

# *Post-Fötal Osteogenesise Kırmızı Kemik İliğinin Katkısının Otoradyografik Olarak İncelenmesi*

**Dr. E. Kaya Alpar\***

Kırmızı kemik iliği çeşitli hücreler ihtiva eder ve bu hücreler çevredeki kemik ile aynı kan dolaşımını paylaşır. Kırık iyileşmesi, enfeksiyon, iskemi, osteokondritis ve kemik greflerinin inkorporasyonunda kırmızı kemik iliği yerinde örgü kemik (woven bone) gelişir. Kemik-kırmızı kemik iliği grefleri de insanda gerekse çeşitli deney hayvanlarında iskelet dokusu dışına transplante edilirse neticede kemik dokusu gelişmektedir.<sup>2,5,6,7,9,10,11,12,13,14,15,16</sup>

Yeni gelişen kemik dokusunun hücre kökeni olarak hematopoietik hücreler,<sup>11,15,16</sup> retiküler hücreler,<sup>2</sup> retikuler hücrelere paratiroid hormon etkisi ile<sup>10</sup> ve kemik parçası ihtiva etmeyen kırmızı kemik iliğinin tüm hücrelerinden kemik dokusunun gelişebileceği<sup>9</sup> iddia edilmiştir. Görüldüğü gibi kırmızı kemik iliğinden kemik dokusu meydana gelmekte fakat hücre kökeni konusunda kesin bir görüş birliği bulunmamaktadır. Bu yazıda amacımız Trityumlu Timidin ve trityumlu glisin kullanarak kırmızı kemik iliğinin hücre kökenini saptamak için yaptığımız otoradyografik çalışmaları bildirmektir.

## *Materyel ve Yöntem*

İki ayrı çalışma halinde yapılan bu çalışmada Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Yetiştirme Laboratuvarında üretilen Swiss Albino türü sıçanlar kullanıldı. Deney hayvanlarının yaşı 2-3 ay ve ağırlıkları 140-200 gr arasında idi. Deneyler toplam 120 hayvan üzerinde yapıldı.

\* H. Ü. Tıp Fakültesi, Ortopedi ve Travmatoloji Bilim Dalı Doçenti.

Deney hayvanlarında sol tibia ve fibula digital kompresyon yöntemi ile kırıldı. Kırığı takiben hayvanların bir grubuna Radiochemical Center-Amersham, İngiltere'den getirttiğimiz Trityumlu timidin ( $H^3Tdr$ ) periton içi yol ile zerk edilerek kırık iyileşmesine katkıda bulunacak hücreler iyileşme olayının hemen başında işaretlendi. Trityumlu timidin deney hayvanlarına ağırlıklarının beher gramı için 0.5 microcurie (0.5 uCi x gr x vücut ağırlığı) olarak verildi. Diğer grup hayvanlara ise kırık yapıldıktan hemen sonra yine aynı firmadan getirttiğimiz Trityumlu glisin hayvanların ağırlıklarının beher gramına 1 microcurie (1 uCi x gr x vücut ağırlığı) olarak periton içine zerkedildi. Deney hayvanları bu işlemleri takiben normal gıda rejimi içinde kafeslerinde bakıldılar.

Hergün her grubdan 3 hayvan periton içine nembutal (100 mg : 2 ampul) zerkedilerek öldürüldü. Sol tibia ve fibula diz ekleminden de zartikule edilerek çıkarıldı ve % 10 nötral formalin solüsyonunda 24 saat süre ile tespit edildi. Bunu takiben biyopsi materyeli 4 gün % 10 luk formik asid içinde dekalsifiye edildikten sonra 24 saat süre ile akan musluk suyunda yıkamıp parafin bloklar hazırlandı ve 5 mikron kalınlığında kesilerek lama monte edildi.

Bu işlemleri takiben preparatlar Kodak A.R. 10 Stripping Film (Soyma film) otoradyografi filmlerine sarılıp özel karanlık kutularda 30 gün süre ile buzdolabında 4°C da filmi ışınlamağa bırakıldı. Bu süre sonunda preparatlar Kodak D-19 yüksek kontrast negatif developan ile develope edildi ve 1/3 oranında dilue Ehrlich hemotoksileni ve 0.25 % Eosin ile boyanıp ışık mikroskobu ile incelendi.

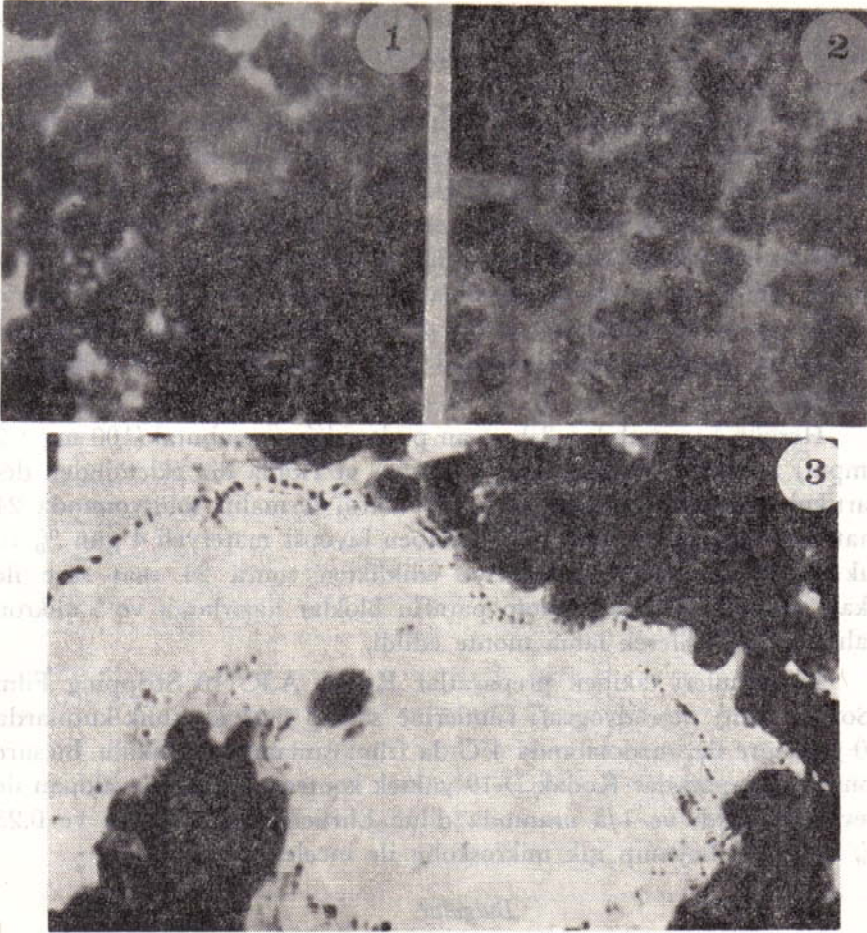
### *Bulgular*

Yirmi gün süre ile ve her gruptan üç hayvandan hazırlanan preparatlar incelendi. Kırmızı kemik iliği bulguları ilk dört güne inhisar ettiğinden yalnız bunlar bildirilecektir.

#### *1- Trityumlu Timidin ile Yapılan Otoradyografi Bulguları:*

Birinci gün sonunda yapılan histolojik incelemede kırık uçlarından belirli bir sınıra kadar kemik iliğinin bulunmadığı fakat bu sınırdan itibaren normal kemik iliği dokusunun mevcut olduğu izlendi. Kemik iliği hücreleri aşırı bir şekilde trityumlu timidin ile işaretlenmiş idi (Şekil 1).

İkinci ve üçüncü günde ise otoradyografik tanecik sayısının daha az olduğu görüldü (Şekil 2). Dördüncü gün ise kırmızı kemik iliği tamamen osteoid doku ile kaplanmıştı. Bu hücrelerin arasında ince, uzun iğ şeklinde hücreler seçilebiliyordu ama morfolojik yapı olarak hücrelerin çeşitliliği ve ortamın karışıklığı kesin bir hücre tanımına imkan vermiyordu.



Şekil 1

Kırmızı kemik iliği hücrelerinin aşırı bir şekilde Trityumlu Timidin ile işaretlenmesi.

Şekil 2

Hücre çekirdeklerinde otoradyografik taneciklerin iyileşme ilerledikçe azalması.

Şekil 3

Kırmızı kemik iliği içinde kollajen sentezi.

Endosteumda ise hiç bir aktivite tespit edilmedi.

#### 2- Trityumlu Glisin ile Yapılan Otoradyografi Bulguları:

Trityumlu glisin ile yapılan çalışmalarda enteresan bir bulgu olarak kırmızı kemik iliği hücrelerinin glisini tutup kollajen salgılamaları idi. Kollajen salgılanması hücre çevresinde olduğu kadar geniş alan kaplayacak şekilde de olduğu görüldü (Şekil 3). Endosteum hücrelerinde trityumlu glisinin tutulup kollajen salgılanmadığı da tespit edildi.

4. günden itibaren kırmızı kemik iliği hücrelerinin ortamdan çekildiği otoradyografik tanecik ihtiva eden kollagen kenarında osteoblastların bulunduğu görüldü. Endosteuma yaklaştıkça hücrelerin osteoblasta farklılaştığı fakat endosteumdan uzaklaştıkça hücrelerin ince, uzun iğ şeklinde oldukları görüldü.

### Tartışma

Kırmızı kemik iliğinden gerek deneysel gerekse klinik uygulamalar sonucu kemik dokusunun geliştiği bilinmektedir. Bu konuda ilk çalışmayı 1867 de Ollier yapmıştır, fakat homoplastic kemik iliği grefleri ile bir netice elde edememiştir.<sup>13</sup> Levander kırmızı kemik iliğini subkutan dokuya gömmüş ve kemik dokusunun geliştiğini izlemiştir.<sup>12</sup> Kendisi kemik dokusunun, ilikte mevcut olduğunu iddia fakat izole edemediği osteojenik bir maddenin çevre mezansimal dokuyu induklemesinden ileri geldiğini belirtmiştir. Pfeiffer kırmızı kemik iliğini tavşanların ön göz kamerasına zerk edilince yeni kemik dokusunun geliştiğini, kemik iliğinin myeloid ve hemopoietik hücrelerin öldüğünü fakat retikuler hücrelerin yaşayarak osteoblastlara farklılaştığını iddia etmiştir.<sup>13</sup> Aynı yazar deney hayvanlarına estrogen hormonunda verdiğiinden retikuler hücrelerinin osteoblasta farklılaşmasında bu hormonun sorumlu olduğunu belirtmiştir. Bloom kuşların yumurta döneminde kırmızı kemik iliğini irise transplante ederek kemik dokusunun geliştiğini göstermiştir.<sup>2</sup> Bu yazar da kemik dokusunun kemik iliğindeki retikuler hücrelerinden geliştiğini belirtmiştir. Burwell kompoze homograft ve antrograft adını verdiği kırmızı kemik ile birleştirip transplante edince homograftın reddedilmediğini ve yeni kemik dokusunun geliştiğini bildirmiştir.<sup>5,7</sup> Bu yazar yeni kemik dokusunun kırmızı kemik iliğinde vaskuler sinisoidleri döşeyen retikuloendotelial (littoral) hücrelerin osteoblasta farklılaşması sonucu geliştiğini belirtmiştir.

Deneylerimizde trityumlu timidin ile yapılan çalışmalarda kırmızı kemik iliğinde bulunan hemopoietik ve myeloid seri hücrelerinin DNA sında işaretlenme olduğu görüldü. Timidin DNA nın prekürsürüdür, DNA içine girmesi hücrenin bölüneceğini gösterir. Hücre bölündüğü zamanda otoradyografik taneciklerin bir yarısı yavru hücreye geçer.<sup>1</sup> Myeloid ve eritroid seri hücrelerinde ikinci ve üçüncü günlerde bölünme ile otoradyografik tanecik azaldığı halde osteoblasta farklılaşma tespit edilmedi.

Kemik iliği bölgesinde gelişen iç kallusun endosteumdan gelişmediği de kesinlikle saptandı. Çünkü endosteum hücrelerinde trityumlu timidinin tutulmaması bu hücrelerin bölünmeğe iştirak etmediğini göstermektedir.

Kırmızı kemik iliği hücreleri arasında ince, uzun iğ şeklinde hücreler görülmüştür. Bu tür hücreler periosta'da tespit edilmiş ve farklılaşma süreci içinde önce osteoblast sonra osteosite dönüştükleri saptanmıştır.<sup>1</sup> Fakat kemik iliği bölgesinin ışık mikroskopik olarak yapısının çok karışık olması bu hücrelerin periosttaki gibi takibine olanak vermemektedir. Öte yandan Bullough tarafından izole edilen ve chalone (kelon) adı verilen mitozu durdurucu maddenin her doku hücresi için ayrı olduğu ve ayrı doku kelonlarının başka bir hücre grubu mitozuna hiç etki etmediği saptanmıştır.<sup>3,4</sup> Bu bulguda bazı hücrelerin morfolojik görünümünün aynı olmasına rağmen belirli yönde farklılaştıklarını desteklemektedir. Kırmızı kemik iliğinin hematopoietik ve myeloid hücreleri yerine kemik yönünde farklılaşacak bir ana hücrenin bulunması daha olağandır.

Eğer kemik iliğinde kemik ana hücreleri bulunmasaydı her türlü kemik iliği grefinden yeni kemik dokusunun gelişmesi beklenirdi. Oysa ki yeni kemik doku yalnız otojen greflerinden sonra görülmekte ve allogreftlerde ise reddedilmektedir. Bu durum yeni teşekkül eden kemiğin konakçıya yabancı olduğundan immunolojik bir reaksiyon yarattığını ve bağ dokusunun induklenmesinden meydana gelmediğini göstermektedir. Daniş'un millipore diffüzyon adacıkları ile yaptığı deneyler bu görüşü desteklemektedir<sup>5</sup>. O halde yalnız kemik hücresine farklılaşan ana hücreleri içinde bulunduran dokuda kemik gelişebilmektedir.

Kollajen sentezinde ancak belirli hücreler tarafından yapılmaktadır. Kırık iyileşmesi sırasında kırmızı kemik iliği içinde de kollajen sentezine rastlanması ilikte bunları sentez edebilecek hücrelerin varlığını göstermektedir.

Sonuç olarak, kırmızı kemik iliğinin post-fötal osteogenesisise katkısı içinde bulunan ve yalnız kemik yönüne farklılaşan kemik ana hücrelerinin sayesinde olabileceği görüşü bu çalışmamızla kuvvet kazanmaktadır.

### Özet

Kırmızı kemik iliğinin post-fötal osteogenesisise katkısı otoradyografik olarak incelenmiş ve kemik iliğinden kemik dokusunun gelişebilmesinin yalnız kemik dokusu yönüne farklılaşan kemik ana hücresi sayesinde olabileceği kanısına varılmıştır.

### Summary

The contribution of red bone marrow to post-foetal osteogenesis was investigated by H<sup>3</sup>-thymidine and H<sup>3</sup>-glycine autoradiography. It is concluded that the development of bone tissue could only occur by virtue of the bone stem cells which are present within the bone marrow.

## KAYNAKLAR

1. Alpar, E. K.: Kırık iyileşmesinde hücre orijini ve diferansiyasyonun trityumlu Timidin Otoradyografisi ile Deneysel Olarak İncelenmesi. Doçentlik Tezi. Ankara, 1975.
2. Bloom, W.: A note on osteogenesis by myeloid reticular cells. *J. Infectious Diseases*, **107**: 11-16, 1960.
3. Bullough, W. S.: The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biological Reviews*, **37**: 307-342, 1962.
4. Bullough, W. S.: Epithelial repair. Chapter 4 in *Repair and Regeneration*. Edited by J. E. Dunphy and W. U. Winkle Jr. 35-46. New York, Mc Graw-Hill Co. 1969.
5. Burwell, R. G.: Studies in transplantation of bone VII. The Fresh Composite Homograft-autograft of cancellous bone. *J. Bone and Joint Surg.*, **46-B**: 110-139. 1964.
6. Burwell, R. G.: Osteogenesis in cancellous bone grafts considered in terms of cellular changes, Basic Mechanisms and the perspective of growth control and It's possible aberrations. *Clin. Orth. and Rel. Research.*, **40**: 35-47, 1969.
7. Burwell, R. G.: The fate of bone grafts. In recent advances in Orthopaedics, Edited by A. G. Apley S. 115-207. London, J. A. Churchill, 1969.
8. Danis, A.: Le Cal de fracture nait de la moelle osseuse directement et Indirectement. *Acta Orth. Belgica*, **39**: 696-707, 1973.
9. Friedenstein, A. Y.: Induction of bone tissue by transitional epithelium *Clin. Orth. Rel. Rcsrch*, **59**: 21-37, 1968.
10. Heller, M., McLean, F. C., Bloom, W.: Cellular transformation in mammalian bones induced by parathyroid extracts. *Amer. J. Anatomy*, **87**: 315, 1950.
11. Holub, K.: The importance of bony constituents in production of blood elements. *Blood*, **13**: 300, 1968.
12. Levander, G.: A study of bone regeneration. *Surg. Gyn. and Obstetrics*, **67**: 705-714, 1938.
13. Pfeiffer, C. A.: Development of bone from transplanted marrow in mice. *Anatomical Records*, **102**: 225-230, 1948.
14. Urist, M. R., McLean, F. C.: Osteogenetic potency and new bone formation by induction in transplants to the anterior chamber of the eye. *J. Bone and Jt. Surg.* **34-A**: 443-476, 1952.
15. Urist, M. R.: Mesencyhmal cell reactions to inductive substrates for new bone formation. Chapter 18 in *Repair and Regeneration*. Edited by J. E. Dunphy and W. Van Winkle 229-259. New York. McGraw-Hill Co. 1969.
16. Urist, M. R.: Bone formation by auto induction. *Science*, **150**: 893, 1969.