,24	5,35	0,27
	2	280,4	140,2	0,28	6,17	0,31		2	279	139,5	0,28	6,14	0,31
	3	239,6	119,8	0,24	5,27	0,26		3	202	101	0,2	4,44	0,22
	4	315,6	157,8	0,32	6,94	0,35		4	247,9	123,95	0,25	5,45	0,27
	5	232,7	116,35	0,23	5,12	0,26		5	238,5	119,25	0,24	5,25	0,26
	6	314,6	157,3	0,31	6,92	0,35		6	215,4	107,7	0,22	4,74	0,24
	7	240,8	120,4	0,24	5,3	0,26		7	229,6	114,8	0,23	5,05	0,25
9 (pre24EPO+ MSC_6)	1	256,8	128,4	0,26	5,65	0,28							
	2	242,4	121,2	0,24	5,33	0,27							
	3	326,7	163,35	0,33	7,19	0,36							
	4	272,3	136,15	0,27	5,99	0,3							
	5	245	122,5	0,25	5,39	0,27							
	6	336,8	168,4	0,34	7,41	0,37							
	7	254,1	127,05	0,25	5,59	0,28							

3.9. Ratların Sakrifikasyonu

GATA Araştırma ve Geliştirme Merkez Başkanlığı Cerrahi Araştırma Kısmı'nda görevli bir uzman veteriner hekim eşliğinde yapıldı. Tüm ratlar 100 mg/kg ketamin hidroklorid kullanılarak yüksek doz anestezi madde verilerek sakrifiye edildi (Şekil 3.12.).



Şekil 3.12. Sakrifiye edilmiş ratın lomber bölgesindeki cerrahi insizyon skarları (solda) ve cilt geçildikten sonraki cerrahi alanın görünümü (sağda).

3.10. Manuel Palpasyon

3. ve 6. hafta sonunda sakrifiye edilen hayvanların mekanik olarak füzyon olup olmadığının değerlendirilmesi yapıldı. Bunun için insanlardaki ameliyat içi değerlendirmeye benzer bir yöntemle, füzyon cerrahisi uygulanan L5-L6 bölgesi pens yardımıyla muayene edilerek hareket varlığı açısından ön değerlendirme yapıldı. Sonrasında lomber omurga ve pelvisleri en blok

eksize edildi ve yumuşak dokularından sıyrılarak temizlendi. Kalan omurga segmenti 2 bağımsız gözlemci tarafından elle muayene edilerek füzyon olup olmadığıyla ilgili nihai karar verildi. Elle muayene sırasında cerrahi uygulanan bölgeye nazikçe fleksiyon/ekstansiyon ve her iki laterale fleksiyon yaptırıldı (Şekil 3.13.). Cerrahi bölgesinde hiç hareket olmaması füzyon olarak değerlendirildi. Diğer omurga segmentlerine göre hareketin belirgin olarak azaldığı ancak hala gözlemlenebildiği ve belirgin hareket olan örnekler füzyone olarak değerlendirilmedi.



Şekil 3.13. Sagittal ve koronal planda uygulanan manuel palpasyon değerlendirmesi.

3.11. Histopatolojik İnceleme

Çalışma sonunda alınan doku örneklerinin histopatolojik inceleme için hazırlanması ve değerlendirilmesi GATA Patoloji AD. Başkanlığı'nda yapılmıştır.

Ratların sakrifiye edilmelerinden sonra lomber omurga, pelvis ve paravertebral kaslar en blok olarak eksize edilip üzerindeki yumuşak dokular temizlendi. İncelemeler sırasında doku örneklerinin hangi gruba ait olduğunun bilinmemesi ve tarafsızlığı sağlayabilmek amacıyla “Doku Numarası” kullanıldı.

Makroskopik inceleme ve manuel palpasyon yöntemi ile cerrahi uygulanan bölgede hareket olup olmadığı değerlendirildikten sonra doku örnekleri etiketli steril idrar kaplarına konuldu ve %10'luk formaldehit solüsyonunda (CH₂O, MOS ®, Moslab, Ankara, Türkiye) yaklaşık 24 saat bekletildi.

3.11.1. Dekalsifikasyon

200 cc %10luk formik asit (CH₂O₂, Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) ve 160 cc % 8lik HCL asit (Sigma-Aldrich® Chemie GmbH, Steinheim, Almanya) ve 1640 cc su içeren 2000 cclik asit solüsyonu içerisinde yaklaşık 72 saat bekletildi. Kemiğin yumuşaması bistüri ucu ile değerlendirildi ve tamamlanmış ise örnekleme yapıldı.

3.11.2. Örnekleme

Sakrum ve L2 vertebranın proksimali disk aralıklarından ayrılarak L3-L4-L5-L6 vertebralardan oluşan bir segment hazırlandı (Şekil 3.14.a.).

Zeminden yüksekliği 2 mm olan iki sert plastik materyal arasına omurga segmenti konuldu ve vertebra korpusu anteriorundan başlayarak posteriora doğru koronal planda kesim yapıldı (Şekil 3.14.b.). Bu sırada omurganın fizyolojik eğriliklerini düzeltmek için hafif bir yük uygulandı ve koronal planda yaklaşık 2mm kalınlığında kesitler elde edildi (Şekil 3.14.c.).

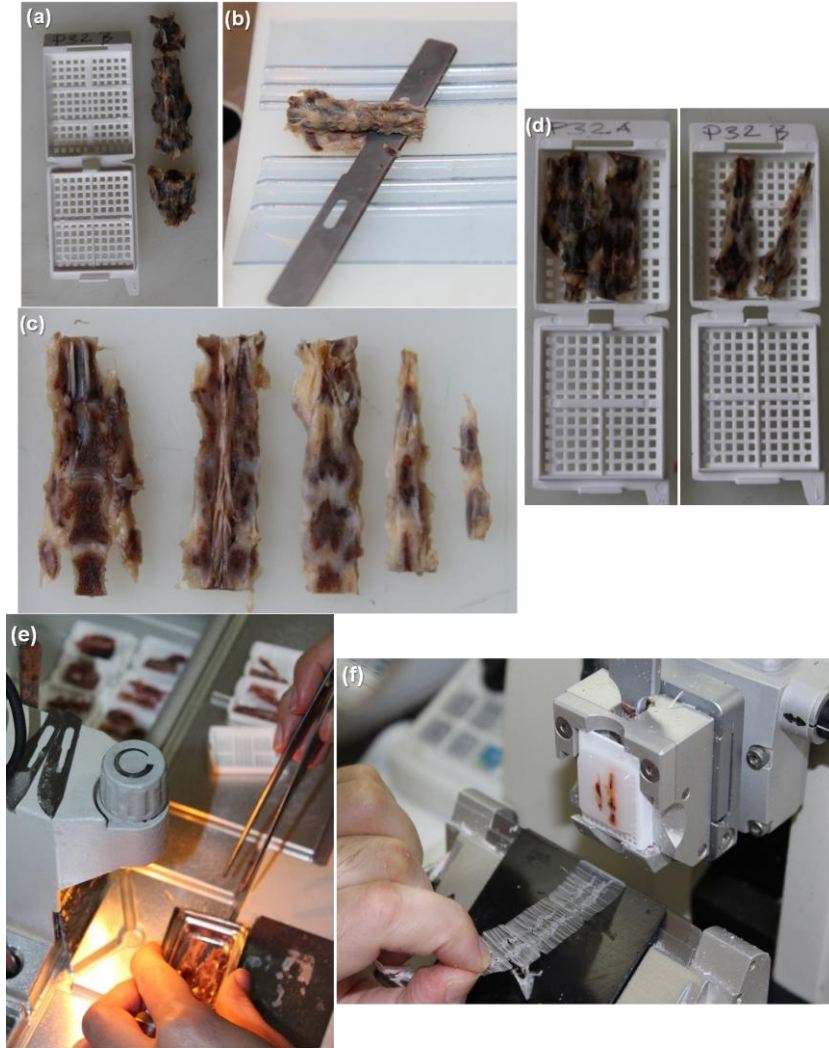
Oluşturulan örnekler doku takip kasetlerine yerleştirildi (Şekil 3.14.d.).

3.11.3. Doku Takibi

Kasetler otomatik kapalı sistem doku takip cihazına (Shandon®) yerleştirildi ve %96'lık, %80'lik ve saf alkol serileri ile dehidrate edilip ksilen ($C_6H_4(CH_3)_2$, MOS®, Mos Lab®, Ankara, Türkiye) serileri ile temizlendikten sonra parafine (Sasolwax®) gömüldü (Şekil 3.14.e.).

3.11.4. Kesit alınması

Doku örneklerinden mikrotom (Shandon®, Thermo®) ile 4 mikrometre kalınlığında kesitler alındı, sonrasında etüvlenerek deparafinize edildi (Şekil 3.14.f.).



Şekil 3.14. Histopatolojik inceleme için preparatların hazırlanması.

3.11.5. Hematoksilen & Eozin ile Boyama

Hazırlanan lamlar otomatik boyama cihazında (Sakura®, Tissue-Tek® Otostainer, DRSTM) hematoksilen eozin ile boyandı.

3.11.6. Değerlendirme

Preparatlar standart ışık mikroskobu (Olympus BX-51, Tokyo, Japonya) kullanılarak 2 bağımsız gözlemci tarafından değerlendirildi. Histopatolojik değerlendirmede Emery ve arkadaşlarının (151) tanımladığı sınıflama yöntemi kullanıldı (Tablo 3.9.).

Tablo 3.9. Histopatolojik değerlendirme kriterleri (151).

Doku Özelliği	Puan
Sadece kemik doku	7
Kemik doku fibrokıkırdak dokudan fazla	6
Fibrokıkırdak doku kemik dokudan fazla	5
Sadece fibrokıkırdak doku	4
Fibrokıkırdak doku fibröz dokudan fazla	3
Fibröz doku fibrokıkırdak dokudan fazla	2
Sadece fibröz doku	1
Boş adacıklar	0

3.12. İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin analizi GATA Biyoistatistik BD. Başkanlığı'nda yapıldı. Bunun için *SPSS for Windows v15* yazılımı kullanıldı.

Tanımlayıcı istatistikler; sürekli verilerde ortalama, standart sapma, ortanca, minimum, maksimum şeklinde, kesikli verilerde ise sayı (yüzde)

şeklinde verildi. Gruplar arasında değişkenlerin karşılaştırılmasında Tek Yönlü Varyans Analizi, T testi ve Ki-Kare testi kullanıldı.

Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edildiğinde bu farkın hangi iki gruptan kaynaklandığını bulmak için *Bonferonni ve Tukey HSD* testi kullanıldı. 0, 3 ve 6. haftalardaki değişkenlerin aralarında karşılaştırılmasında *Paired Samples T Test* kullanıldı. Anlamlılık düzeyi < 0,05 olarak alındı.

BULGULAR

4.1. Direkt Grafi Bulguları

0, 3 ve 6. haftalardaki direkt grafiyer aşağıdaki puanlamaya g6re değerlendirildi:

- 1 puan: İki taraflı transvers çıkıntılarda belirgin lizis,
- 2 puan: Belirgin lizis alanı veya füzyon kitlesi yok,
- 3 puan: İki taraflı küçük, solid olmayan füzyon kitleleri,
- 4 puan: Tek taraflı büyük, karşı tarafında küçük füzyon kitleleri,
- 5 puan: İki taraflı solid trabeküle füzyon kitleleri.

Değerlendirme sonucu 5 puan verilen grafi olmayıp, 1 – 2 – 3 ve 4 puanlara ait 6rnek grafiyer Şekil 4.1. ve Şekil 4.4.arasında sunulmuştur.

Tablo 4.1.'de sunulan direkt grafi sonuçları incelendiğinde:

Sadece cerrahi işlem uygulanan PK_3 ve PK_6 gruplarında; 3. haftadaki değerlendirmelerde, PK_3 grubunda %71.4 (n=5) oranında lizis gelişmiştir. PK_6 grubunda ise %42.9 (n=3) oranında lizis, %42.9 (n=3) oranında solid olmayan füzyon kitleleri saptanmıştır. 6. haftadaki değerlendirmelerde, PK_6 grubunda solid olmayan füzyon kitleleri g6r6lmeye başlayan rat oranı %57.1'e y6kselmiştir (n=4).

Sadece sistemik EPO uygulanan EPO_3 ve EPO_6 gruplarında; 3. haftadaki değerlendirmelerde, her iki grupta da y6ksek oranda lizis gelişmiştir (%85.7, n=6). 6. haftadaki değerlendirmelerde EPO_6 grubunda solid olmayan füzyon kitleleri başlamıştır ancak lizis gelişen rat sayısı hala çoğunluktur (%57.1,n=4).

Sadece MSC uygulanan MSC_3 ve MSC_6 gruplarında; 3. haftadaki değerlendirmelerde MSC_3 grubunda lizis g6r6lmeyip solid olmayan füzyon kitleleri g6r6len ratlar çoğunluktur (%57.1, n=4). Aynı zamanda az miktarda tek taraflı solid füzyon kitleleri de g6r6lmektedir (%28.6, n=2). MSC_6 grubunda ise, 2'şer ratta lizis ve tek taraflı solid füzyon kitlesi g6r6lmektedir

(%28.6, n=2). 6. haftadaki değerlendirmelerde MSC_6 grubunda lizis görülen rat oranı azalmış ancak solid olmayan füzyon kitleleri görülen rat sayısında artış olmamıştır (%28.6, n=2).

EPO ve MSC kombinasyonu uygulanan pre24EPO+MSC_3, pre24EPO+MSC_6, MSC+post72EPO_3, MSC+post72EPO_6 gruplarında 3. haftadaki değerlendirmelerde hiçbir grupta lizis görülmemiştir. pre24EPO+MSC_3 grubunda %85,7 (n=6), pre24EPO+MSC_6 grubunda %100 (n=7), MSC+post72EPO_3 grubunda %71,4 (n=5), MSC+post72EPO_6 grubunda ise %100 (n=7) oranlarında solid olmayan füzyon kitleleri saptanmıştır. 6. haftadaki değerlendirmelerde, pre24EPO+MSC_6 grubunda %100 oranında görülen solid olmayan füzyon kitleleri %42.9'a (n=3) gerilemiştir. Aynı zamanda, bu gruptaki bir rat ex olmuştur. MSC+post72EPO_6 grubunda ise, yine %100 oranında görülen solid olmayan füzyon kitleleri %57.1'e (n=4) gerilemiştir. Sonuç olarak 3 ve 6. haftalarda MSC+EPO kombinasyonu diğer gruplara göre daha yüksek oranda füzyon oluşturmuştur (p=0,000 ve p=0,010).

Preoperatif 24. saat ve postoperatif 72. Saat EPO uygulamaları direkt grafi sonuçları açısından değerlendirildiğinde; gruplar arasında anlamlı fark saptanamamıştır.

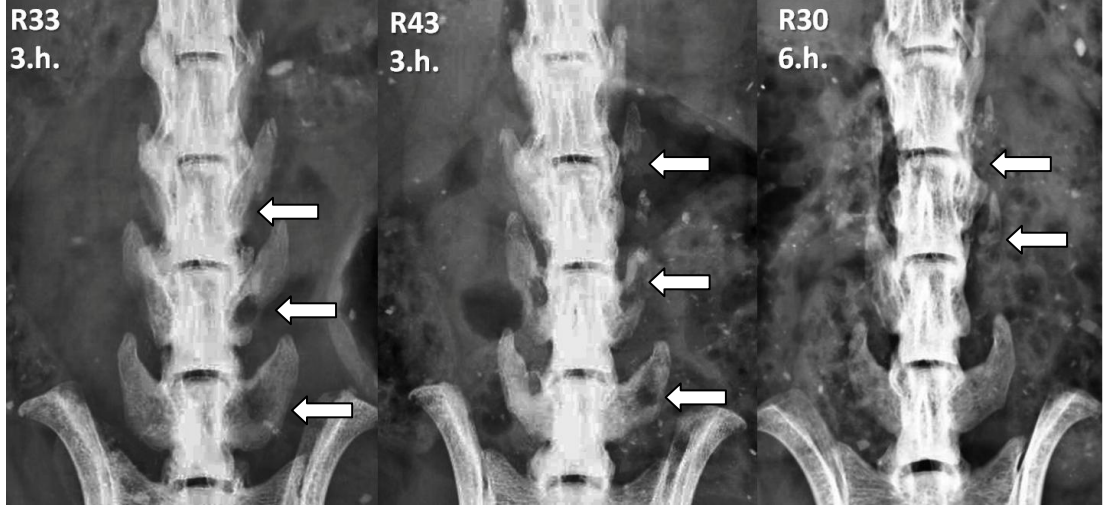
4.2. Bilgisayarlı Tomografi ve Hacim Ölçümü Bulguları

Şekil 4.5.'te 4 farklı rata ait lomber vertebraların aksiyel, sagittal ve koronal kesitleri gösterilmiştir. Bu kesitlerden Mimics programı ile hazırlanan 3D modellerinden örnekler Şekil 4.6.'da gösterilmiştir. Deney gruplarının 3D modellerden hesaplanan hacimlerinin ortalama, ortanca, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri ise Tablo 4.2.'de sunulmuştur.

Direk grafi ve 3D modellerdeki değişikliklerin birlikte görülebilmesi amacıyla Şekil 4.7. ve Şekil 4.16. arasında cerrahi uygulanmayan negatif

kontrol grubu (Grup 1) hariç, tüm gruplardan ikişer adet ratın 0,3 ve 6. haftalardaki direkt grafi ve 3D modelleri sunulmuştur.

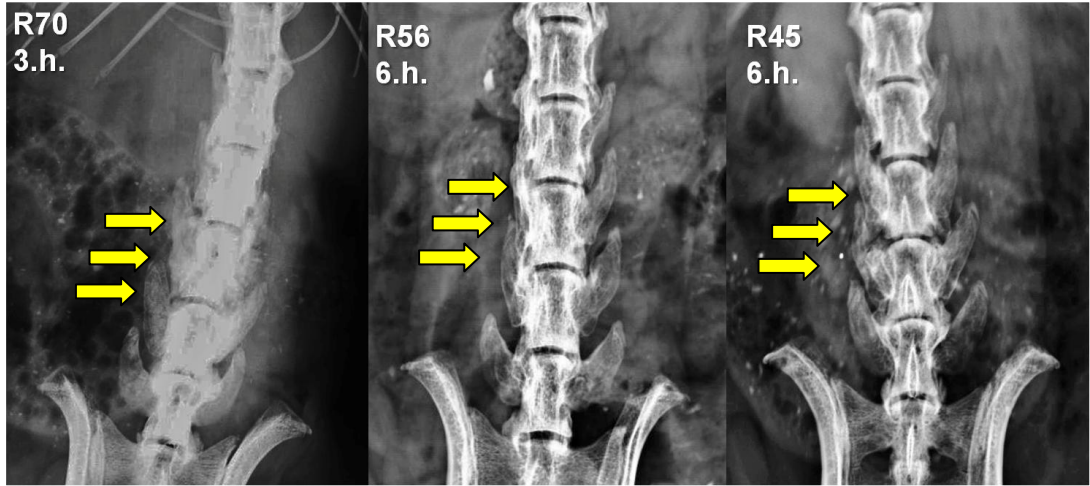
Gruplara göre 0-3 hafta ve 3-6 haftalar arasındaki hacim artışı ve yüzdeleri Tablo 4.3.'te sunulmuştur.



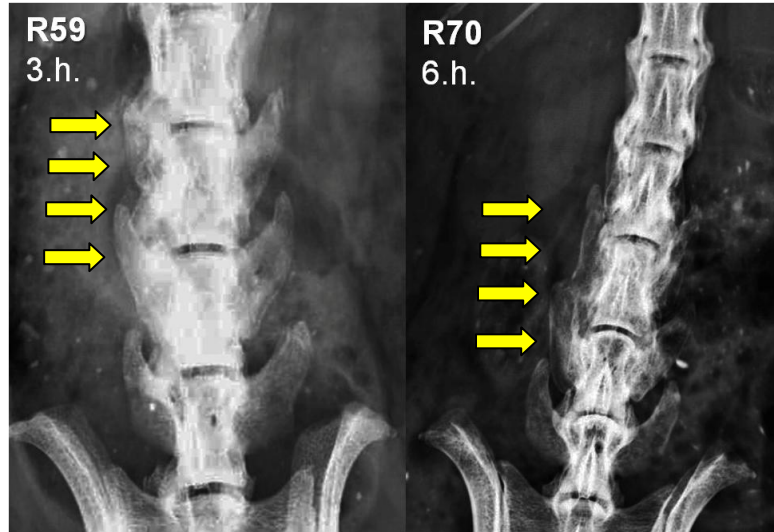
Şekil 4.1. 1 puan (iki taraflı transvers çıkıntılarda belirgin lizis) verilen grafilere örnekler (beyaz oklar lizis bölgelerini göstermektedir).



Şekil 4.2. 2 puan (belirgin lizis alanı veya füzyon kitlesi yok) verilen grafilere örnekler.



Şekil 4.3. 3 puan (iki taraflı küçük, solid olmayan füzyon kitleleri) verilen grafilere örnekler (sarı oklar yeni kemik oluşumunu göstermektedir).

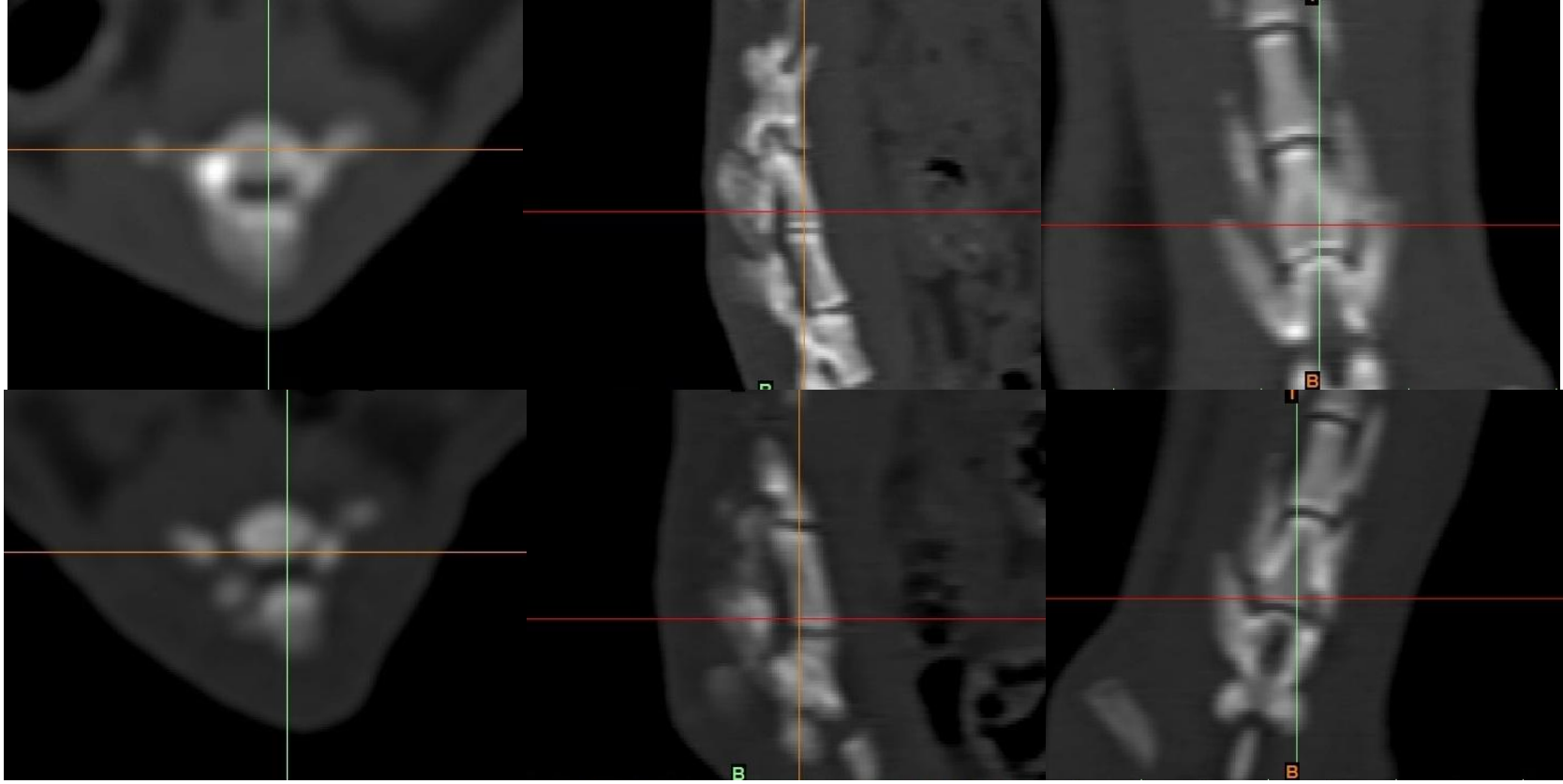


Şekil 4.4. 4 puan (tek taraflı büyük, karşı tarafında küçük füzyon kitleleri) verilen grafilere örnekler (sarı oklar yeni kemik oluşumunu göstermektedir).

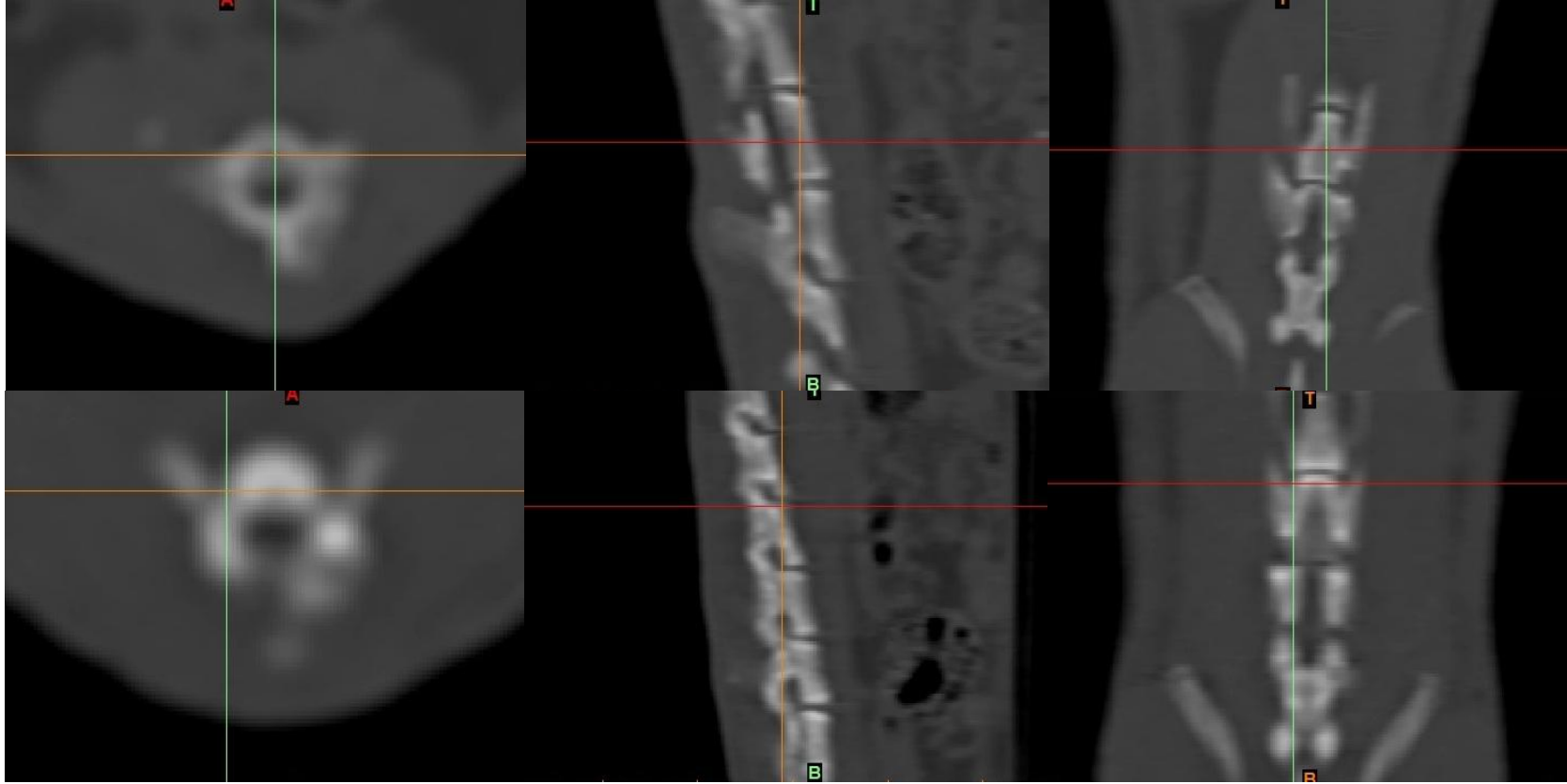
Tablo 4.1. Direkt grafi ile değerlendirme sonuçları.

→ Puanlar → ↓ Gruplar ↓	0.hafta						3.hafta						6.hafta					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	TOPLAM	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	TOPLAM	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	TOPLAM
1 (NK)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)
2 (PK_3)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	5 (%71,4)	2 (%28,6)	0	0	0	7 (%100)	-	-	-	-	-	-
3 (PK_6)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	3 (%42,9)	1 (%14,3)	3 (%42,9)	0	0	7 (%100)	2 (%28,6)	1 (%14,3)	4 (%57,1)	0	0	7 (%100)
4 (EPO_3)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	0	0	0	7 (%100)	-	-	-	-	-	-
5 (EPO_6)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	0	0	0	7 (%100)	4 (%57,1)	2 (%28,6)	1 (%14,3)	0	0	7 (%100)
6 (MSC_3)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	0	1 (%14,3)	4 (%57,1)	2 (%28,6)	0	7 (%100)	-	-	-	-	-	-
7 (MSC_6)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	2 (%28,6)	2 (%28,6)	1 (%14,3)	2 (%28,6)	0	7 (%100)	0	4 (%57,1)	2 (%28,6)	0	0	6* (%85,7)
8 (pre24EPO+MSC_3)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	0	0	6 (%85,7)	1 (%14,3)	0	7 (%100)	-	-	-	-	-	-
9 (pre24EPO+MSC_6)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	0	0	7 (%100)	0	0	7 (%100)	0	3 (%42,9)	3 (%42,9)	0	0	6* (%85,7)
10 (MSC+post72EPO_3)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	0	1 (%14,3)	5 (%71,4)	1 (%14,3)	0	7 (%100)	-	-	-	-	-	-
11 (MSC+post72EPO_6)	0	7 (%100)	0	0	0	7 (%100)	0	0	7 (%100)	0	0	7 (%100)	0	2 (%28,6)	4 (%57,1)	1 (%14,3)	0	7 (%100)
TOPLAM	0	77 (%100)	0	0	0	77 (%100)	22 (%28,6)	16 (%20,8)	33 (%42,8)	6 (%7,8)	0	77 (%100)	6 (%14,3)	19 (%45,2)	14 (%33,3)	1 (%2,4)		40 (%95,2)

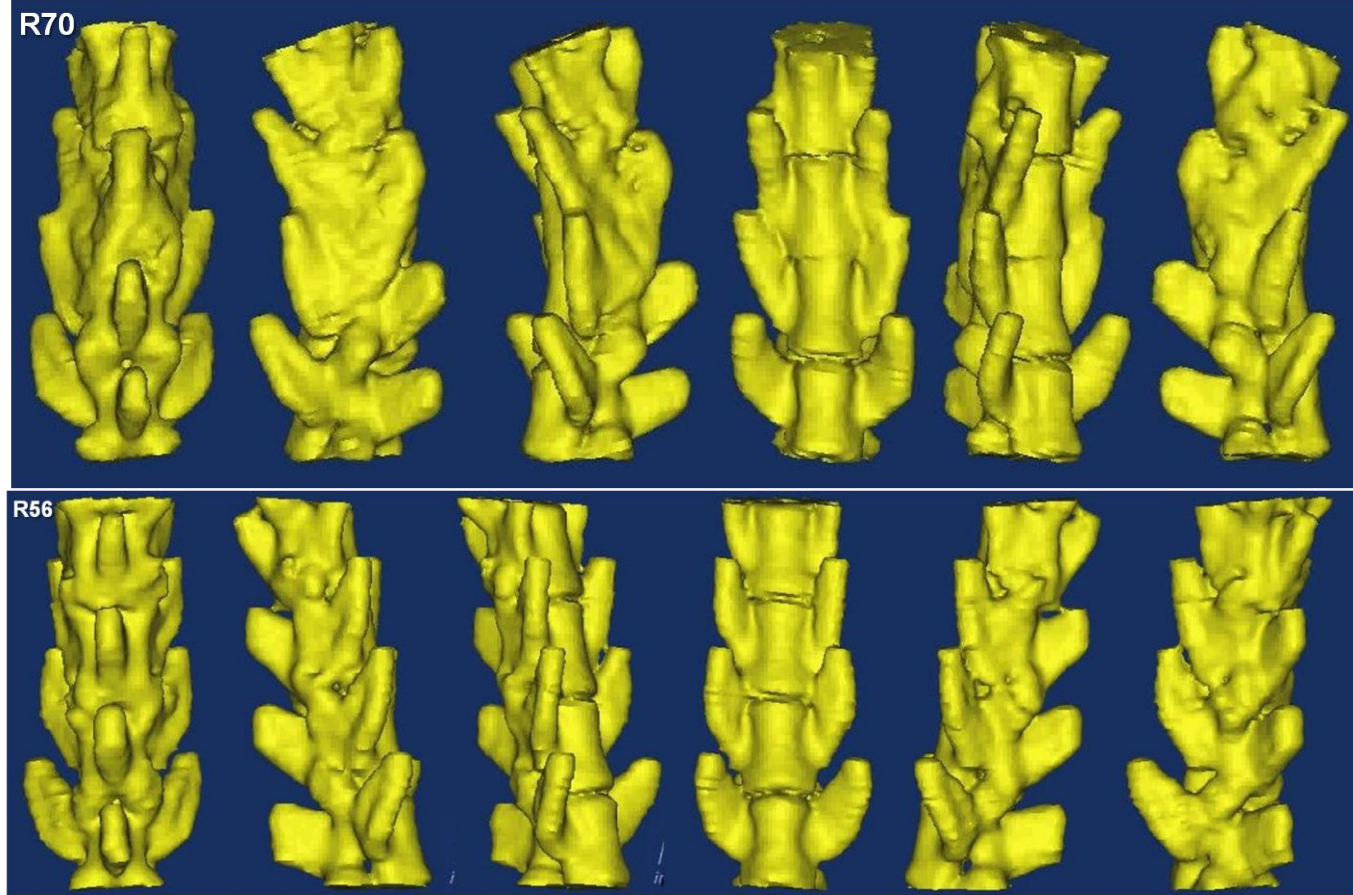
* Bu gruptaki bir adet rat 3. hafta sonundaki radyolojik inceleme için yapılan anestezi sonrası ex olmuştur.



Şekil 4.5. Dört farklı rata ait lomber vertebraların aksiyel, sagittal ve koronal BT kesitleri.

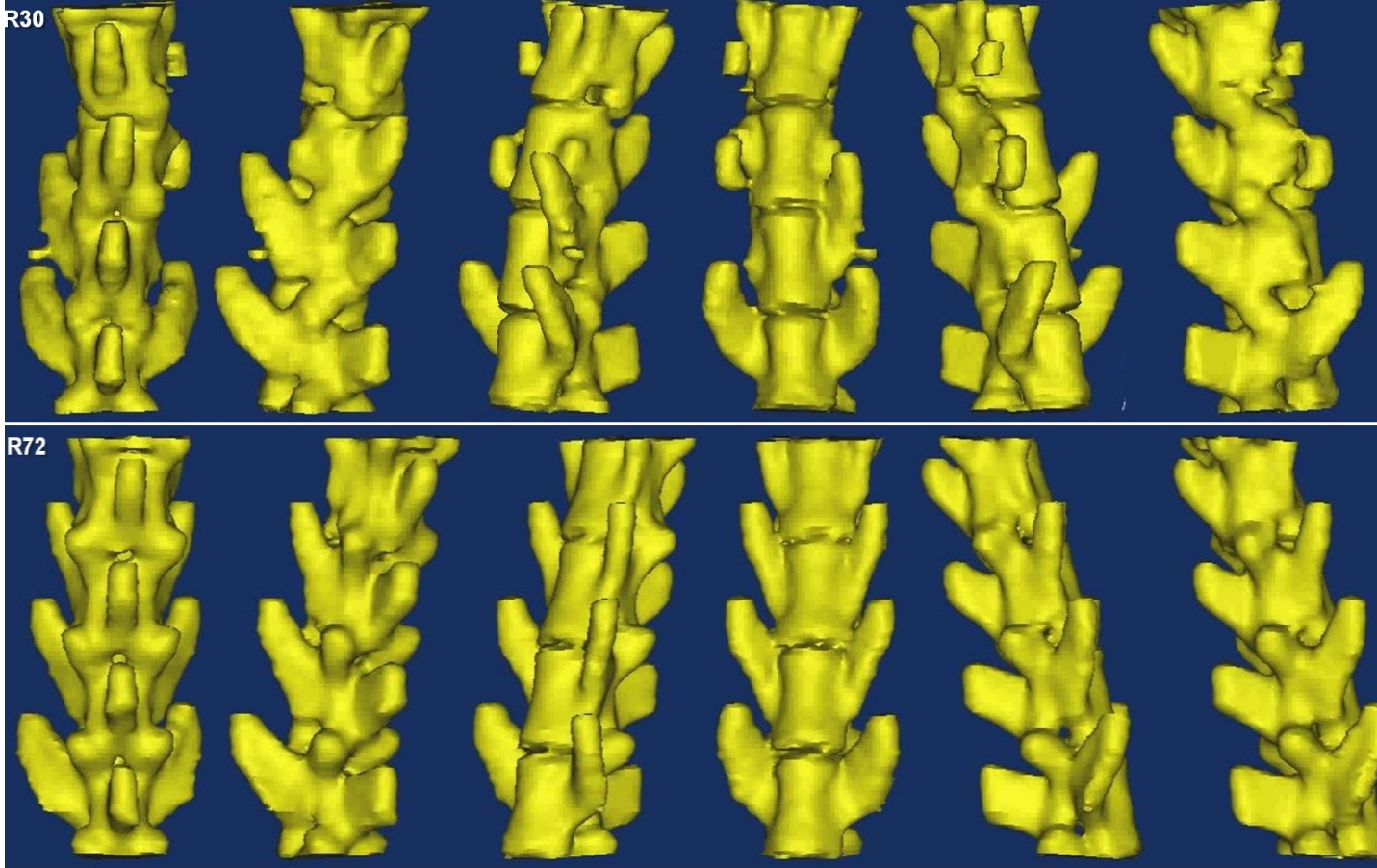


Şekil 4.5(*devamı*). Dört farklı rata ait lomber vertebraların aksiyel, sagittal ve koronal BT kesitleri.



Şekil 4.6. Dört farklı rata ait lomber vertebraların 3D modelleri.

(Örnekler kendi etrafında 180° döndürülüp anterior, posterior, sağ-sol oblik ve sağ-sol lateral görüntüleri alınmıştır.)



Şekil 4.6(*devamı*). Dört farklı rata ait lomber vertebraların 3D modelleri.

(*Örnekler kendi etrafında 180° döndürülüp anterior, posterior, sağ-sol oblik ve sağ-sol lateral görüntüleri alınmıştır.*)

Tablo 4.2. 3D modellerden yapılan hacim ölçümlerinin gruplara göre ortalama, ortanca, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri.

Gruplar	0.hafta					3.hafta					6.hafta				
	Ort.	Ortanca	S.S.	Min.	Maks.	Ort.	Ortanca	S.S.	Min.	Maks.	Ort.	Ortanca	S.S.	Min.	Maks.
1 (NK)	1351,0 7	1268,8 9	185,6 3	1142,4 8	1588,2 0	1375,5 0	1299,2 1	184,5 9	1162,2 3	1606,4 0	1395,9 1	1312,6 4	185,3 0	1183,1 4	1626,7 8
2 (PK_3)	1393,2 3	1403,0 6	113,9 7	1168,5 3	1503,9 0	1446,0 3	1448,1 0	82,01	1301,4 3	1574,6 9	-	-	-	-	-
3 (PK_6)	1281,3 6	1236,8 6	137,6 3	1164,5 5	1582,8 1	1396,0 5	1323,7 5	161,8 0	1309,4 6	1757,1 6	1425,8 5	1362,1 3	158,3 1	1315,7 0	1775,5 7
4 (EPO_3)	1382,3 3	1417,0 4	151,5 5	1117,6 3	1208,0 2	1464,0 0	1517,9 7	154,8 9	1583,0 4	1683,0 8	-	-	-	-	-
5 (EPO_6)	1376,2 7	1410,7 9	248,7 7	1039,6 0	1809,9 7	1441,7 8	1504,7 2	267,0 0	1060,3 7	1874,9 1	1477,3 9	1558,2 4	275,3 3	1078,9 9	1883,7 7
6 (MSC_3)	1386,8 2	1238,8 8	306,8 4	1178,1 2	1996,8 4	1516,4 3	1365,1 2	276,9 4	1278,4 2	2012,6 1	-	-	-	-	-
7* (MSC_6)	1385,0 0	1353,4 1	146,7 1	1207,0 0	1623,1 9	1491,2 4	1448,0 5	116,4 9	1357,7 0	1711,7 4	1551,0 2	1541,1 7	139,5 5	1371,2 8	1776,1 3
8 (pre24EPO+MSC_3)	1406,2 2	1466,9 6	172,2 5	1172,0 0	1583,1 0	1575,6 5	1609,8 0	96,70	1413,9 7	1710,8 2	-	-	-	-	-
9* (pre24EPO+MSC_6)	1524,1 0	1450,6 3	232,2 7	1304,0 4	1907,1 7	1663,9 3	1619,6 3	319,8 5	1267,5 3	2161,8 9	1754,6 7	1686,7 0	348,3 5	1304,9 3	2244,4 5
10 (MSC+post72EPO_3)	1515,0 4	1460,7 6	199,2 5	1323,7 7	1897,5 5	1615,1 5	1587,9 0	163,2 0	1427,6 3	1881,8 7	-	-	-	-	-
11 (MSC+post72EPO_6)	1299,2 1	1286,4 1	117,8 9	1108,0 2	1458,6 2	1459,9 3	1490,4 3	107,7 3	1255,1 8	1574,8 9	1550,9 9	1576,7 4	121,0 2	1337,4 8	1678,3 0

* Bu gruptaki bir adet rat 3. hafta sonundaki radyolojik inceleme için yapılan anestezi sonrası ex olmuştur.

Tablo 4.3. Gruplara göre 0-3 hafta ve 3-6 haftalar arasındaki hacim artışı ve yüzdeleri.

Gruplar	0-3 hafta hacim artışı (mm ³)	3-6 hafta hacim artışı (mm ³)
1 (NK)	24,43 (%1.8)	20,41 (%1.5)
2 (PK_3)	52,8 (%3.8)	-
3 (PK_6)	114,69 (%9)	29,8 (%2.1)
4 (EPO_3)	81,67 (%5.9)	-
5 (EPO_6)	65,51 (%4.8)	35,61 (%2.5)
6 (MSC_3)	129,61 (%9.4)	-
7 (MSC_6)	106,24 (%7.7)	59,78 (%4)
8 (pre24EPO+MSC_3)	169,43 (%12)	-
9 (pre24EPO+MSC_6)	139,83 (%9.2)	90,74 (%5.5)
10 (MSC+post72EPO_3)	100,11 (%6.6)	-
11 (MSC+post72EPO_6)	160,72 (%12.4)	91,06 (%6.23)

Tablo 4.3.'teki 0-3 hafta hacim artışları değerlendirildiğinde; cerrahi uygulanmayan NK grubunda %1.8 oranında artış saptanmıştır. Sadece cerrahi uygulanan PK_3 ve PK_6 gruplarında direkt grafi incelemelerinde yüksek oranda lizis (%71.4 ve %42.9) görülmesine rağmen; %3.8 ve %9 oranlarında hacim artışı olmuştur. Direkt grafi ve hacim bulguları arasındaki bu uyumsuzluk füzyonun ve hacim artışının intertransvers alanda değil, omurganın posterior elemanlarında geliştiğini göstermektedir. Histopatolojik bulgular (Bkz. Bölüm 4.4.) da bu hipotezi desteklemektedir.

Sadece EPO uygulanan EPO_3 ve EPO_6 gruplarında pozitif kontrol gruplarında benzer şekilde; direkt grafi incelemelerinde yüksek oranda lizis (%85.7, n=6) görülmesine rağmen; %5.9 ve %4.8 oranlarında hacim artışı

olmuştur. Bu sonuçlar sadece EPO uygulamasının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmadığını göstermektedir.

Sadece MSC uygulanan MSC_3 ve MSC_6 gruplarında EPO gruplarına göre daha yüksek oranlarda (%9.4 ve %7.7) hacim artışı olmuştur. MSC_3 grubundaki %9.4'lük artış direkt grafilerde görülen %57.1'lik (n=4) solid olmayan füzyon kitleleri görünümü ile uyumludur. Ayrıca bu sonuçlar MSC uygulamasının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranda füzyon sağladığı, ancak istatistiksel olarak anlamlı fark yaratmadığını göstermektedir.

EPO ve MSC kombinasyonu uygulanan pre24EPO+MSC_3, pre24EPO+MSC_6, MSC+post72EPO_3, MSC+post72EPO_6 gruplarında ilk 3 haftada sırasıyla %12, %9.2, %6.6 ve %12.4'lük hacim artışı olmuştur. Bu oranlar EPO veya MSC'lerin tek başına verildiği gruplardan daha yüksek olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı fark saptanamamıştır.

3-6 hafta arasındaki hacim artışı (mm³) değerlendirildiğinde; cerrahi uygulanmayan NK grubunda %1.5 oranında artış olmuştur. Bu oran 0-3 hafta arasındaki artış oranına yakındır (%1.8) ve hala büyümekte olan ratların 3 haftalık süredeki normal fizyolojik büyüme oranı olarak değerlendirilebilir.

Cerrahi uygulanan PK_6 grubunda ise %2.1'lik bir artış olmuştur. 0-3 hafta arasındaki artış oranının %9 olması ve sonrasında %2.1'e düşmesi ilk üç haftadaki kemik iyileşmesi sürecinde meydana gelen hipertrofik kallus oluşumu ve sonrasında bu oluşumun azalması ve yeniden şekillenme sürecinin başlamasına bağlanabilir.

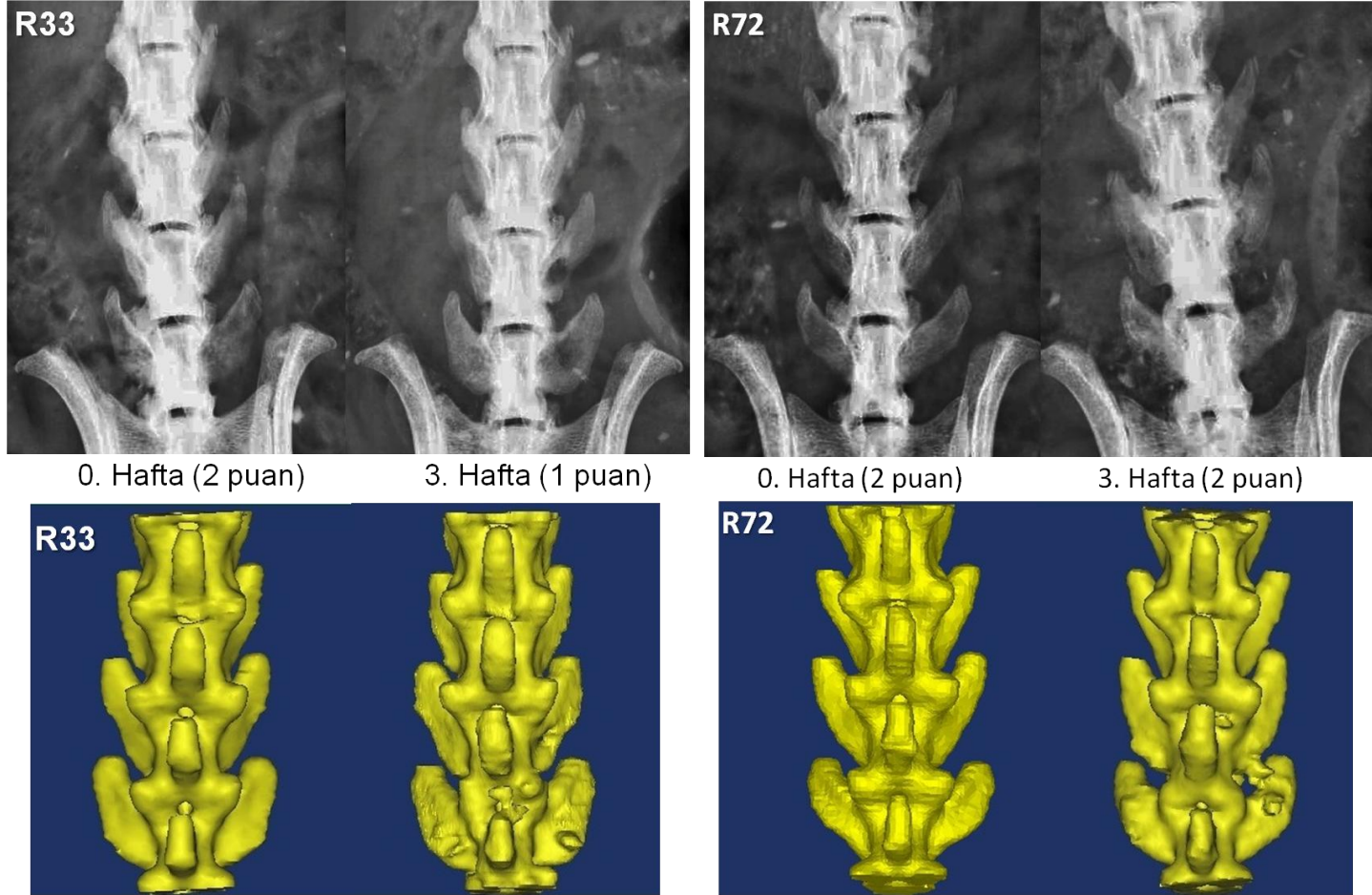
Sadece EPO verilen EPO_6 grubunda ise %2.5'lik bir artış olmuştur ve ilk 3 haftadaki artıştan belirgin olarak azdır (%9). Bu durum; PK_6 grubundaki gibi, yeniden şekillenme sürecinin başlamasına bağlanabilir.

Sadece MSC uygulanan MSC_6 grubunda %4'lük bir artış olmuştur ve ilk 3 haftadaki artıştan belirgin olarak azdır (%7.7). Ancak EPO grubuna göre

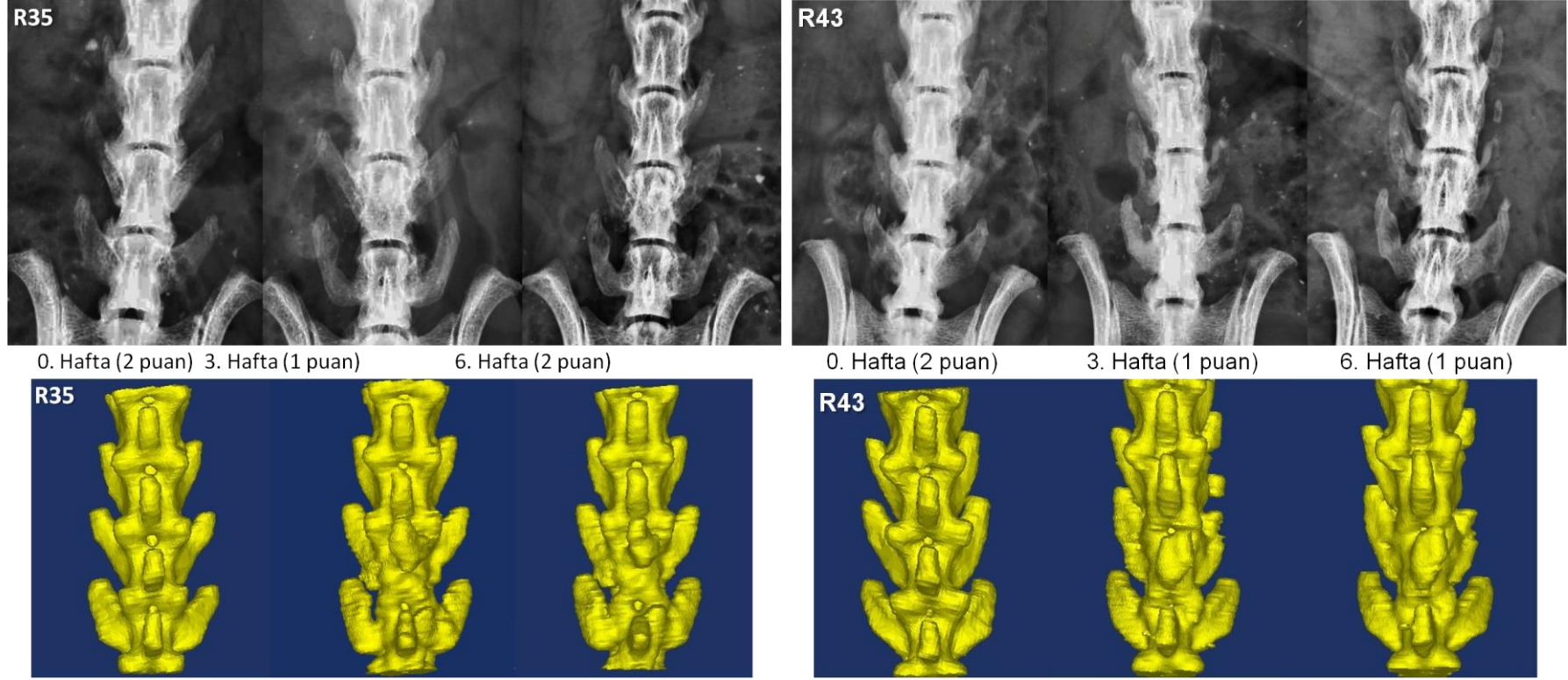
daha yüksek orandadır (%2.5). İlk üç haftadan sonra bu grupta da hacim artışının yavaşlaması yeniden şekillenme sürecinin başlamasına bağlanabilir.

EPO ve MSC kombinasyonu uygulanan pre24EPO+MSC_6 ve MSC+post72EPO_6 gruplarında sırasıyla %5.5 ve %6.23'lük hacim artışı olmuştur. Bu gruplarda da ilk üç haftadan sonra hacim artışının yavaşlaması yeniden şekillenme sürecinin başlamasına bağlanabilir. Ayrıca her iki gruptaki artış oranlarının, tek başına EPO (%2.5) veya MSC (%4) uygulamasına göre daha fazla olması EPO+MSC birlikteliğinin etkinliğini düşündürmektedir. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.

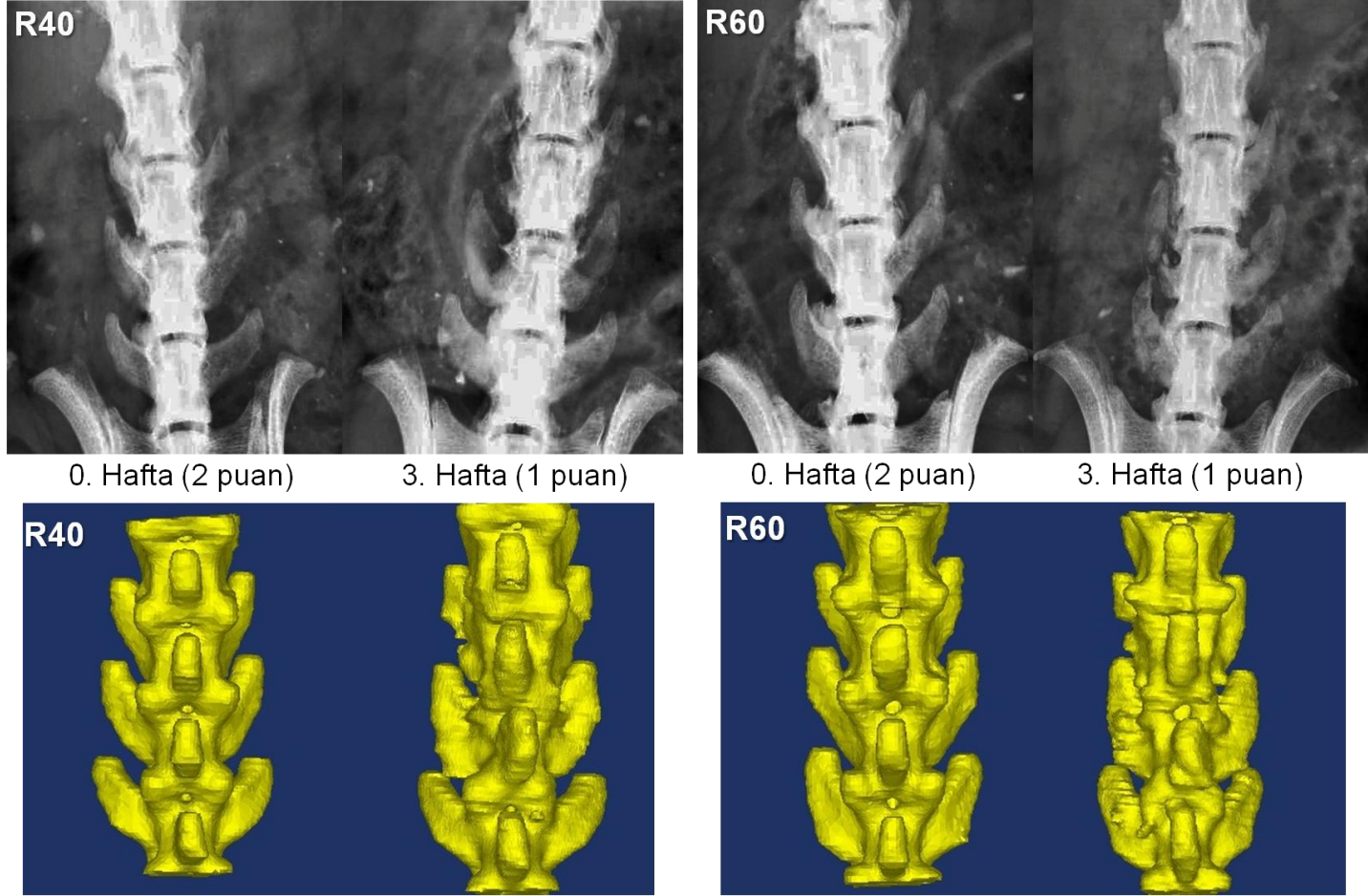
Postoperatif 72. saatten itibaren EPO uygulaması yapılan MSC+post72EPO_3 ve MSC+post72EPO_6 gruplarında hacim artışları preoperatif 24.saatte EPO'ya başlanan gruplara göre daha fazladır. Ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır.



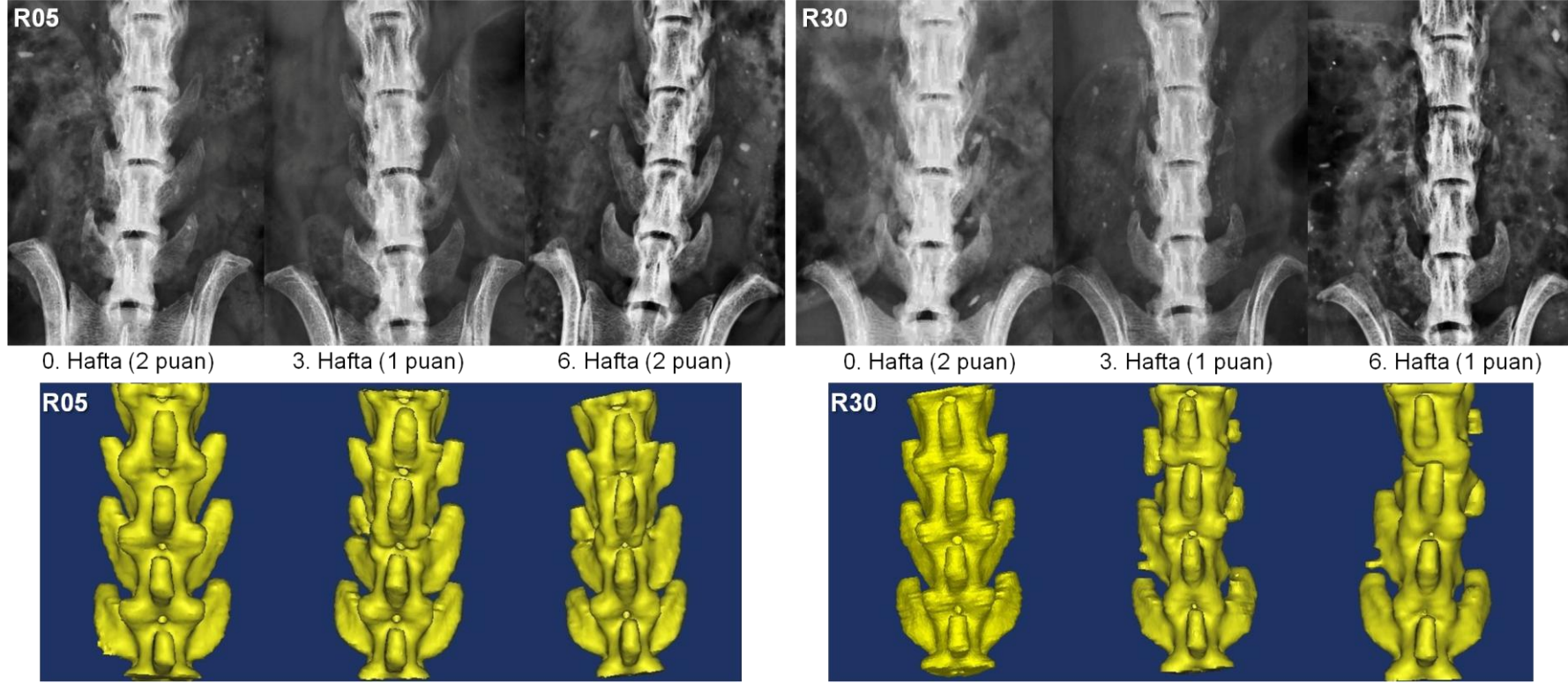
Şekil 4.7. PK_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



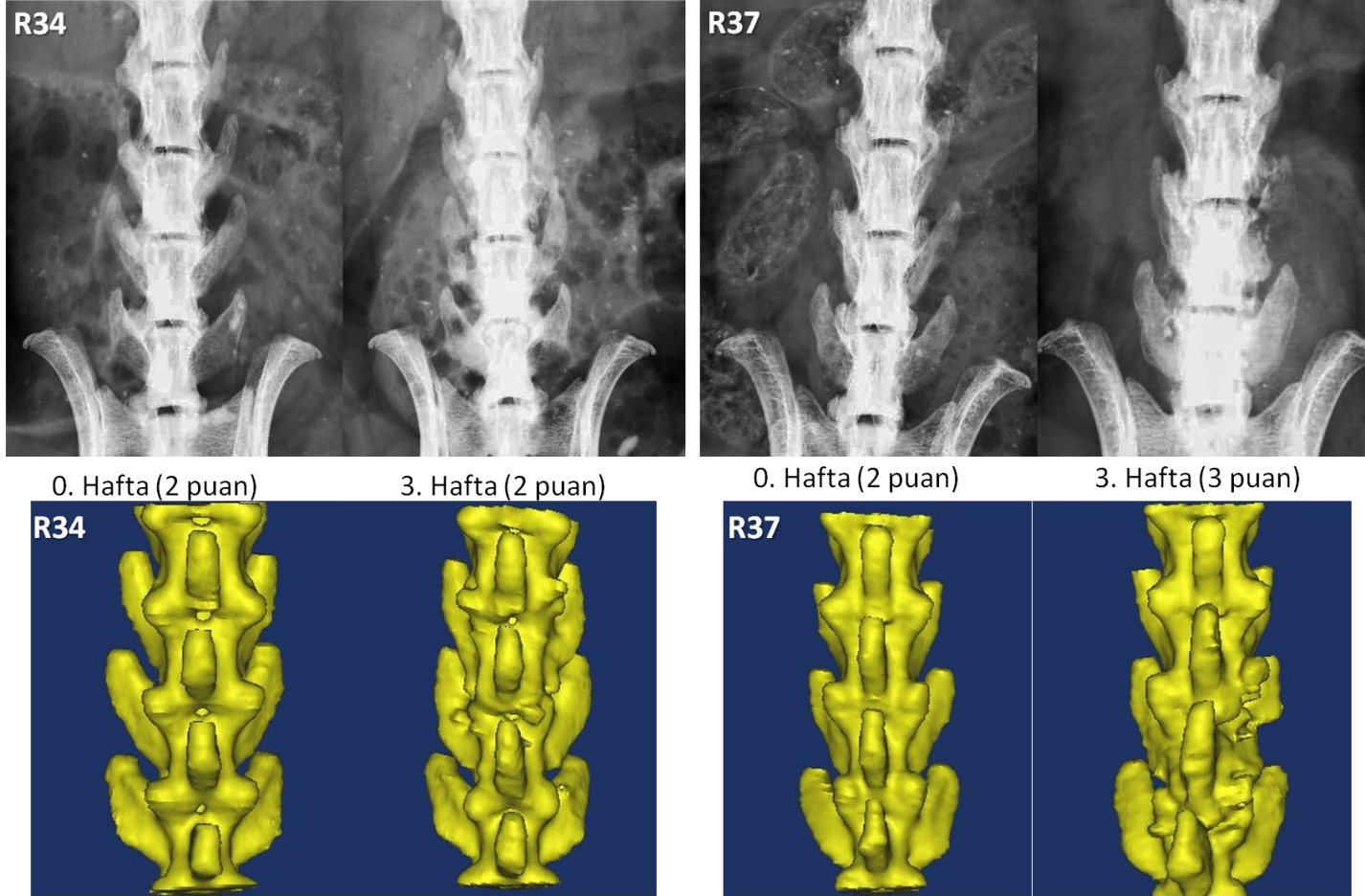
Şekil 4.8. PK_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



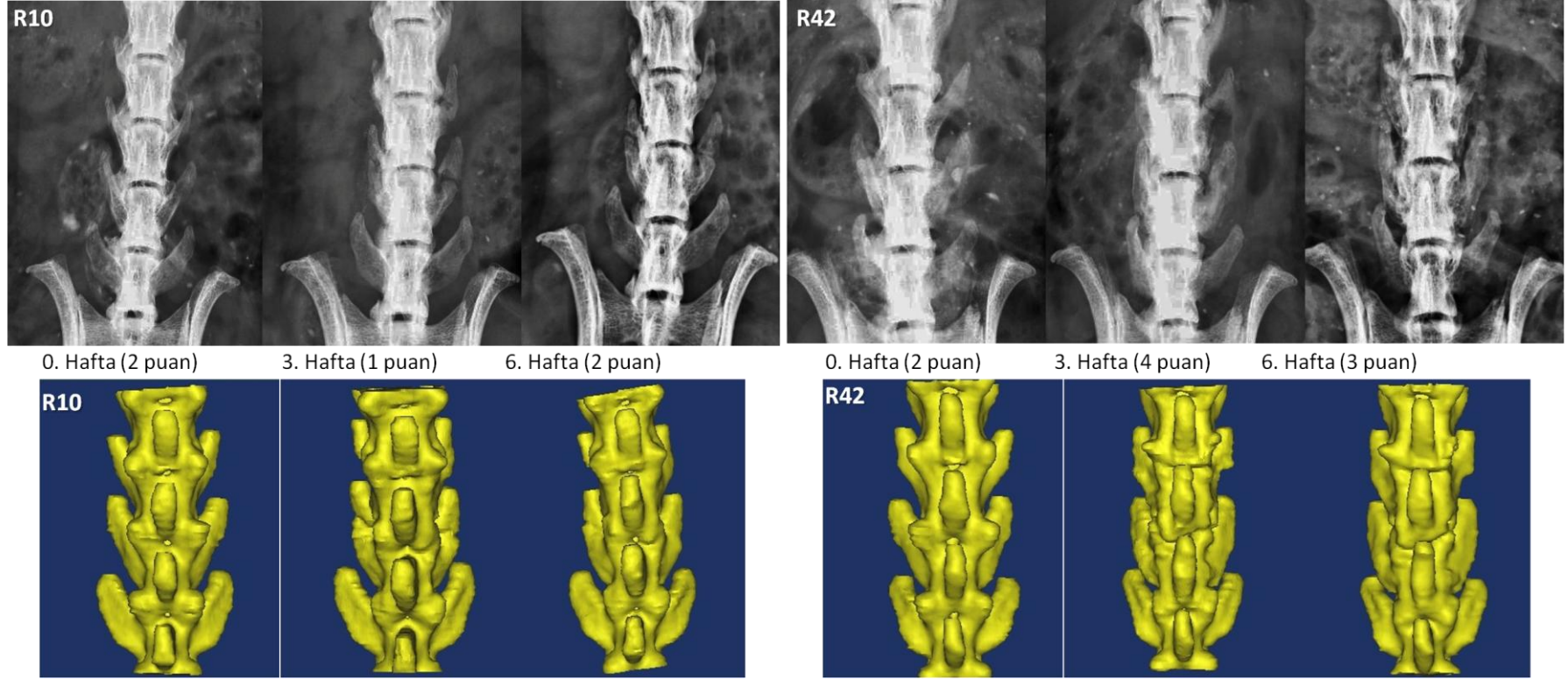
Şekil 4.9. EPO_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



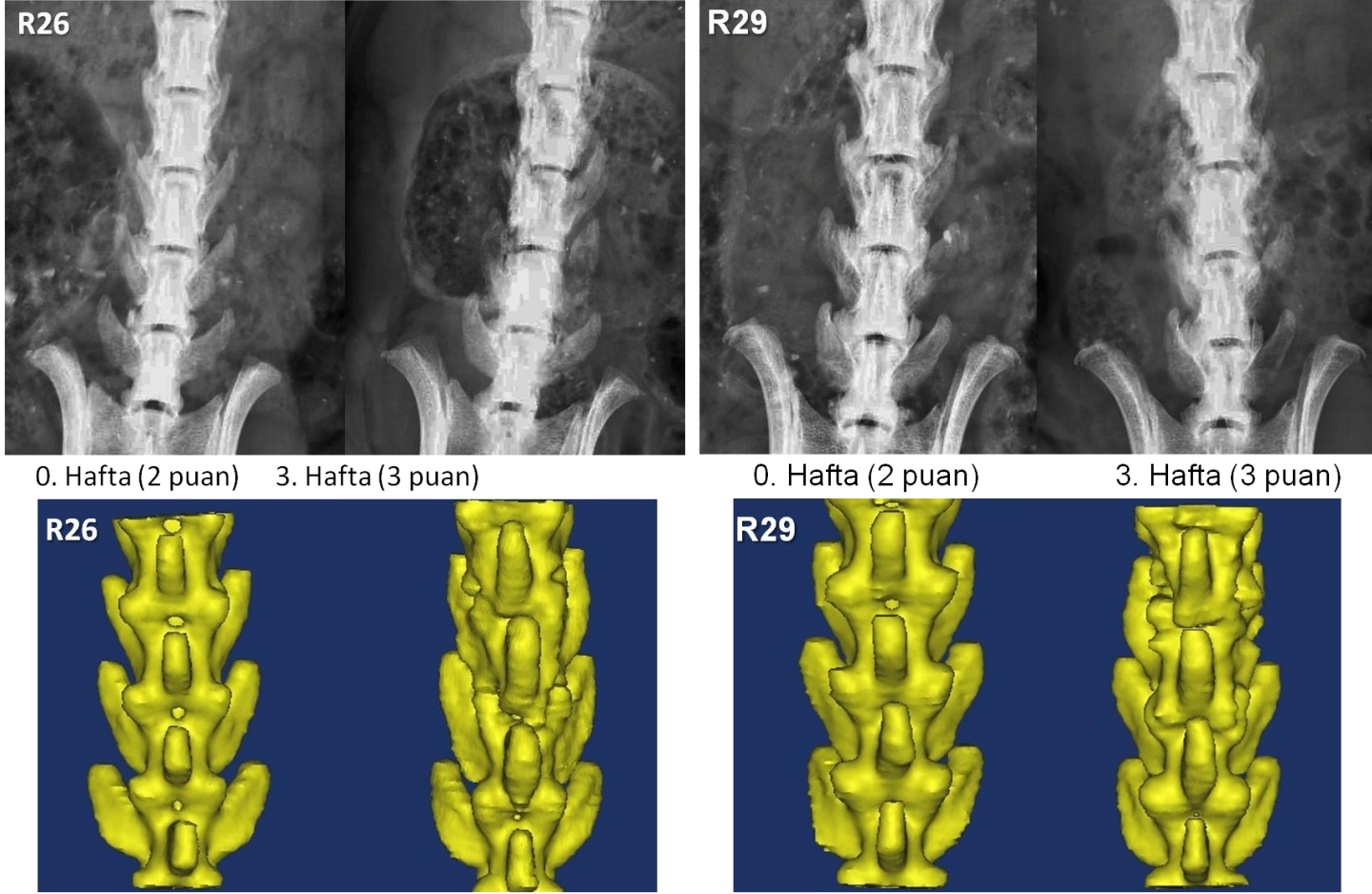
Şekil 4.10. EPO_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



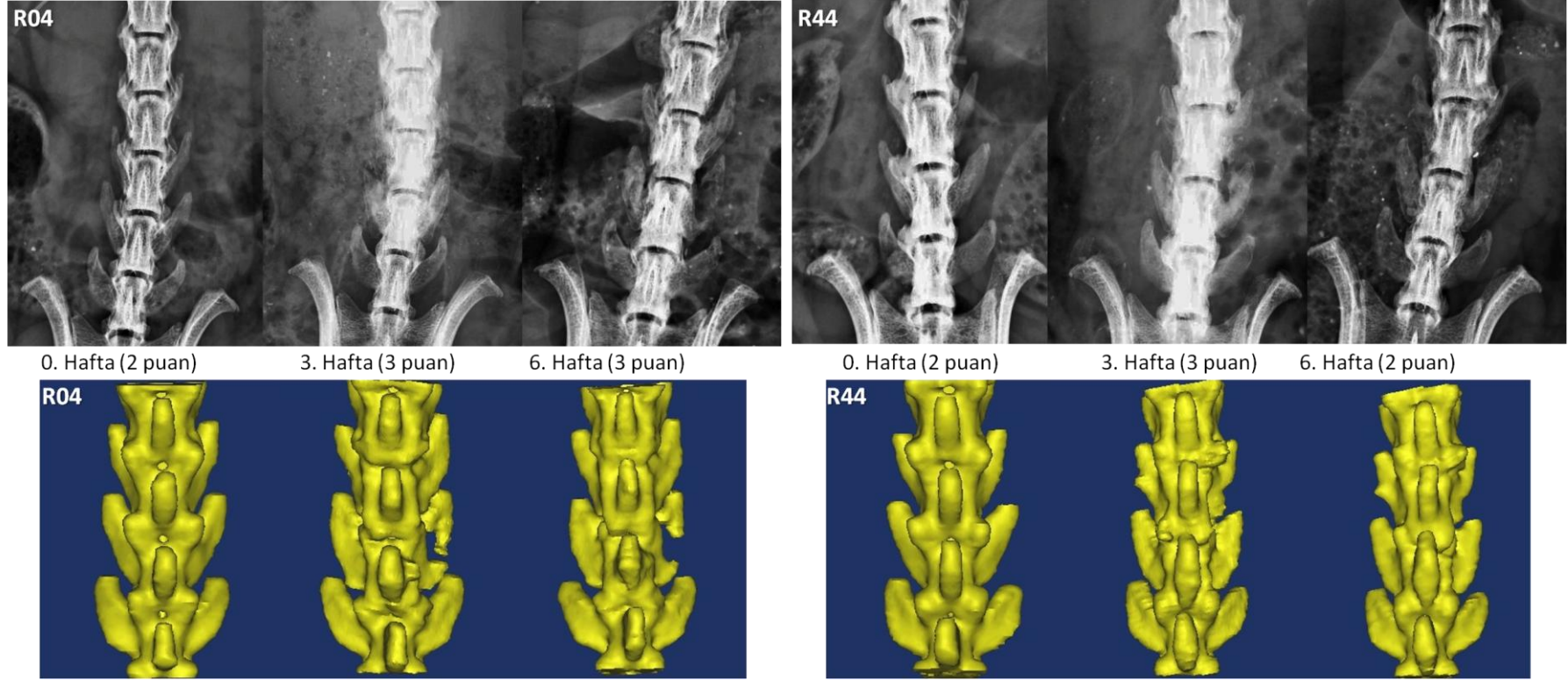
Şekil 4.11. MSC_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



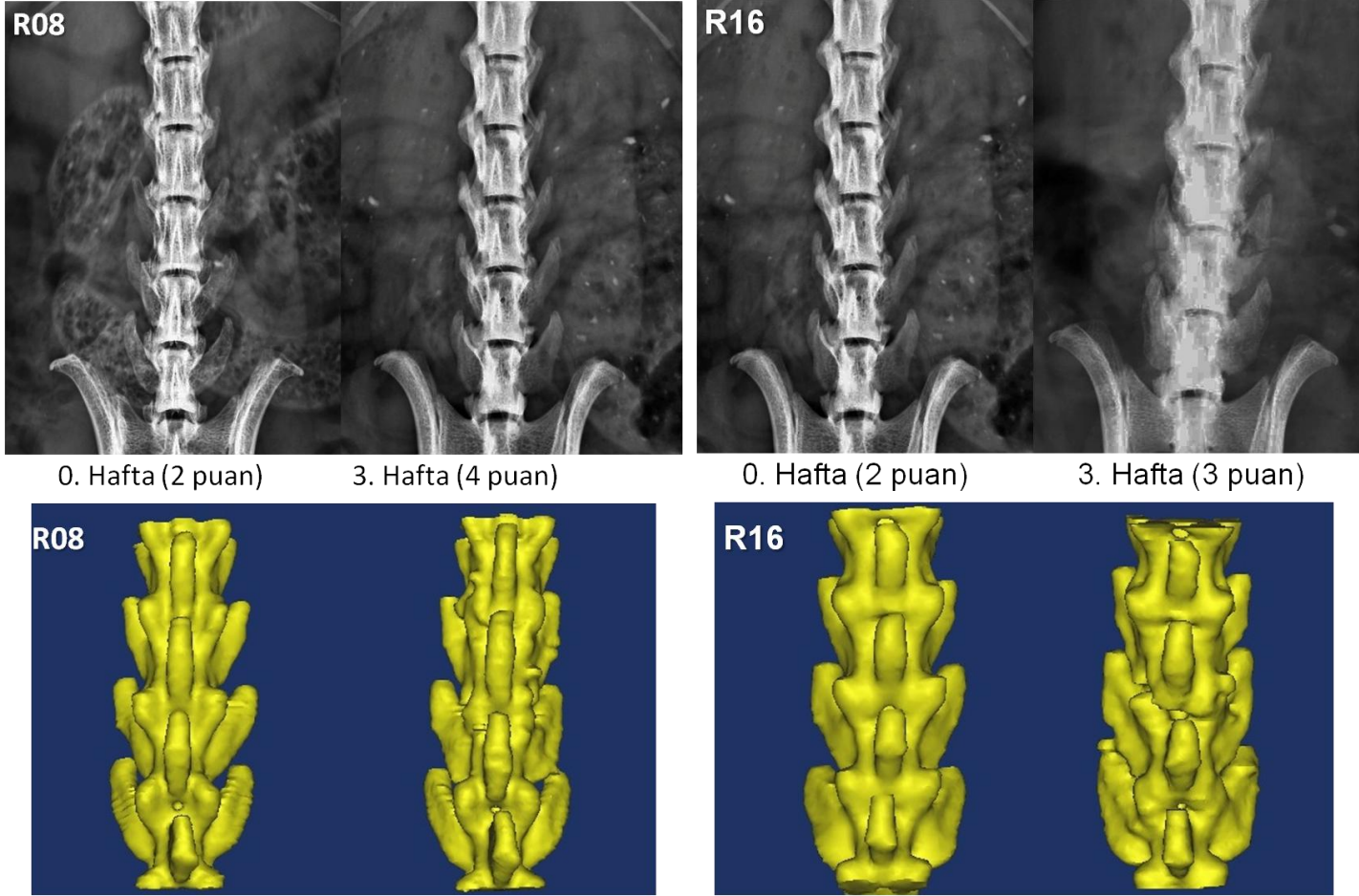
Şekil 4.12. MSC_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



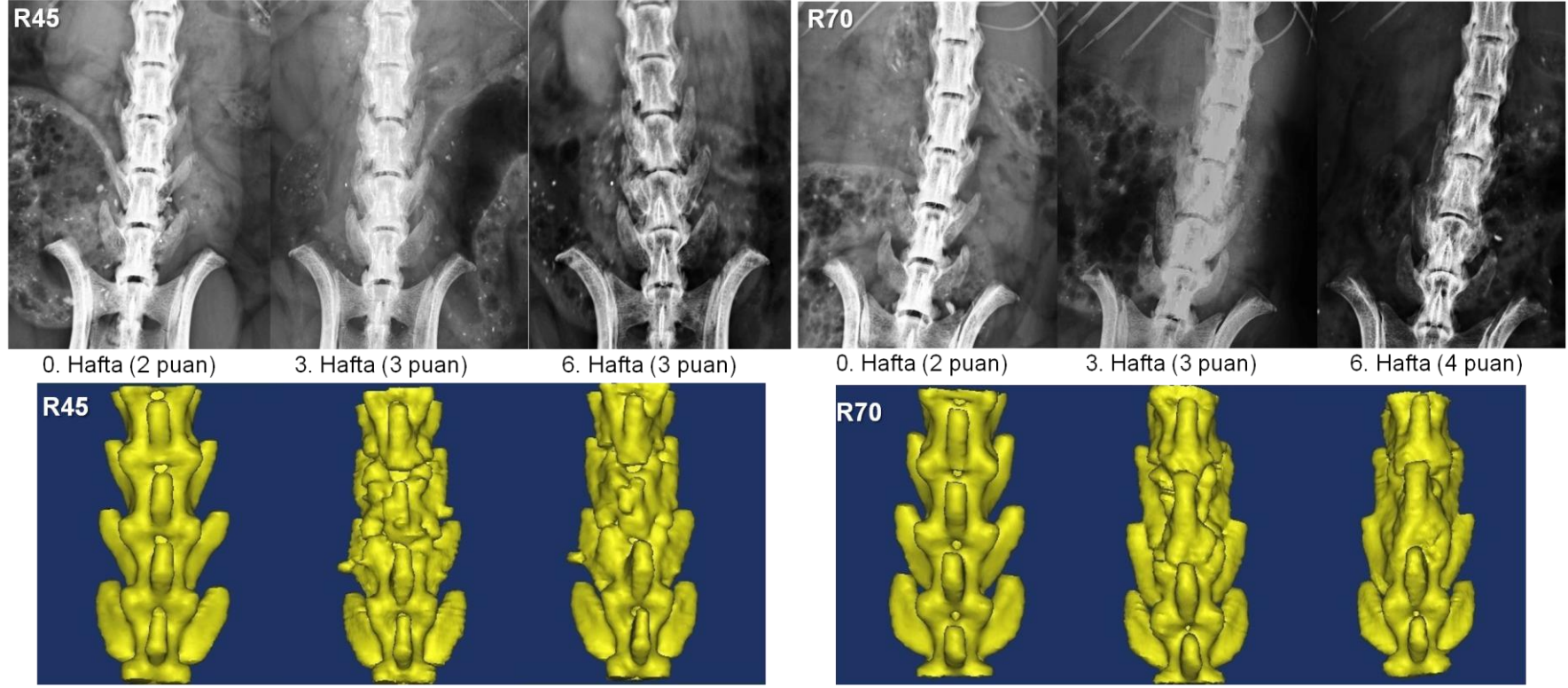
Şekil 4.13. pre24EPO+MSC_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



Şekil 4.14. pre24EPO+MSC_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



Şekil 4.15. MSC+post72EPO_3 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.



Şekil 4.16. MSC+post72EPO_6 grubundan iki farklı rata ait direkt grafi ve 3D model görüntüleri.

4.3. Manuel Palpasyon Bulguları

Çalışma gruplarının 3 ve 6. haftalardaki manuel palpasyon ile füzyon değerlendirmeleri Tablo 4.4.'te sunulmuştur.

Tablo 4.4. Manuel palpasyon ile değerlendirme sonuçları.

Gruplar	(0) Füzyon yok	(1) Füzyon var	TOPLAM
1 (NK)	7 (%100)	0 (%0)	7 (%100)
2 (PK_3)	7 (%100)	0 (%0)	7 (%100)
3 (PK_6)	4 (%57,1)	3 (%42,9)	7 (%100)
4 (EPO_3)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	7 (%100)
5 (EPO_6)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	7 (%100)
6 (MSC_3)	3(%42,9)	4 (%57,1)	7 (%100)
7* (MSC_6)	4 (%57,1)	3(%42,9)	7 (%100)
8 (pre24EPO+MSC_3)	2(%28,6)	5 (%71,4)	7 (%100)
9* (pre24EPO+MSC_6)	4 (%57,1)	3(%42,9)	7 (%100)
10 (MSC+post72EPO_3)	6 (%85,7)	1 (%14,3)	7 (%100)
11 (MSC+post72EPO_6)	2(%28,6)	5 (%71,4)	7 (%100)
TOPLAM	50 (%64,9)	27 (%35,1)	77 (%100)

**İşaretili gruplarda birer adet rat 3. hafta sonundaki radyolojik incelemede yapılan anestezi sonrası ex olduklarından dolayı değerlendirilmeleri 6. hafta değil, 3. hafta sonunda yapılmıştır.*

Tablo 4.4.'de sunulan manuel palpasyon sonuçları incelendiğinde:

Sadece cerrahi uygulanan PK_3 ve PK_6 gruplarında ilk 3 haftada füzyon gelişmemiştir. Ancak 6. hafta sonunda %42.9 (n=3) oranında füzyon gelişmesi sadece dekortikasyon işleminin füzyon sağlayabildiğini göstermektedir.

Cerrahi uygulanan ve sadece EPO verilen EPO_3 ve EPO_6 gruplarında 3. ve 6. haftadaki incelemelerde birer ratta füzyon gelişmesi

(%14.3, n=1) EPO uygulamasının füzyon başarısını azalttığını düşündürmektedir.

Cerrahi ve sadece MSC uygulanan MSC_3 ve MSC_6 gruplarında ilk 3 haftada %57.1 (n=4); 6. hafta sonunda ise %42.9 (n=3) oranında füzyon saptanmıştır. Bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı olup (p= 0,015) cerrahi sonrası erken dönemden itibaren tek başına MSC uygulamasının füzyon başarısını arttırdığını düşündürmektedir.

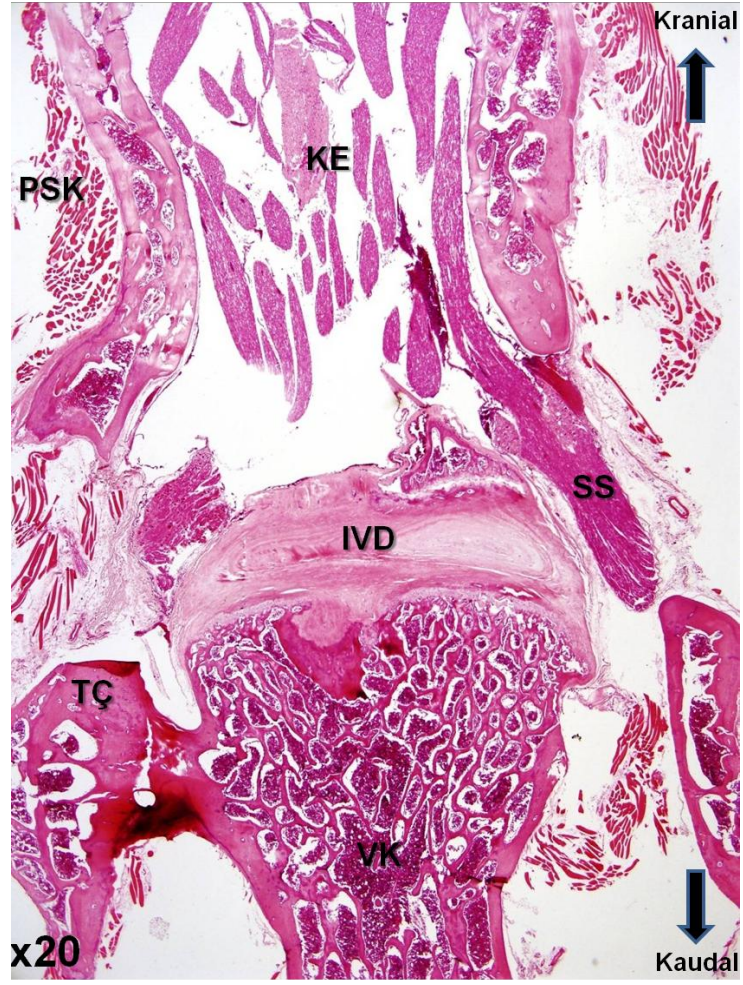
Cerrahi ve EPO+MSC kombinasyonu uygulanan pre24EPO+MSC_3, pre24EPO+MSC_6, MSC+post72EPO_3, MSC+post72EPO_6 gruplarında ilk 3 haftada sırasıyla %71.4 (n=5), %42.9 (n=3), %14.3 (n=1) ve %71.4 (n=5) oranlarında füzyon saptanmıştır. Bu oranlar istatistiksel olarak anlamlı olup (p= 0,015) cerrahi sonrası erken dönemden itibaren EPO+MSC kombinasyonunun füzyon başarısını arttırdığını ancak tek başına MSC uygulamasından daha etkin olmadığını göstermektedir.

Preoperatif 24. saat ve postoperatif 72. saatten itibaren EPO uygulaması gruplar arasında istatistiksel olarak farklı değildir.

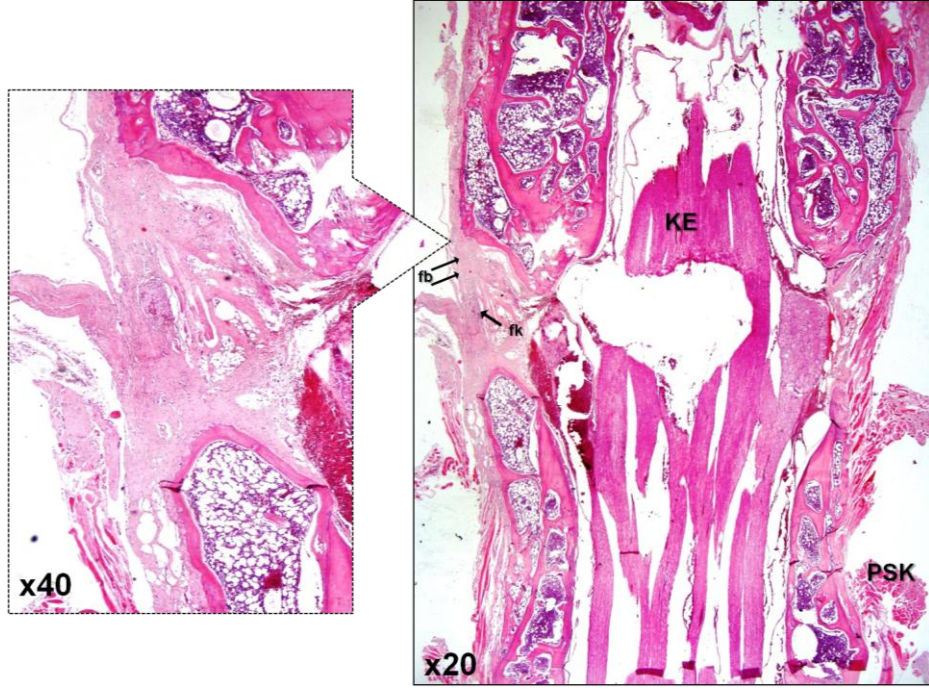
4.4. Histopatolojik İnceleme Bulguları

Çalışma gruplarının 0, 3 ve 6. haftalardaki histopatolojik değerlendirmeleri aşağıdaki puanlamaya göre yapılmış olup sonuçları Tablo 4.5.'de sunulmuştur:

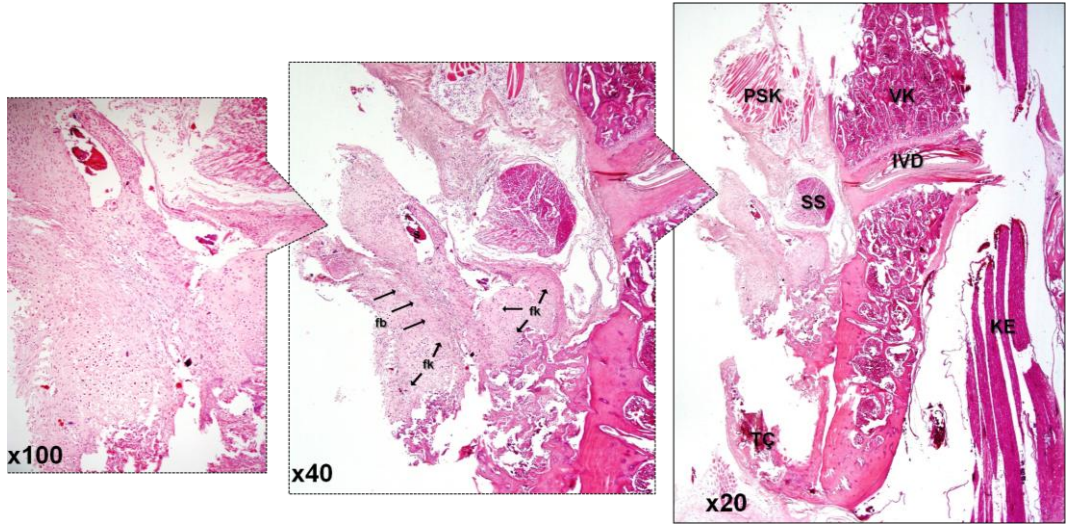
- 0 puan: Boş adacıklar,
- 1 puan: Sadece fibröz doku,
- 2 puan: Fibröz doku fibrokırdak dokudan fazla,
- 3 puan: Fibrokırdak doku fibröz dokudan fazla,
- 4 puan: Sadece fibrokırdak doku,
- 5 puan: Fibrokırdak doku kemik dokudan fazla,
- 6 puan: Kemik doku fibrokırdak dokudan fazla,
- 7 puan: Sadece kemik doku.



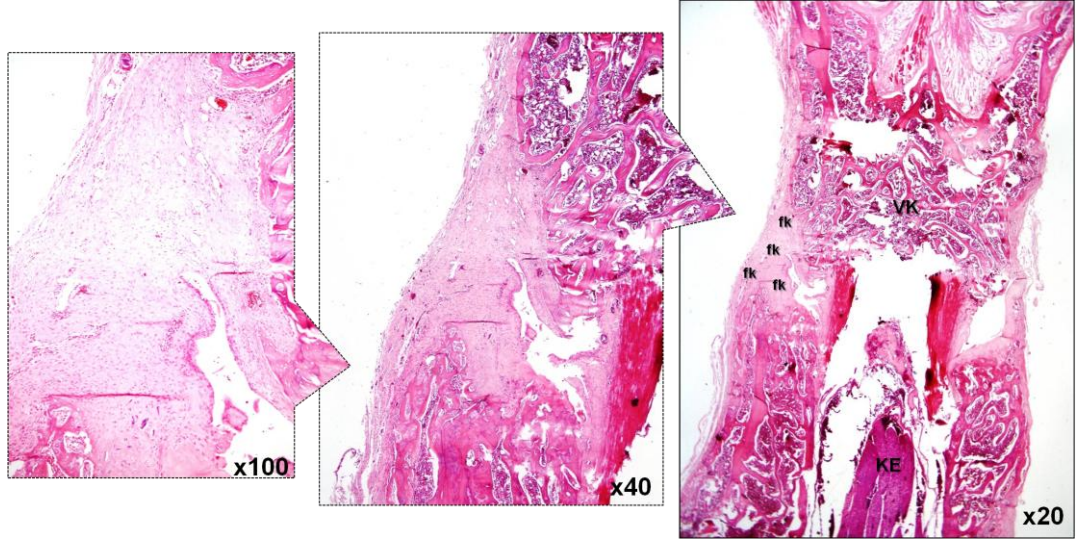
Şekil 4.17. Sıfır puan verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Kranialde her iki tarafta paraspinal kas dokuları (PSK) ve orta hatta spinal kanal ve içerisindeki kauda ekina (KE) görülmektedir. Orta hatta intervertebral disk (IVD) ve komşuluğundaki nöral foramenden çıkan spinal sinir kökü (SS), hemen kaudalde ise vertebra korpusu (VK) ve her iki lateralinde transvers çıkıntılar (TÇ) görülmektedir. Transvers çıkıntılar arasında boş adacıklar mevcuttur.



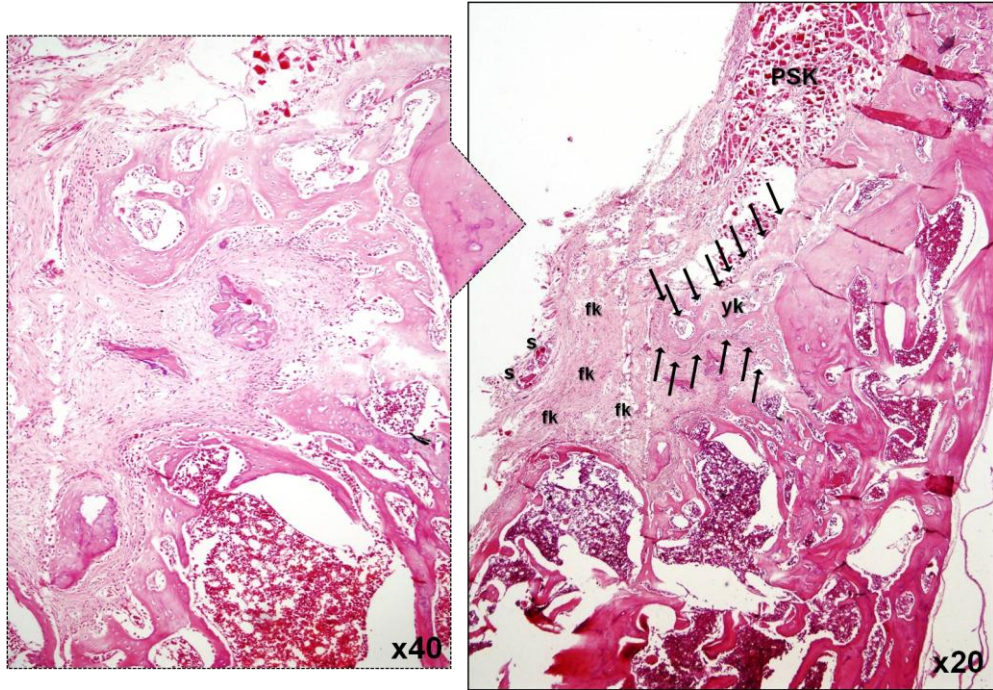
Şekil 4.18. İki puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. x40 büyütme ile gösterilen sol taraftaki resimde fibröz doku (fb) ve fibrokıkırdak doku (fk) alanları görülmekte olup fibröz doku çoğunluktadır.



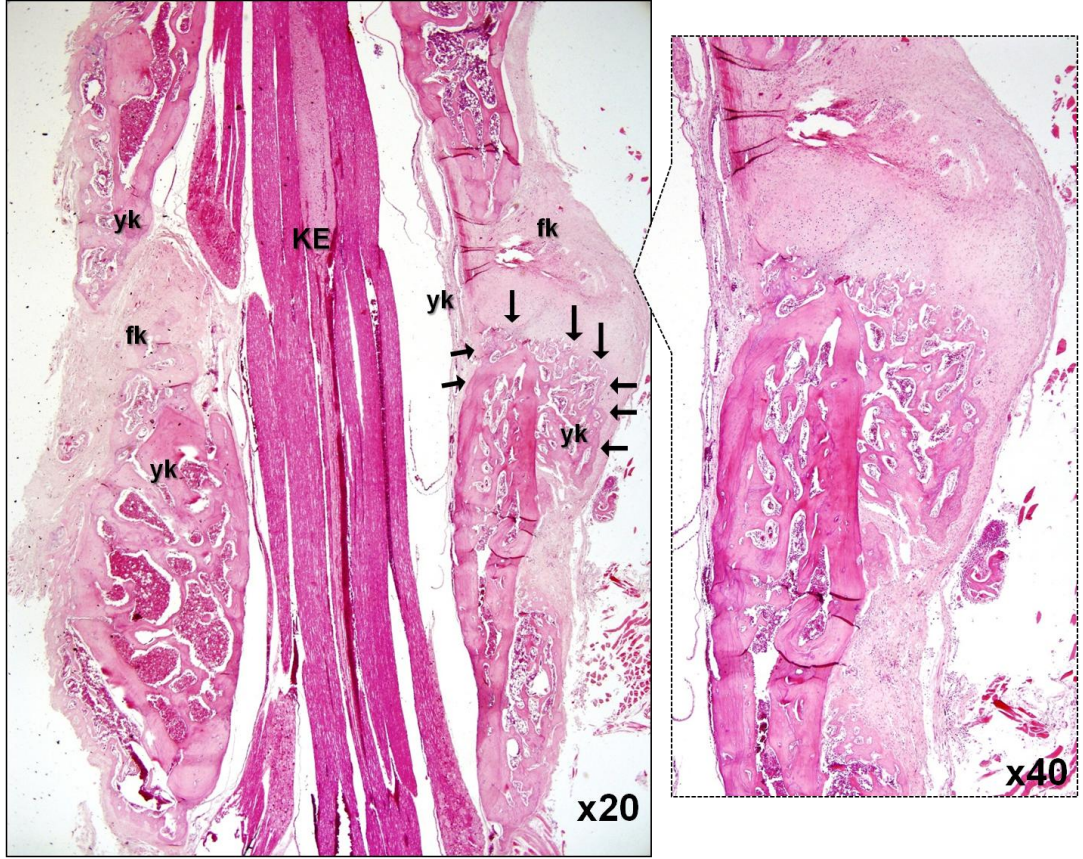
Şekil 4.19. Üç puan verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Fibrokıkırdak doku (fk) fibröz dokudan (fb) baskın haldedir. x40 ve x100 büyütmelerde sekestre kemik dokusu (s) görülmektedir.



Şekil 4.20. Dört puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. x40 ve x100 büyütmelerde ayrıntılı olarak görülen füzyon bölgesinde fibrokıkırdak doku (fk) hakimiyeti görülmektedir.



Şekil 4.21. Beş puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Füzyon alanında sekestre kemik dokuları (s) ve yeni kemik (yk) oluşumu görülmekle birlikte fibrokıkırdak doku (fk) hakimiyeti mevcuttur.



Şekil 4.22. Altı puan verilen verilen doku örneğinin histopatolojik görüntüsü. Füzyon bölgesinde yaygın yeni kemik (yk) yapımı görülmekte olup az miktarda fibrokıkırdak (fk) doku da görülmektedir. Koyu pembe renkli orijinal kemik dokularının arası yeni kemik yapımıyla doldurulmaktadır. Aradaki fibrokıkırdak dokunun da ossifiye olmasıyla solid füzyon görünümü gelişecektir.

Tablo 4.5. Histopatolojik değerlendirme sonuçları.

Gruplar	0 puan	1 puan	2 puan	3 puan	4 puan	5 puan	6 puan	7 puan	Toplam
1 (NK)	7 (%100)	0	0	0	0	0	0	0	7 (%100)
2 (PK_3)	0	0	0	0	0	5 (%71,4)	2 (%28,6)	0	7 (%100)
3 (PK_6)	0	0	0	0	1 (%14,3)	4 (%57,1)	2 (%28,6)	0	7 (%100)
4 (EPO_3)	0	0	0	1 (%14,3)	2 (%28,6)	3 (%42,9)	1 (%14,3)	0	7 (%100)
5 (EPO_6)	0	0	3 (%42,9)	2 (%28,6)	0	0	2 (%28,6)	0	7 (%100)
6 (MSC_3)	0	0	0	0	0	6 (%)	1 (%14,3)	0	7 (%100)
7 (MSC_6)	0	0	0	0	0	5 (%)	2 (%28,6)	0	7 (%100)
8 (pre24EPO+MSC_3)	0	0	0	0	0	3 (%42,9)	4 (%57,1)	0	7 (%100)
9 (pre24EPO+MSC_6)	0	0	0	0	2 (%28,6)	3 (%42,9)	2 (%28,6)	0	7 (%100)
10 (MSC+post72EPO_3)	0	0	0	0	0	3 (%42,9)	4 (%57,1)	0	7 (%100)
11 (MSC+post72EPO_6)	0	0	0	0	0	4 (%57,1)	3 (%42,9)	0	7 (%100)
TOPLAM	7 (%9,1)	0	3 (%3,9)	3 (%3,9)	5 (%6,5)	36 (%48,6)	23 (%29,9)	0	77 (%100)

Tablo 4.5.'te sunulan histopatolojik değerlendirme sonuçları incelendiğinde:

Cerrahi uygulanan, EPO veya MSC uygulanmayan PK_3 ve PK_6 gruplarında yakın oranlarda puanlama verilmiş olup genellikle fibrokıkırdak doku ve az miktarda kemik doku oluşumu saptanmıştır. Oranlar arasında istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. Bu sonuçlar sadece dekortikasyon işleminin solid olmasa da füzyonu etkilediğini göstermektedir.

Cerrahi uygulanan ve sadece EPO verilen EPO_3 ve EPO_6 gruplarında fibrokıkırdak doku ve az miktarda kemik doku oluşumu yanında fibröz dokular da görülmektedir. Özellikle 6 hafta süreyle EPO verilen grupta %42,9 (n=3) oranında fibröz doku görülmesi EPO uygulamasının kıkırdak ve kemik doku gelişimini geciktirdiğini düşündürmektedir.

Cerrahi ve sadece MSC uygulanan MSC_3 ve MSC_6 gruplarında yüksek oranlarda fibrokıkırdak doku ve az miktarda kemik doku oluşumu görülmesi kontrol grupları ve sadece EPO verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0.000).

Cerrahi ve EPO+MSC kombinasyonu uygulanan pre24EPO+MSC_3, pre24EPO+MSC_6, MSC+post72EPO_3, MSC+post72EPO_6 gruplarında daha yüksek oranlarda kemik doku ve daha az miktarda fibrokıkırdak doku oluşumu görülmesi; kontrol grupları, sadece EPO verilen gruplar ve sadece MSC verilen gruplar ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p= 0.000). Bu etki ilk 3 haftada daha belirgindir.

Preoperatif 24. saat ve postoperatif 72. saatten itibaren EPO uygulaması gruplar arasında istatistiksel olarak farklı değildir.

4.5. Komplikasyonlar

2, 3 ve 4. gruplarda birer ratta cerrahi sonrasında sağ ayakta hafif güç kaybı ve kavramada yetersizlik ile belirlenen tek taraflı femoral sinir parezisi tespit edildi. 1 hafta içinde bulgular kendiliğinden geriledi.

5. gruptaki bir ratta sonrasında paraparezi (her iki ayakta güç kaybı ve kavramada yetersizlik) tespit edildi. 10 gün içinde bulgular kendiliğinden geriledi.

Cerrahi sonrasında 6. gruptaki bir ratta insizyon hattı üzerinde lokal hematoma gelişti. Kanibalizmi tetiklememesi için ayrı bir kafese alınarak günlük pansuman ile takip edildi. Cerrahi sonrası 3. günde serohemorajik içeriği muayene sırasında spontan olarak drene oldu. 5. güne kadar pansuman takibi yapıldı ve sonrasında eski kafesine geri konuldu.

Cerrahi sonrasında 5. ve 9. gruplardaki 2 ratta insizyon hattı zerinde minör cilt abrazyonları gelişti. Herhangi bir enfeksiyon bulgusu yoktu. Kafesleri değiştirilmedi ve günlük pansuman takibi uygulanarak 2-3 gün içerisinde geriledi.

7 (MSC_6) ve 9 (pre24EPO+MSC6). gruplarında birer adet rat 3. hafta sonunda yapılan radyolojik incelemeler sırasında anestezi komplikasyonları nedeniyle ex oldu. Bu nedenle bu ratların 6. haftadaki BT ve direkt grafi değerlendirmeleri çalışma dışı bırakıldı ancak manuel palpasyon ve histopatolojik incelemeleri yapıldı.



Şekil 4.23. Karşılaşılan çeşitli yara yeri komplikasyonları.

TARTIŞMA

EPO ve MSC'lerin tek başlarına kırık iyileşmesinde ve spinal füzyonda etkili olduğunu bildiren birçok çalışma mevcuttur. Çalışmamız, ratlarda spinal füzyonda EPO ve MSC'lerin birlikte kullanımlarını konu alan, bilindiği kadarıyla, literatürdeki ilk çalışmadır. Bu çalışma ile; osteogenez, anjiyogenez, antienflamasyon, yara iyileşmesi ve reepitelizasyon konusunda ortak etkilere sahip olan EPO ve MSC'lerin birlikte kullanımının ratlarda posterior ve posterolateral spinal füzyona olan etkileri, var ise bu etkinin erken ve geç dönemdeki farkı ve kırık iyileşmesinin ilk safhası olan inflamasyon safhasına etki edip etmediği değerlendirilmiştir.

Bu çalışma için, spinal füzyon hayvan modellerinde yaygın bir şekilde kullanılan Sprague-Dawley cinsi ratlar kullanılmıştır. Ratların spinal füzyon modelinde kullanımının genel dezavantajları olan:

- Omurga biyomekaniklerinin dörtayak üzerinde yürümelerinden dolayı insanlardan farklı olması,
- Cerrahi işlemde omurga stabilitesini tam olarak sağlamak için kullanılabilecek bir internal tespit cihazı olmaması,
- Kullanılabilecek otogreft miktarının çok az olması,
- Anatomik ve biyolojik özellikleri açısından insanlarla ortak noktalarının çok az olması
- Elde edilen doz ve etkinlik ile ilgili verilerin direkt olarak insanlara uyarlanamaması gibi hususlar çalışmamız için de geçerlidir (117, 147).

Çalışma tasarımı planlanırken incelenen literatürlerde; daha genç ratların füzyon oluşturma kapasitelerinin daha yüksek olduğu ve EPO tedavisine daha iyi yanıt verdikleri bilgisine rastlanmıştır. Klinik gözleme dayalı, kanıtlanmamış bu bilgi ve çoğu literatürdeki benzer hayvan yaşları göz önüne alınarak biz de bu çalışma için ortalama 18–20 haftalık ratlar kullandık. Histopatolojik incelemeler sırasında büyüme kıkırdaklarının hala kapanmamış olduğunu görmemiz ve negatif kontrol gruplarında da kemik

hacminde artış saptanması nedeniyle ileriki çalışmalarda kemik matürasyonunu tamamlamış olan daha yaşlı ratların kullanılmasının uygun olacağını düşünmekteyiz.

Çalışmamızda füzyon veya yeni kemik oluşumunu değerlendirebilmek amacıyla 0, 3. ve 6. haftalarda direkt grafiler çekilmiş ve değerlendirilmeleri Lenke ve arkadaşlarının kullandıkları kriterlerden modifiye edilen 5 puanlık skala ile yapılmıştır (148) (Bkz. Tablo 3.4. ve Tablo 3.5.)

Literatürdeki diğer rat spinal füzyon modellerinde geç dönemdeki füzyon değerlendirmelerinin 8 ve 12. haftalara kadar uzatılabildiği görülmektedir (24, 25, 110, 152, 153). Çoğu çalışmanın 6 veya 8. haftalarda sonlandırılması ve bu çalışmalarda 5. haftadan sonra belirgin füzyon artışı saptanamaması nedeniyle çalışmamız için 6. haftayı seçtik. Elde ettiğimiz hacim artışı verileri incelendiğinde, 3. haftadan sonra belirgin füzyon artışı saptanamaması bu literatürleri desteklemekte ve ilerideki çalışmalarda da 3 ve 6. haftalarda değerlendirme yapılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Rat spinal füzyon modellerinde kullanılan farklı radyolojik değerlendirme kriterlerinden Peterson ve arkadaşlarının kullandıkları 3 puanlık skala (24):

- 0, füzyon yok veya minimal füzyon,
- 1, solid olmayan muhtemel füzyon,
- 2, solid görünümlü muhtemel füzyon;

Miyazaki ve arkadaşlarının transvers çıkıntılar arasındaki kemik oranına göre değerlendirdikleri 6 puanlık skala (25):

- 0, kemik oluşumu yok,
- 1, %25'ten az kemik oluşumu,
- 2, %25-50 arası kemik oluşumu,
- 3, %50-75 arası kemik oluşumu,
- 4, %75-99 arası kemik oluşumu,

- 5, transvers çıkıntılarının arasını tamamen dolduran (%100) solid görünümlü kemik oluşumu

şeklinde. Bu çalışmaların ortak özelliği belirli miktarlarda otogreft veya allogreft kullanılmasıdır. Çalışmamızda ek otogreft veya allogreft kullanılmamış; burr ile dekortikasyon sırasında etrafa saçılan kemik tozları greft fonksiyonu görmüştür. Bu teknik ile elde edilebilecek otogreft miktarının diğer çalışmalara kıyasla çok az oranda olduğu ve burr kullanıldığından ısı nekrozu ile osteoblastik hücrelerin canlılığını yitirme olasılıklarının yüksek olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Direkt grafi incelemelerinde pozitif kontrol grubu ve EPO gruplarında istatistiksel olarak anlamlı derecede lizis saptanması nedeniyle yukarıda bahsedilen değerlendirme kriterleri yeterli görülmemiş, Lenke ve arkadaşlarının ölçütleri lizis gelişimini de kapsayacak şekilde modifiye edilmiştir. Oluşturduğumuz yeni radyolojik inceleme kriterlerinin (Bkz. Tablo 3.5.) ilerideki benzer çalışmalarda ölçüt olarak kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda füzyon hacminin değerlendirilmesi için 320 dedektör sıralı MDBT kullanılmıştır. Güncel literatür incelendiğinde ratlarda spinal füzyon değerlendirmelerinde genellikle yüksek çözünürlüklü mikro bilgisayarlı tomografi (mikroBT) yönteminin kullanıldığı görülmektedir (59, 153-155). Mikro-BT incelemesi; 3 µm piksel gibi detaylı bir uzaysal rezolüsyona inebilen, trabeküler kemik yapısının incelenmesinde kullanılabilecek en ayrıntılı tetkik olup, ülkemizde sayılı merkezde mevcuttur. Yüksek dozdaki radyasyon oranı nedeniyle çoğu hayvan modellerinde radyasyon yanıklarına yol açabilmekte ve sadece 3.6-7.6 cm arasındaki küçük boyutlardaki örneklerde inceleme yapabilmektedir. Bu nedenle canlı hayvanlarda yapılacak incelemelerde kullanışlı değildir (155, 156). Öte yandan; MDBT klinik kullanımı yaygın olan, canlı hayvanlarda da kullanılabilen, daha düşük radyasyon maruziyetine sahip, daha ucuz ve ulaşılabilir bir inceleme yöntemidir.

Ratlarda spinal füzyonun değerlendirilmesinde MDBT kullanımı ile ilgili çalışmalar literatürde çok az olup genellikle 64, 120 veya 256 dedektör sıralı

cihazlar kullanılmıştır (155, 157, 158). 320 dedektör sıralı MDBT cihazları ülkemizde sayılı merkezde olup GATA Radyoloji Anabilim Dalı bunlardan birisidir. Çalışmamız, bilindiği kadarıyla, ratlarda spinal füzyonun değerlendirilmesinde 320 dedektör sıralı MDBT'nin kullanıldığı ilk çalışmadır.

Rat omurgasının 3 boyutlu değerlendirilmesinde ve hacim ölçümünde Mimics Innovation Suite® programının kullanıma literatürde sadece bir çalışmada rastlanmıştır. Zhang ve arkadaşlarının rat vertebra endplate'leri ve internal kanal yapısını değerlendirdikleri bu çalışmada 3D görüntüler mikro BT verilerinden rekonstrükte edilmiştir (159). Çalışmamızda kullandığımız; 320 dedektör sıralı MDBT'den elde edilen verilerin Mimics Innovation Suite® programı ile rekonstrükte edilmesi ve değerlendirilmesi, bilindiği kadarıyla, literatürdeki diğer bir ilktir. Literatürde ilk defa bildirilen bu iki görüntüleme ve değerlendirme yönteminin mikroBT kullanımına alternatif yaratabileceği ve diğer çalışmalara öncü olacağı değerlendirilmektedir.

Bu noktada; Sayın Doç. Hv. Tbp. Kd. Alb. Erbil OĞUZ'un başkanı olduğu GATA Medikal Tasarım ve Üretim Merkezi'nin (METÜM) benzer çalışmalar için, tüm yurt içi ve yurt dışı araştırmacılara her zaman kapılarının açık olduğunu belirtmek isteriz.

Görüntüleme yöntemleri açısından çalışmanın diğer bir kısıtlaması oluşan füzyon kitlesinin mineralizasyonunun değerlendirilmemesidir. Bunun için günümüzde DEXA (*Dual-Energy Xray Absorptometry*) ve pQCT (*Peripheral Quantitative Computed Tomography*) teknikleri kullanılmaktadır (154). pQCT incelemesi in vivo olarak kemiğin trabeküler mimarisini incelemek için kullanılmaktadır. Görüntülerinin çözünürlüğünün az olması ve sadece kemik mineral yoğunluğunu değerlendirmesi eksik yönleridir. Ayrıca spinal füzyonda sadece "yaygın kemik oluşumu varsa" kullanılması önerilmektedir (158). Direkt grafi ve BT incelemelerinin süresinin zaten uzun olması, ek bir incelemenin anestezi süresini uzatıp ek anestezi madde gereksinimine yol açacağı ve komplikasyon oranını arttırabileceği düşüncesi ile çalışmamızda bu teknik uygulanmamıştır. Çalışma süresince ex olan iki ratın; uyguladığımız cerrahi işlem sonrasında değil de, radyolojik incelemeler

sırasındaki anestezi sonrasında ex olması bu düşünceyi haklı kılmaktadır. Ancak, ileride daha az rat sayısı ile planlanacak çalışmalarda DEXA incelemesinin faydalı olacağını düşünmekteyiz.

MDBT ile yapılan incelemeler sırasında; kardiyak BT anjiyografi tetkiklerinde kullanılan ateroskleroz plaklarındaki kalsiyum dağılımının ölçümünün benzer bir mantık ile füzyon kitlesi için de uygulanabileceği fikri akla yatkın gelmiştir. Bu yöntemin ilerideki çalışmalarla araştırılabileceği değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda füzyon değerlendirilmesinde kullanılan manuel palpasyon yerine; literatürdeki bazı çalışmalarda biyomekanik analiz veya “3 nokta bükülme (*Three point bending*) testi” yapılmıştır. Bu analizlerle rotasyon, torsiyon ve bükülme kuvvetlerine karşı mukavemet özellikleri incelenmiştir (23, 59). Ancak bu yöntem ile doku örneklerinde hasar meydana gelebilmekte ve histopatolojik inceleme yapılması olanaksız hale gelmektedir. Omurgaya elle stres uygulanarak değerlendirme ilkel bir yöntem olarak düşünülebilir; ancak solid füzyonu göstermede basit ve etkili bir yöntemdir. Çeşitli çalışmalarda spinal füzyonun değerlendirilmesinde manuel palpasyon yöntemi ile radyolojik bulgular arasında yüksek bir korelasyon bildirilmiştir (120). Öte yandan bazı çalışmalar da bu iki yöntem arasında diskordans olduğunu belirtmiştir (124). Bizim çalışmamızda da direkt grafi değerlendirmeleri ve hacim artışlarının manuel palpasyon değerlendirmeleri ile korele olduğu değerlendirilmiştir. Ancak histopatolojik inceleme bulguları ile belirgin korelasyon saptanamamıştır.

Kullanılan değerlendirme yöntemleri hep birlikte incelendiğinde direkt grafi, manuel palpasyon ve histopatolojik inceleme yöntemlerinin gözlemci bağımlı olması nedeniyle; en objektif kriterin, aynı zamanda tek kantitatif bulgu olan hacim miktarları olduğu görülmüştür. Ayrıca bu yöntemlerden; klinik uygulamada da kullandığımız manuel palpasyon değerlendirmesinin fonksiyonel açıdan en değerli bulgu olduğu değerlendirilmiştir.

Uyguladığımız cerrahi teknik; transvers çıkıntılarla birlikte faset eklemleri, lamina ve spinöz çıkıntılarının lateral yüzeylerini de içeren posterior+posterolateral intertransvers füzyon idi. Literatürdeki çalışmaların büyük çoğunluğunda posterolateral intertransvers füzyonun uygulandığını görmekteyiz (1, 108, 110, 113, 114, 116, 117, 137, 143, 146, 157, 158, 160-164). Bu yaklaşımda klasik Wiltse yöntemi kullanılarak iki paramedian fasya kesisi ile transvers çıkıntılara ulaşılmakta; lamina, faset eklemler ve spinöz çıkıntılar görülememektedir. Paraspinal kaslardan sağlanan kan desteğinin posterolateral spinal füzyona büyük katkısı olduğunu bildiren çalışmalar (1) göz önüne alındığında; bizim yaklaşımımızın, sadece intertransvers füzyon cerrahisine göre daha invazif ve kanlanmayı bozabilecek bir teknik olduğu düşünülebilir. Ancak elde edilen direkt grafi, hacim artışı ve manuel palpasyon bulguları incelendiğinde; cerrahi dışında ek bir işlem uygulanmayan pozitif kontrol gruplarında da yeni kemik oluşumu ve hacim artışı saptanması ve manuel palpasyon ile füzyon saptanması bu düşüncüyü çürütmektedir.

Cerrahi işlem öncesinde antibiyotik profilaksisi amacıyla 22 mg/kg. dozunda sefazolin sodyum kullanılmıştır. Küçük hayvanlarda uygulanan cerrahi işlemlerde en sık kontaminasyona yol açan patojenler *Staphylococcus spp.* (özellikle koagulaz pozitif *S. aureus*), *E. coli*, ve *Pasteurella spp.* olup sefazolin bu türlere karşı etkilidir. Ayrıca sefazolinin platelet agregasyonu, kanama zamanı, platelet sayısı ve büyüklüğü, protrombin zamanı veya aktive parsiyel tromboplastin zamanı üzerine belirgin etkisi olmadığı ve hemostatik açıdan kullanımı uygun olduğu bildirilmiştir (165). Enfeksiyonun engellenmesinde uygun aseptik cerrahi teknik, dikkatli ve atravmatik yumuşak doku diseksiyonu ve kanlanmanın bozulmaması, hemostaz ve doku kanlanmasının sağlanması, cerrahi alanın kapatılması sırasında mümkün olduğu kadar anatomik rekonstrüksiyon yapılması ve ölü boşluk yönetiminin iyi yapılması gibi yöntemler deney hayvanlarında da temel teknikler olup bu önlemler alınmadığında antibiyotik profilaksisi yeterli olmayacaktır (165). *Uyguladığımız dikkatli cerrahi teknik ve sefazolin*

profilaksisi sayesinde çalışmamızda enfeksiyonla ilgili herhangi bir komplikasyon görülmemiştir.

Cerrahi tekniğimiz ile eleştirilebilecek bir husus, 3 ratta tek taraflı femoral sinir parezisi ve 1 ratta paraparezi görülmesidir (Bkz. Bölüm 4.5.). Transvers çıkıntıların medial kısmı ile pars interartikularisin lateral kenarının burr ile dekortikasyonu sırasında lomber spinal sinir kökleri risk altında olduğu unutulmamalıdır (164). İlk cerrahi uygulanan gruplarda görülen bu komplikasyon; 7-10 gün içerisinde spontan olarak tamamen gerilemiş olup bu durum, traksiyona veya termal hasara bağlanmıştır. İleride planlanacak çalışmalarda rat kadavralarında veya 3 boyutlu modellerinde daha fazla pratik yapıp öğrenme eğrisinin kısaltılmasının bu tarz nörolojik komplikasyonları engelleyeceğini düşünmekteyiz. Diğer bir çözüm ise dekortikasyon uygulanmadan yapılacak füzyon cerrahileri olabilir. Guo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, ratlarda cerrahi bölgesine dekortikasyon yapılmadan uygulananan rhBMP-4'ün posterior spinal füzyonu arttırdığı bildirilmiştir (166). Bu artış rhBMP-4'ün etkisi ile, kemik iliği kaynaklı olmayan MSC'lerin füzyon bölgesine göç etmesi ve osteojenik farklılaşmaya uğramasına bağlanmıştır.

Cerrahi işlem sırasında, MSC uygulanan gruplarda dekortikasyon bölgesine herhangi bir taşıyıcı madde (skafold) kullanmadan, yaklaşık bir milyon adet MSC uygulanmıştır. Minamide ve arkadaşlarının (150) çalışmalarında kullandıkları bu sayının; çalışmamızdaki füzyon sonuçları değerlendirildiğinde yeterli olduğunu değerlendirmekteyiz. Literatürdeki bazı çalışmalarda cerrahi bölgesine yerleştirilen MSC'lerin immünflorasan işaretleme ile canlılıklarının histopatolojik olarak gösterilebildiği bildirilmektedir (108, 112). İleride planlanacak çalışmalara bu yöntemin de eklenmesinin uyguladığımız tekniğin etkinliğinin gösterilmesi açısından uygun olacağını değerlendirmekteyiz. Ek olarak MSC'lerin spinal füzyon modellerinde genellikle in vitro osteoblastik farklılaştırma sonrası çeşitli skafoldlar ile kombine olarak kullanıldığını görmekteyiz (67, 81, 108-115). Bu çalışmalarda özellikle osteoblastik farklılaştırmanın "uygulanması gerektiği"

vurgulanmaktadır. Ancak hangi oranda farklılaştırma yapılacağı net olmayıp hala tartışma konusudur. Ek olarak, skafold olmadan kullanılan MSC'lerin füzyon oranlarını arttırmadığı ve kemik gelişimini inhibe ettiğini bildiren az sayıda çalışma da mevcuttur (116). Çalışmamızda diğer gruplar ile karşılaştırıldığında MSC gruplarında elde edilen daha yüksek füzyon oranları; MSC'lerin skafold ve osteoblastik farklılaşma olmadan da kullanılabileceğini göstermektedir. Literatürde EPO geni ile transfekte edilmiş MSC'lerin lokal EPO salınımı yapmaları sayesinde beyin ve böbrek iskemisi modellerinde daha etkin olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (128, 129). Bu çalışmalar göz önüne alındığında; çalışmamızda skafold ve osteoblastik farklılaşma olmadan kullanılan MSC'lerin etkinliğinin, EPO uygulamasından da kaynaklanabileceği göz önünde bulundurulmalıdır. Bu husus ileride farklı bir çalışma konusu olabilir.

EPO tedavisi ile ilgili literatürdeki ilk çalışmalarda, sitoprotektif etkilerinin suprafizyolojik dozlarda görüldüğü bilgisi nedeniyle 5000 IU/kg/gün (23), 3000 IU/kg/gün (44) gibi dozlar kullanılmıştır. Ancak yüksek doz EPO'nun kan viskozitesini arttırıp tromboembolik komplikasyonlar yaratabileceği ve doku perfüzyonunun bozulabileceğinin bildirilmesi ve çalışılan 350 IU/kg/gün, 500 IU/kg/gün gibi dozların da kırık iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri saptanması nedeniyle uygulanan dozlar düşürülmüştür. Bu nedenle çalışmamızda Garcia ve arkadaşlarının bildirdikleri 500 IU/kg/gün dozunda rhEPO kullanılmıştır (59).

EPO'nun ratlardaki etkinliğinin değerlendirilmemesi çalışmamızdaki diğer bir kısıtlamadır. EPO'nun kırık iyileşmesine olan etkilerini araştıran benzer çalışmalarda iki haftalık aralıklarla tam kan (hemoglobin, hematokrit, platelet ve beyaz küre) ölçümü ve ELISA kitleri kullanılarak plazma rhEPO düzeyleri ölçümü yapılmıştır. Ayrıca bazı çalışmalarda ratlarda rhEPO'ya karşı direnç oluşabildiği ve plazmada anti-rhEPO düzeylerinin ölçülebileceği bildirilmiştir. Ratlarda kan alma işleminin zorluğu, invazif olması, ek stres yaratması, alınabilecek kan miktarının az olması ve çalışmanın mali yükünü arttırması gibi nedenler ile çalışmamızda çalışmamızda bu incelemeler

yapılmamıştır (23, 157). Ancak ileriki çalışmalar için planlanmaktadır. EPO'nun çalışmamızdaki etkinliği indirekt olarak manuel palpasyon sonuçları ve radyolojik histopatolojik inceleme bulguları ile değerlendirilmiştir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 18–20 haftalık, ortalama 253,2±32 gr. ağırlığında 3 adeti MSC üretiminde olmak üzere toplam 80 adet dişi Sprague-Dawley cinsi rat kullanılmıştır. Sadece EPO uygulanan, sadece MSC uygulanan, EPO+MSC kombine olarak uygulanan ana çalışma grupları ve kontrol grupları, erken dönem ve geç dönem füzyon oranlarının karşılaştırılabilmesi ve preoperatif/postoperatif EPO uygulama zamanının etkinliğinin değerlendirilebilmesi amacıyla alt gruplara ayrılıp toplamda 11 gruba ayrılmıştır.

Negatif kontrol grubu hariç tüm gruplara L4-L5 posterior+posterolateral spinal füzyon cerrahisi uygulanmış ve sonuçlar direkt grafi, MDBT, manuel palpasyon ve histopatolojik inceleme yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak:

1. Ratlarda dekortikasyon ile oluşturulan; ek otogreft veya allogreftin kullanılmadığı posterior+posterolateral lomber spinal füzyon modelinde, **500 IU/kg/gün dozunda intraperitoneal EPO uygulamasının** kontrol grupları ile karşılaştırıldığında **kıkırdak ve kemik doku gelişimini geciktirerek füzyon oranlarını olumsuz etkilediği değerlendirilmiştir.**

2. Ratlarda dekortikasyon ile oluşturulan; ek otogreft veya allogreftin kullanılmadığı posterior+posterolateral lomber spinal füzyon modelinde, **osteoblastik farklılaşmaya uğratılmamış yaklaşık bir milyon adet MSC'nin skafold olmadan cerrahi bölgesine uygulanmasının** kontrol ve EPO grupları ile karşılaştırıldığında **füzyon oranlarını arttırdığı değerlendirilmiştir.**

3. Ratlarda dekortikasyon ile oluşturulan; ek otogreft veya allogreftin kullanılmadığı posterior+posterolateral lomber spinal füzyon modelinde, osteoblastik farklılaşmaya uğratılmamış yaklaşık bir milyon adet **MSC'nin** skafold olmadan cerrahi bölgesine uygulanması ve 500

IU/kg/gün dozunda intraperitoneal EPO uygulaması **kombinasyonunun kontrol, EPO ve MSC grupları ile karşılaştırıldığında füzyon oranlarını daha fazla arttırdığı değerlendirilmiştir.**

4. Preoperatif 24. saat ve postoperatif 72. saat EPO uygulaması açısından gruplar arasında anlamlı fark saptanamamıştır.

Çalışmamızın ayırt edici özellikleri olan:

- Ratlarda spinal füzyonda EPO ve MSC'lerin birlikte kullanımı
- Ratlarda spinal füzyonun değerlendirilmesinde Lenke ve arkadaşlarından modifiye edilen radyolojik inceleme kriterleri (Bkz. Tablo 3.5.),
- Ratlarda spinal füzyonun değerlendirilmesinde 320 dedektör sıralı MDBT'nin kullanılması,
- 320 dedektör sıralı MDBT'den elde edilen verilerin Mimics Innovation Suite® programı ile rekonstrükte edilmesi ve değerlendirilmesi

literatürde bilindiği kadarıyla ilk defa bildirilmekte olup ilerideki benzer çalışmalarda kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Bawa M, Schimizzi AL, Leek B, Bono CM, Massie JB, Macias B, et al. Paraspinal muscle vasculature contributes to posterolateral spinal fusion. *Spine*. 2006;31(8):891-6.
2. Albee FH. Transplantation of a portion of the tibia into the spine for Pott's disease: a preliminary report 1911. *Clinical orthopaedics and related research*. 2007;460:14-6.
3. Hibbs RA. An operation for progressive spinal deformities: a preliminary report of three cases from the service of the orthopaedic hospital. 1911. *Clinical orthopaedics and related research*. 2007;460:17-20.
4. Hibbs RA. A report of fifty-nine cases of scoliosis treated by the fusion operation. By Russell A. Hibbs, 1924. *Clinical orthopaedics and related research*. 1988(229):4-19.
5. Goldstein LA. The surgical treatment of idiopathic scoliosis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1973(93):131-57.
6. Öke MK. Mal de Pott, traite par l'operation D'albee. *Gazette Medicale d'Orient*. 1925(70):996.
7. Şenol Ö. Posterior Lomber Stabilizasyon Ve Füzyon Operasyonu Uygulanan Hastalarda Postoperatif Dönemde Komşu Segmentte Dejenerasyon Ve İnstabilitenin Araştırılması - Tıpta Uzmanlık Tezi: T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Ruh ve Sinir Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi I. Nöroşirürji Kliniği; 2005.
8. Burhaneddin. Spodiylitte opereee par la methode D'albee. *Gazette Medicae d'Orient*. 1926(71):1118.
9. Onaran S. Kahillerde Mal de pott'un tedavisi. *Türk Tıp Cemiyeti Mecmuası*. 1942(8; 178-19).

10. Veli L. Posterior spinal fusion'un omurga tüberkülozu tedavisindeki yeri. *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica*. 1974;VIII; 295-305.
11. Ege R. Füzyon ameliyatı yaparak tedavi ettiğimiz 74 vertebra tüberkülozuna ait özellikler. *Tüberküloz ve Toraks Mecmuası* 1962;10; 19-30.
12. Ege R. vertebra füzyon ameliyatı (artrodez) ve teknik hususiyetleri. *Gülhane Askeri Tıp Akademisi Bülteni* 1962;VII, 1-2; 19-38.
13. Ege R. Füzyon yaparak tedavi ettiğimiz 87 vertebra tüberkülozu. 17. Milli Türk Tıp Kongresi; 802-812.
14. Ege R. vertebra füzyon ameliyatı ve kullandığımız metodun özellikleri 17. Milli Türk Tıp Kongresi; 791-801.
15. Ege R. vertebra tüberkülozu tedavisi ve tedavide füzyon ameliyatlarının değeri. *Dirim* 1962;37; 230-239.
16. Ege R. Çocuk vertebra tüberkülozunda füzyon ameliyatlarının değeri. *Pediatrici*. 1962;5; 33-43.
17. Ege R. Kliniğimizde tatbik edilen basitleştirilmiş Albee modifikasyonu *Deniz Tıp Bülteni* 1960;6; 34-39.
18. Mehta KRCaS. *Orthopaedic Key Review Concepts: Lippincott Williams & Wilkins*; 2008
19. Taichman RS. Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*. 2005;105(7):2631-9.
20. Jay R. Lieberman GEF. *Bone Regeneration and Repair - Biology and Clinical Applications*.
21. S. Terry Canale JHB. *Campbell's Operative Orthopaedics*. 11 ed: Mosby, Elsevier's Health Sciences 2007.

22. Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, et al. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2005;20(11):2028-35.
23. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, Meier C, Culemann U, Wirbel RJ, et al. Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life sciences*. 2007;80(10):893-900.
24. Peterson B, Whang PG, Iglesias R, Wang JC, Lieberman JR. Osteoinductivity of commercially available demineralized bone matrix. Preparations in a spine fusion model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004;86-A(10):2243-50.
25. Miyazaki M, Sugiyama O, Zou J, Yoon SH, Wei F, Morishita Y, et al. Comparison of lentiviral and adenoviral gene therapy for spinal fusion in rats. *Spine*. 2008;33(13):1410-7.
26. Biology of erythropoietin.
27. Lacombe C, Mayeux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica*. 1998;83(8):724-32.
28. Bahlmann FH, de Groot K, Haller H, Fliser D. Erythropoietin: is it more than correcting anaemia? *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*. 2004;19(1):20-2.
29. Observations on the nature of the erythropoietic serum factor.
30. Erslev AJ, Laviertes PH. Observations on the nature of the erythropoietic serum factor. *Blood*. 1954;9(11):1055-61.

31. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry*. 1977;252(15):5558-64.
32. Jacobs K, Shoemaker C, Rudersdorf R, Neill SD, Kaufman RJ, Mufson A, et al. Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature*. 1985;313(6005):806-10.
33. Jelkmann W. Molecular biology of erythropoietin. *Internal medicine (Tokyo, Japan)*. 2004;43(8):649-59.
34. Eschbach JW, Abdulhadi MH, Browne JK, Delano BG, Downing MR, Egrie JC, et al. Recombinant human erythropoietin in anemic patients with end-stage renal disease. Results of a phase III multicenter clinical trial. *Annals of internal medicine*. 1989;111(12):992-1000.
35. Collins AJ, Ma JZ, Xia A, Ebben J. Trends in anemia treatment with erythropoietin usage and patient outcomes. *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation*. 1998;32(6 Suppl 4):S133-41.
36. McGee SJ, Havens AM, Shiozawa Y, Jung Y, Taichman RS. Effects of erythropoietin on the bone microenvironment. *Growth factors*. 2012;30(1):22-8.
37. Mayeux P, Billat C, Jacquot R. The erythropoietin receptor of rat erythroid progenitor lens. Characterization and affinity cross-linkage. *The Journal of biological chemistry*. 1987;262(29):13985-90.
38. Savino R, Ciliberto G. A paradigm shift for erythropoietin: no longer a specialized growth factor, but rather an all-purpose tissue-protective agent. *Cell death and differentiation*. 2004;11 Suppl 1:S2-4.
39. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M, et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. 2004;101(41):14907-12.

40. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(19):10526-31.
41. Grasso G. Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. *Journal of neurosurgical sciences*. 2001;45(1):7-14.
42. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *The American journal of physiology*. 1997;273(6 Pt 2):R1829-44.
43. Masuda S, Nagao M, Sasaki R. Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *International journal of hematology*. 1999;70(1):1-6.
44. Bahcekapili N, Akgun-Dar K, Albeniz I, Kapucu A, Kandil A, Yagiz O, et al. Erythropoietin pretreatment suppresses seizures and prevents the increase in inflammatory mediators during pentylenetetrazole-induced generalized seizures. *The International journal of neuroscience*. 2014.
45. Tsai PT, Ohab JJ, Kertesz N, Groszer M, Matter C, Gao J, et al. A critical role of erythropoietin receptor in neurogenesis and post-stroke recovery. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2006;26(4):1269-74.
46. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*. 2002;8(8):495-505.
47. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived

endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nature medicine*. 1999;5(4):434-8.

48. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, et al. Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(20):11612-7.
49. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103(3):921-6.
50. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, et al. A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *The Journal of clinical investigation*. 2003;112(7):999-1007.
51. Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, et al. Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(8):4802-6.
52. Ben-Dor I, Hardy B, Fuchs S, Kaganovsky E, Kadmon E, Sagie A, et al. Repeated low-dose of erythropoietin is associated with improved left ventricular function in rat acute myocardial infarction model. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2007;21(5):339-46.
53. Moon C, Krawczyk M, Lakatta EG, Talan MI. Therapeutic effectiveness of a single vs multiple doses of erythropoietin after experimental myocardial infarction in rats. *Cardiovascular drugs and therapy / sponsored by the International Society of Cardiovascular Pharmacotherapy*. 2006;20(4):245-51.

54. Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM, Wu H. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Developmental biology*. 2004;276(1):101-10.
55. Sayan H, Ozacmak VH, Guven A, Aktas RG, Ozacmak ID. Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2006;19(3):163-73.
56. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A, et al. Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock*. 2004;22(2):169-73.
57. Ilizarov GA, Chepelenko TA, Izotova SP, Kochetkov Iu S. [Effect of acute blood loss on stromal regulation of hematopoietic stem cells and reparative bone regeneration]. *Patologicheskaiia fiziologiiia i eksperimental'naia terapiia*. 1986(5):54-8.
58. Shiozawa Y, Jung Y, Ziegler AM, Pedersen EA, Wang J, Wang Z, et al. Erythropoietin couples hematopoiesis with bone formation. *PloS one*. 2010;5(5):e10853.
59. Garcia P, Speidel V, Scheuer C, Laschke MW, Holstein JH, Histing T, et al. Low dose erythropoietin stimulates bone healing in mice. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(2):165-72.
60. Mihmanli A, Dolanmaz D, Avunduk MC, Erdemli E. Effects of recombinant human erythropoietin on mandibular distraction osteogenesis. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2009;67(11):2337-43.

61. Lee MY, Fukunaga R, Lee TJ, Lottsfeldt JL, Nagata S. Bone modulation in sustained hematopoietic stimulation in mice. *Blood*. 1991;77(10):2135-41.
62. Reikeras O, Wang JE, Foster SJ, Utvag SE. Staphylococcus aureus peptidoglycan impairs fracture healing: an experimental study in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2007;25(2):262-6.
63. Yamaguchi T, Takada Y, Maruyama K, Shimoda K, Arai Y, Nango N, et al. Fra-1/AP-1 impairs inflammatory responses and chondrogenesis in fracture healing. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2009;24(12):2056-65.
64. Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB, Buchmann S. Application of stem cells in orthopedics. *Stem cells international*. 2012;2012:394962.
65. Levesque JP, Hendy J, Winkler IG, Takamatsu Y, Simmons PJ. Granulocyte colony-stimulating factor induces the release in the bone marrow of proteases that cleave c-KIT receptor (CD117) from the surface of hematopoietic progenitor cells. *Experimental hematology*. 2003;31(2):109-17.
66. Petit I, Szyper-Kravitz M, Nagler A, Lahav M, Peled A, Habler L, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nature immunology*. 2002;3(7):687-94.
67. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review. *International orthopaedics*. 2013;37(12):2491-8.
68. Chen FH, Tuan RS. Mesenchymal stem cells in arthritic diseases. *Arthritis research & therapy*. 2008;10(5):223.

69. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology*. 2003;31(10):890-6.
70. Kotobuki N, Hirose M, Takakura Y, Ohgushi H. Cultured autologous human cells for hard tissue regeneration: preparation and characterization of mesenchymal stem cells from bone marrow. *Artificial organs*. 2004;28(1):33-9.
71. Nevruz O, Avcu F, Ural AU, Pekel A, Dirican B, Safali M, et al. Immunosuppressive effects of multipotent mesenchymal stromal cells on graft-versus-host disease in rats following allogeneic bone marrow transplantation. *Turkish journal of haematology : official journal of Turkish Society of Haematology*. 2013;30(3):256-62.
72. Ringden O, Uzunel M, Rasmusson I, Remberger M, Sundberg B, Lonnies H, et al. Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 2006;81(10):1390-7.
73. Kanitkar M, Tailor HD, Khan WS. The use of growth factors and mesenchymal stem cells in orthopaedics. *The open orthopaedics journal*. 2011;5 Suppl 2:271-5.
74. Bahney CS, Miclau T. Therapeutic potential of stem cells in orthopedics. *Indian journal of orthopaedics*. 2012;46(1):4-9.
75. Seong JM, Kim BC, Park JH, Kwon IK, Mantalaris A, Hwang YS. Stem cells in bone tissue engineering. *Biomedical materials*. 2010;5(6):062001.
76. Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Spagnoli A. Role of mesenchymal stem cells in regenerative medicine: application to bone

- and cartilage repair. Expert opinion on biological therapy. 2008;8(3):255-68.
77. Mahmut Kömürcü HÖ. Mezenkimal Kök Hücre Ve Ortopedide Kullanımı. TOTBİD (Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği) Dergisi. 2006;5(3-4):130-9.
 78. Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. Fibrogenesis & tissue repair. 2011;4:20.
 79. Tae SK, Lee SH, Park JS, Im GI. Mesenchymal stem cells for tissue engineering and regenerative medicine. Biomedical materials. 2006;1(2):63-71.
 80. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. Bone. 2006;39(4):678-83.
 81. Arinzeh TL. Mesenchymal stem cells for bone repair: preclinical studies and potential orthopedic applications. Foot and ankle clinics. 2005;10(4):651-65, viii.
 82. Gao C, Seuntjens J, Kaufman GN, Tran-Khanh N, Butler A, Li A, et al. Mesenchymal stem cell transplantation to promote bone healing. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 2012;30(8):1183-9.
 83. Richards M, Huibregtse BA, Caplan AI, Goulet JA, Goldstein SA. Marrow-derived progenitor cell injections enhance new bone formation during distraction. Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society. 1999;17(6):900-8.
 84. Abdallah BM, Kassem M. Human mesenchymal stem cells: from basic biology to clinical applications. Gene therapy. 2008;15(2):109-16.

85. Ali U, Ural AS, Belgin Can, Ferit Avcu, Tarik Cavusoglu, Ersin Canpolat. Repair of Cartilage Defects by Using In Vitro Differentiated Mesenchymal Stem Cells In Vivo: Experimental Study in Rabbits. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)* 2005.
86. Ueno M, Urabe K, Naruse K, Uchida K, Minehara H, Yamamoto T, et al. Influence of internal fixator stiffness on murine fracture healing: two types of fracture healing lead to two distinct cellular events and FGF-2 expressions. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*. 2011;60(1):79-87.
87. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, et al. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nature medicine*. 1999;5(3):309-13.
88. Horwitz EM, Prockop DJ, Gordon PL, Koo WW, Fitzpatrick LA, Neel MD, et al. Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*. 2001;97(5):1227-31.
89. Pereira RF, O'Hara MD, Laptev AV, Halford KW, Pollard MD, Class R, et al. Marrow stromal cells as a source of progenitor cells for nonhematopoietic tissues in transgenic mice with a phenotype of osteogenesis imperfecta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(3):1142-7.
90. Connolly JF, Guse R, Tiedeman J, Dehne R. Autologous marrow injection as a substitute for operative grafting of tibial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*. 1991(266):259-70.
91. Garg NK, Gaur S, Sharma S. Percutaneous autogenous bone marrow grafting in 20 cases of ununited fracture. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1993;64(6):671-2.

92. Kettunen J, Makela EA, Turunen V, Suomalainen O, Partanen K. Percutaneous bone grafting in the treatment of the delayed union and non-union of tibial fractures. *Injury*. 2002;33(3):239-45.
93. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2005;87(7):1430-7.
94. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury*. 2005;36(1):203-6.
95. Ural AU DB, Avcu F, Yurttaş Y, Canpolat E, Can B,, Serdar M SM. Allojenik mezenkimal kök hücrelerin tavşan tibial segmentel kemik defekti tamirinde kullanımı. *Turkish Journal of Hematology*.21(3):48.
96. Hernigou P, Beaujean F. Treatment of osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Clinical orthopaedics and related research*. 2002(405):14-23.
97. Gangji V, Hauzeur JP, Matos C, De Maertelaer V, Toungouz M, Lambermont M. Treatment of osteonecrosis of the femoral head with implantation of autologous bone-marrow cells. A pilot study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004;86-a(6):1153-60.
98. Hernigou P, Poignard A, Zilber S, Rouard H. Cell therapy of hip osteonecrosis with autologous bone marrow grafting. *Indian journal of orthopaedics*. 2009;43(1):40-5.
99. Salama R, Weissman SL. The clinical use of combined xenografts of bone and autologous red marrow. A preliminary report. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1978;60(1):111-5.

100. Jager M, Jelinek EM, Wess KM, Scharfstadt A, Jacobson M, Kevy SV, et al. Bone marrow concentrate: a novel strategy for bone defect treatment. *Current stem cell research & therapy*. 2009;4(1):34-43.
101. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue engineering*. 2007;13(5):947-55.
102. Wright JG, Yandow S, Donaldson S, Marley L. A randomized clinical trial comparing intralesional bone marrow and steroid injections for simple bone cysts. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2008;90(4):722-30.
103. Park IH, Micic ID, Jeon IH. A study of 23 unicameral bone cysts of the calcaneus: open chip allogeneic bone graft versus percutaneous injection of bone powder with autogenous bone marrow. *Foot & ankle international / American Orthopaedic Foot and Ankle Society [and] Swiss Foot and Ankle Society*. 2008;29(2):164-70.
104. Zamzam MM, Abak AA, Bakarman KA, Al-Jassir FF, Khoshhal KI, Zamzami MM. Efficacy of aspiration and autogenous bone marrow injection in the treatment of simple bone cysts. *International orthopaedics*. 2009;33(5):1353-8.
105. Giannini S, Buda R, Vannini F, Cavallo M, Grigolo B. One-step bone marrow-derived cell transplantation in talar osteochondral lesions. *Clinical orthopaedics and related research*. 2009;467(12):3307-20.
106. Dallari D, Savarino L, Stagni C, Cenni E, Cenacchi A, Fornasari PM, et al. Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2007;89(11):2413-20.

107. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture-expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *Journal of pediatric orthopedics*. 2009;29(6):643-9.
108. Huang JW, Lin SS, Chen LH, Liu SJ, Niu CC, Yuan LJ, et al. The use of fluorescence-labeled mesenchymal stem cells in poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite/collagen hybrid graft as a bone substitute for posterolateral spinal fusion. *The Journal of trauma*. 2011;70(6):1495-502.
109. Miyazaki M, Zuk PA, Zou J, Yoon SH, Wei F, Morishita Y, et al. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose tissue and bone marrow for ex vivo gene therapy in rat spinal fusion model. *Spine*. 2008;33(8):863-9.
110. Peterson B, Iglesias R, Zhang J, Wang JC, Lieberman JR. Genetically modified human derived bone marrow cells for posterolateral lumbar spine fusion in athymic rats: beyond conventional autologous bone grafting. *Spine*. 2005;30(3):283-9; discussion 9-90.
111. Bensaïd W, Triffitt JT, Blanchat C, Oudina K, Sedel L, Petite H. A biodegradable fibrin scaffold for mesenchymal stem cell transplantation. *Biomaterials*. 2003;24(14):2497-502.
112. Fu TS, Ueng SW, Tsai TT, Chen LH, Lin SS, Chen WJ. Effect of hyperbaric oxygen on mesenchymal stem cells for lumbar fusion in vivo. *BMC musculoskeletal disorders*. 2010;11:52.
113. Nakajima T, Iizuka H, Tsutsumi S, Kayakabe M, Takagishi K. Evaluation of posterolateral spinal fusion using mesenchymal stem cells: differences with or without osteogenic differentiation. *Spine*. 2007;32(22):2432-6.

114. Cinotti G, Patti AM, Vulcano A, Della Rocca C, Polveroni G, Giannicola G, et al. Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2004;86(1):135-42.
115. Blanco JF, Sanchez-Guijo FM, Carrancio S, Muntion S, Garcia-Brinon J, del Canizo MC. Titanium and tantalum as mesenchymal stem cell scaffolds for spinal fusion: an in vitro comparative study. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2011;20 Suppl 3:353-60.
116. Urrutia J, Mery P, Martinez R, Pizarro F, Apablaza D, Mardones R. Cultured autologous bone marrow stem cells inhibit bony fusion in a rabbit model of posterolateral lumbar fusion with autologous bone graft. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia*. 2010;17(4):481-5.
117. Salamon ML, Althausen PL, Gupta MC, Laubach J. The effects of BMP-7 in a rat posterolateral intertransverse process fusion model. *Journal of spinal disorders & techniques*. 2003;16(1):90-5.
118. Ohyama T, Kubo Y, Iwata H, Taki W. Beta-tricalcium phosphate combined with recombinant human bone morphogenetic protein-2: a substitute for autograft, used for packing interbody fusion cages in the canine lumbar spine. *Neurologia medico-chirurgica*. 2004;44(5):234-40; discussion 41.
119. Grauer JN, Patel TC, Erulkar JS, Troiano NW, Panjabi MM, Friedlaender GE. 2000 Young Investigator Research Award winner. Evaluation of OP-1 as a graft substitute for intertransverse process lumbar fusion. *Spine*. 2001;26(2):127-33.
120. Alanay A, Chen C, Lee S, Murray SS, Brochmann EJ, Miyazaki M, et al. The adjunctive effect of a binding peptide on bone morphogenetic

- protein enhanced bone healing in a rodent model of spinal fusion. *Spine*. 2008;33(16):1709-13.
121. Cheng JC, Guo X, Law LP, Lee KM, Chow DH, Rosier R. How does recombinant human bone morphogenetic protein-4 enhance posterior spinal fusion? *Spine*. 2002;27(5):467-74.
 122. Hong D, Chen HX, Ge R, Li JC. Genetically engineered mesenchymal stem cells: The ongoing research for bone tissue engineering. *Anatomical record*. 2010;293(3):531-7.
 123. Wang JC, Kanim LE, Yoo S, Campbell PA, Berk AJ, Lieberman JR. Effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone marrow cells on spinal fusion in rats. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2003;85-a(5):905-11.
 124. Zhu W, Rawlins BA, Boachie-Adjei O, Myers ER, Arimizu J, Choi E, et al. Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2004;19(12):2021-32.
 125. Hou X, Wu X, Ma J, Lv X, Jin X. Erythropoietin augments the efficacy of therapeutic angiogenesis induced by allogenic bone marrow stromal cells in a rat model of limb ischemia. *Molecular biology reports*. 2010;37(3):1467-75.
 126. Santhanam AV, d'Uscio LV, Peterson TE, Katusic ZS. Activation of endothelial nitric oxide synthase is critical for erythropoietin-induced mobilization of progenitor cells. *Peptides*. 2008;29(8):1451-5.
 127. Heeschen C, Aicher A, Lehmann R, Fichtlscherer S, Vasa M, Urbich C, et al. Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization. *Blood*. 2003;102(4):1340-6.

128. Scheibe F, Gladow N, Mergenthaler P, Tucker AH, Meisel A, Prockop DJ, et al. Nonviral gene delivery of erythropoietin by mesenchymal stromal cells. *Gene therapy*. 2012;19(5):550-60.
129. Cho GW, Koh SH, Kim MH, Yoo AR, Noh MY, Oh S, et al. The neuroprotective effect of erythropoietin-transduced human mesenchymal stromal cells in an animal model of ischemic stroke. *Brain research*. 2010;1353:1-13.
130. Esneault E, Pacary E, Eddi D, Freret T, Tixier E, Toutain J, et al. Combined therapeutic strategy using erythropoietin and mesenchymal stem cells potentiates neurogenesis after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(9):1552-63.
131. Danielyan L, Schafer R, Schulz A, Ladewig T, Lourhmati A, Buadze M, et al. Survival, neuron-like differentiation and functionality of mesenchymal stem cells in neurotoxic environment: the critical role of erythropoietin. *Cell death and differentiation*. 2009;16(12):1599-614.
132. Drespe IH, Polzhofer GK, Turner AS, Grauer JN. Animal models for spinal fusion. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2005;5(6 Suppl):209s-16s.
133. Poelstraa KA, Austina L, Zaslavskya J, Whanga PG, Patela AA. Animal models of spine fusion and low back pain. *Current Opinion in Orthopaedics*. 2006;17:214–21.
134. Schimandle JH, Boden SD. Spine update. Animal use in spinal research. *Spine*. 1994;19(21):2474-7.
135. Dimar JR, 2nd, Ante WA, Zhang YP, Glassman SD. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on posterior spinal fusions in the rat. *Spine*. 1996;21(16):1870-6.

136. Thomas I, Kirkaldy-Willis WH, Singh S, Paine KW. Experimental spinal fusion in guinea pigs and dogs: the effect of immobilization. *Clinical orthopaedics and related research*. 1975(112):363-75.
137. Palumbo M, Valdes M, Robertson A, Sheikh S, Lucas P. Posterolateral intertransverse lumbar arthrodesis in the New Zealand White rabbit model: I. Surgical anatomy. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2004;4(3):287-92.
138. Glazer PA, Heilmann MR, Lotz JC, Bradford DS. Use of electromagnetic fields in a spinal fusion. A rabbit model. *Spine*. 1997;22(20):2351-6.
139. Glazer PA, Heilmann MR, Lotz JC, Bradford DS. Use of ultrasound in spinal arthrodesis. A rabbit model. *Spine*. 1998;23(10):1142-8.
140. van Dijk M, Smit TH, Burger EH, Wuisman PI. Bioabsorbable poly-L-lactic acid cages for lumbar interbody fusion: three-year follow-up radiographic, histologic, and histomorphometric analysis in goats. *Spine*. 2002;27(23):2706-14.
141. Kim DH, Jahng TA, Fu TS, Zhang HY, Novak SA. Evaluation of HealosMP52 osteoinductive bone graft for instrumented lumbar intertransverse process fusion in sheep. *Spine*. 2004;29(24):2800-8.
142. Hecht BP, Fischgrund JS, Herkowitz HN, Penman L, Toth JM, Shirkhoda A. The use of recombinant human bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2) to promote spinal fusion in a nonhuman primate anterior interbody fusion model. *Spine*. 1999;24(7):629-36.
143. Patel TC, Erulkar JS, Grauer JN, Troiano NW, Panjabi MM, Friedlaender GE. Osteogenic protein-1 overcomes the inhibitory effect of nicotine on posterolateral lumbar fusion. *Spine*. 2001;26(15):1656-61.

144. Long J, Lewis S, Kuklo T, Zhu Y, Riew KD. The effect of cyclooxygenase-2 inhibitors on spinal fusion. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2002;84-a(10):1763-8.
145. Silcox DH, 3rd, Daftari T, Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC, Whitesides TE, Jr. The effect of nicotine on spinal fusion. *Spine*. 1995;20(14):1549-53.
146. Martin GJ, Jr., Boden SD, Titus L. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 overcomes the inhibitory effect of ketorolac, a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID), on posterolateral lumbar intertransverse process spine fusion. *Spine*. 1999;24(21):2188-93; discussion 93-4.
147. Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC. 1995 Volvo Award in basic sciences. The use of an osteoinductive growth factor for lumbar spinal fusion. Part II: Study of dose, carrier, and species. *Spine*. 1995;20(24):2633-44.
148. Lenke LG, Bridwell KH, Bullis D, Betz RR, Baldus C, Schoenecker PL. Results of in situ fusion for isthmic spondylolisthesis. *Journal of spinal disorders*. 1992;5(4):433-42.
149. Karaöz E. OE. Kök Hücreler. *ATİ Teknoloji*. 1 ed2004. p. 92-3.
150. Minamide A, Kawakami M, Hashizume H, Sakata R, Yoshida M, Tamaki T. Experimental study of carriers of bone morphogenetic protein used for spinal fusion. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2004;9(2):142-51.
151. Emery SE, Brazinski MS, Koka A, Bensusan JS, Stevenson S. The biological and biomechanical effects of irradiation on anterior spinal bone grafts in a canine model. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1994;76(4):540-8.

152. Wang JC, Alanay A, Mark D, Kanim LE, Campbell PA, Dawson EG, et al. A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society.* 2007;16(8):1233-40.
153. Moazzaz P, Gupta MC, Gilotra MM, Gilotra MN, Maitra S, Theerajunyaporn T, et al. Estrogen-dependent actions of bone morphogenetic protein-7 on spine fusion in rats. *Spine.* 2005;30(15):1706-11.
154. Leung K-S, Qin Y-X, Cheung W-H, Qin L. *A Practical Manual for Musculoskeletal Research.*
155. Deng M, Wang YX, Griffith JF, Lu G, Ahuja AT, Poon WS. Characteristics of rat lumbar vertebral body bone mineral density and differential segmental responses to sex hormone deficiency: a clinical multidetector computed tomography study. *Biomedical and environmental sciences : BES.* 2012;25(6):607-13.
156. Turner RT, Maran A, Lotinun S, Hefferan T, Evans GL, Zhang M, et al. Animal models for osteoporosis. *Reviews in endocrine & metabolic disorders.* 2001;2(1):117-27.
157. Roling JH, Bendtsen M, Jensen J, Stiehler M, Foldager CB, Hellfritsch MB, et al. Erythropoietin augments bone formation in a rabbit posterolateral spinal fusion model. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2012;30(7):1083-8.
158. Lu J, Bhargav D, Wei AQ, Diwan A. Posterolateral intertransverse spinal fusion possible in osteoporotic rats with BMP-7 in a higher dose delivered on a composite carrier. *Spine.* 2008;33(3):242-9.

159. Zhang HY, Wang C, Wu ZH, Yao J, Qiu GX. [Study of rat lumbar vertebral endplate via micro computed tomography]. *Zhonghua yi xue za zhi*. 2013;93(11):852-5.
160. A Novel Hydroxyapatite Fiber Mesh as a Carrier for Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Enhances Bone Union in Rat Posterolateral Fusion Model.
161. Bomback DA, Grauer JN, Lugo R, Troiano N, Patel T, Friedlaender GE. Comparison of posterolateral lumbar fusion rates of Grafton Putty and OP-1 Putty in an athymic rat model. *Spine*. 2004;29(15):1612-7.
162. Fredericks DC, Smucker J, Petersen EB, Bobst JA, Gan JC, Simon BJ, et al. Effects of direct current electrical stimulation on gene expression of osteopromotive factors in a posterolateral spinal fusion model. *Spine*. 2007;32(2):174-81.
163. Grauer JN, Bomback DA, Lugo R, Troiano NW, Patel TC, Friedlaender GE. Posterolateral lumbar fusions in athymic rats: characterization of a model. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2004;4(3):281-6.
164. Valdes M, Palumbo M, Appel AJ, McAllister S, Ehrlich M. Posterolateral intertransverse lumbar arthrodesis in the New Zealand White rabbit model: II. Operative technique. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. 2004;4(3):293-9.
165. Fossum TW. *Small Animal Surgery* 2013.
166. Guo X, Lee KM, Law LP, Chow HK, Rosier R, Cheng CY. Recombinant human bone morphogenetic protein-4 (rhBMP-4) enhanced posterior spinal fusion without decortication. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2002;20(4):740-6.