



Büyüme çağındaki sıçan kemiğinde tekrarlanan metafizo-diyafizer delmenin büyüme plağı ve eklem kıkırdağı üzerine etkisi

The effect of repeated metaphyso-diaphyseal perforations on the growth plate and articular cartilage of the growing rat femur

Metin Manouchehr Eskandari,¹ Ebru Ballı,² İrfan Ayan,¹ Savaş Aktaş,² Cengiz Yılmaz¹

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi, ¹Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, ²Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Amaç: Büyüyen kemiğin cismi ya da metafizini ilgilendiren uyaranlar, büyüme plağındaki aktiviteyi artırabilir. Bu çalışmada, sıçan femurunun metafizo-diyafizer bölgesinde perkütan tekrarlayıcı delme modeli tanımlandı ve bu uyarının oluşturduğu etkiler değerlendirildi.

Gereç ve yöntem: Çalışmaya büyümesini tamamlamamış 10 adet Sprague-Dawley cinsi erkek sıçan alındı. Sıçanların sağ femur distal metafizo-diyafizer bölgesine, kısa süreli inhalasyon anestezisi altında, üç günde bir olmak üzere toplam 10 kez delme işlemi yapıldı. Deneyler sırasında ölen ya da kırık oluşan dört sıçan değerlendirme dışı bırakıldı. Yaşamları sonlandırılan sıçanların her iki femur ve tibiaları yumuşak dokudan sıyrıldı ve bu kemiklerin uzunlukları ölçüldü. Histolojik çalışmada femur distal ve tibia proksimal büyüme plaklarıyla eklem kıkırdağının kalınlığı mikrometrik olarak ölçüldü. Ayrıca, femurların distal büyüme plağının proliferatif bölgesiyle tam kat eklem kıkırdağının hücre içeriği sayıldı. Bu ölçüm ve sayım sonuçları, kontrol grubu olarak alınan sol alt ekstremitede ölçülen değerlerle karşılaştırılmış t-testi kullanılarak karşılaştırıldı.

Bulgular: Sağ ve sol femur ve tibiaların uzunlukları arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Mikrometrik ölçümde, sağ femurların büyüme plağı ve eklem kıkırdağında belirgin kalınlık artışı saptandı. Büyüme plağı ve eklem kıkırdağında kondrosit sayısında artış ve hipertrofik görünüm saptandı. Eklem kıkırdağındaki hücre sayısı artışı istatistiksel açıdan anlamlıydı.

Sonuç: Çalışmamız, tekrarlayıcı metafizo-diyafizer sınırlı hasarın büyüme plağı ve eklem kıkırdağında kondrojenезisi artırabildiği ve bu artışın işlem yapılan kemikle sınırlı olduğuna dair kanıtlar sunmaktadır.

Anahtar sözcükler: Eklem kıkırdağı; femur/yaralanma; büyüme plağı/sitoloji/metabolizma; biyolojik model; sıçan; tibia/yaralanma; yara iyileşmesi/fizyoloji.

Objectives: The stimulus applied to the diaphysis or metaphysis of the growing bone may lead to increased activity of the growth plate. We described a model of repeated percutaneous metaphyso-diaphyseal perforations of rat femora and evaluated the ensuing effects.

Materials and methods: The study included 10 immature male Sprague-Dawley rats. Distal metaphyso-diaphyseal perforations were performed in the right femora of the rats under short time inhalation anesthesia every three days for a total of 10 times. Four rats were excluded due to death or fracture occurrence. The rats were sacrificed, all femora and tibias were dissected and removed from soft tissue, and their lengths were measured. In histological evaluation, the thickness of the growth plate and articular cartilage of the distal femora and proximal tibias were measured micrometrically. The chondrocyte contents of the proliferative zone of the distal femoral growth plate and articular cartilage were also counted. The findings were compared with corresponding values of the left side as controls using paired t-test.

Results: There were no significant differences between the lengths of the left and right femoral and tibial bones. Significant increases were found in the thickness of the growth plate and articular cartilage of the right femora as well as an increased number of chondrocytes and a hypertrophied appearance. The increase in the cell count of the articular cartilage was statistically significant.

Conclusion: Our data provide evidence that repeated and limited metaphyso-diaphyseal injury is associated with increased chondrogenesis in the growth plate and articular cartilage, which is confined to the injured bone.

Key words: Cartilage, articular; femur/injuries; growth plate/cytology/metabolism; models, biological; rats; tibia/injuries; wound healing/physiology.

• Geliş tarihi: 13.04.2005 Kabul tarihi: 26.05.2005

• İletişim adresi: Dr. Metin Manouchehr Eskandari, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı, Zeytinlibahçe Cad., 33079 Mersin, Tel: 0324 - 327 30 60 Faks: 0324 - 337 43 05 e-posta: eskandari@mersin.edu.tr

• (Eskandari, Ballı, Ayan, Yılmaz) Yrd. Doç. Dr.; (Aktaş) Arş. Gör. Dr.

Kemiklerin uzunlamasına büyümesi, büyüme plağındaki hassas dengeli olaylar zinciriyle gerçekleşir. Aşamaları kıkırdak oluşumu, üretilen kıkırdak ara maddesinin kalsifikasyonu ve kemik oluşumu olan bu süreçte, birçok yerel ve sistemik etken rol oynar; ancak, tüm ayrıntıları henüz bilinmemektedir.^[1,2] Kemiğin metafiz ya da diyafizini ilgilendiren, kırık, osteotomi ve elektrik akımı gibi uyaranların büyüme plağını da etkilediği^[3-5] ve bu etkiyi hücresel bölünmeyi artıran faktörler üzerinden yaptığı bildirilmiştir.^[6,7] Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, metafizo-diyafizer bölgede oluşturduğumuz sınırlı, ancak tekrarlanabilir bir hasar modeliyle büyüme plağını etkilemeyi amaçladık. Bunun için büyüme potansiyeli süren sıçan femurunun metafizo-diyafizer bölgesinin perkütan tekrarlayıcı delme modelini tanımladık, bu uyaranla büyüme plağı ve eklem kıkırdağında oluşan etkileri değerlendirdik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma, kurumumuzun etik kurul izni alındıktan sonra başlatıldı. Araştırmanın tüm aşamaları, Türk Veteriner Hekimliği Medikal Deontoloji Kanunu ve hayvan hakları ile ilgili Helsinki Deklarasyonu'na bağlı kalınarak gerçekleştirildi. Denek olarak, süttten yeni kesilmiş Sprague-Dawley cinsi sıçan seçildi. Bu kemirgenin büyüme süreci, cinsel olgunlukla büyüme plağının kapanmaması dışında, insaninkine benzemektedir. Hayatlarının ilk dört haftası hızlı büyüme, dördüncü- yedinci haftalar arası cinsel olgunluk kazanma ve 12. hafta tam erişkinlik dönemleridir.^[8] Yapılan önçalışmada süttten yeni kesilmiş sıçanların femur distal metafizinin kolaylıkla bulunup, perkütan delinebileceği anlaşıldı. Deney için 10 adet 25 günlük erkek sıçan temin edildi. Sıçanlara, normal beslenme, 20-22 °C sıcaklık ve 12'şer saatlik aydınlık ve karanlık döngüsü sağlanan laboratuvar koşullarında bakıldı. Deneye başlamadan önce, sıçanların yeni koşullara uyum sağlamaları için üç gün beklendi. Deneye başlandığı sırada sıçanların ortalama ağırlıkları 52 gram (dağılım 44-58 gr) idi.

Tekrarlayıcı metafizer delme işlemi, sıçanların sağ femur suprakondiler bölgelerine yapıldı. Delme işlemi öncesinde sıçanlara sevofluran (Sevorane likid, Abbott, İstanbul, Türkiye) ile inhalasyon anestezi uygulandı. Anestezinin yeterliliğine denneğin solunum sayısının azalmasına bakılarak karar verildi. Metafizer delme işlemi, sağ diz suprakondiler

bölgenin lateral tarafından perkütan girilerek, standart 0.8 mm'lik enjektör ucuyla, hem medial hem lateral korteks geçilecek şekilde yapıldı. İşlemden sonra denek, anestezi etkisinden kurtulması ve yürümeye başlaması açısından izlendi. Bu uygulama her üç günde bir olmak üzere toplam 10 kez tekrar edildi. Son delmeden yedi gün sonra (denekler 65 günlük iken) tüm denekler yüksek doz anestezi verilerek, hayvan haklarına uygun şekilde öldürüldü. Deneklerin bu dönemdeki vücut ağırlığı ortalaması 134 gram (dağılım 112-156 gr) idi. Öldürme işleminden sonra her iki alt ekstremitenin femur ve tibia kemikleri yumuşak dokulardan sıyrıldı. Kemiklerin uzunluğu 1 mm aralıklı kumpas kullanılarak ölçüldü. Femur uzunluğu, başın en üst noktasıyla medial kondilin en alt kenarı, tibia ise eminensiyanın en üst noktasıyla medial malleolun en alt noktası referans alınarak ölçüldü.

Kemikler histolojik çalışma için %10'luk formalin çözeltisinde tespit edilerek rutin doku izlem sürecine alındı. Dokular %5'lik nitrik asitle dekalsifiye edildikten sonra parafine gömüldü. Mikrotom ile her kemikten 100'er mikrometrelik eşit aralıklarla koronal kesitler alındı ve toluidin mavisiyle boyandı.

Histolojik değerlendirmede, femurların distal ve tibiaların proksimal büyüme plağıyla eklem kıkırdak kalınlıklarının mikroskopik ölçümü yapıldı. Ayrıca, femurların distal büyüme plağı proliferatif bölgesinin ve tam kat eklem kıkırdağının hücre sayımları yapıldı.

Kemiklerin büyüme plağıyla eklem kıkırdak kalınlıklarının mikroskopik ölçümü için her kemikten eşit aralıklarla 10'ar kesit alındı. Her kesitte $\times 200$ büyütmede oküler mikrometreyle eşit aralıklı 5'er ölçüm (toplamda her kemik için 50'şer ölçüm) yapıldı ve ortalamaları alındı.

Femurların distal büyüme plağı proliferatif bölgesinin ve tam kat eklem kıkırdağının hücre sayımları için, her femurdan eşit aralıklarla alınan üç ayrı kesitte üçer alanın (toplam 9 alan) $\times 200$ 'lük büyütmede mikroskopik görüntüsü elde edildi ve dijital fotoğrafı çekildi. Bu fotoğraflar üzerinde dijital ortamda hücreler işaretlenerek sayıldı ve ortalamaları hesaplandı.

Kemiklerin uzunlukları, histolojik kalınlık ölçümü ve hücre sayım sonuçlarının değerlendirilmesi için, her denneğin sağ alt ekstremitesinde elde edilen değerler, kontrol olarak alınan sol ekstremite

TABLO I

Femur distal ve tibia proksimal büyüme plağı ve eklem kıkırdağlarının mikroskopik yöntemle ölçülen ortalama kalınlıkları

Olgu	Femur distal büyüme plağı kalınlığı (µm)		Femur distali eklem kıkırdağı kalınlığı (µm)		Tibia proksimali büyüme plağı kalınlığı (µm)		Tibia proksimali eklem kıkırdağı kalınlığı (µm)	
	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol	Sağ	Sol
1	287.9	197.4	180.7	103.2	308.9	341.0	156.6	134.9
2	288.2	222.5	103.1	82.1	262.2	268.2	203.1	174.6
3	181.6	129.2	245.0	116.6	173.6	176.4	159.3	120.8
4	228.8	195.1	110.0	92.9	207.2	235.3	139.5	80.7
5	151.4	156.4	148.7	112.3	211.1	233.7	261.6	100.9
6	217.4	171.4	151.1	111.8	166.3	157.1	63.6	147.3
Ort. değer	225.9	178.7	156.4	103.2	221.5	235.3	163.9	126.5

değerleriyle çiftleştirilmiş t-testi kullanılarak karşılaştırıldı; $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edildi. İstatistiksel değerlendirme için ticari bir yazılım (SPSS for Windows, V 9.05) kullanıldı.

BULGULAR

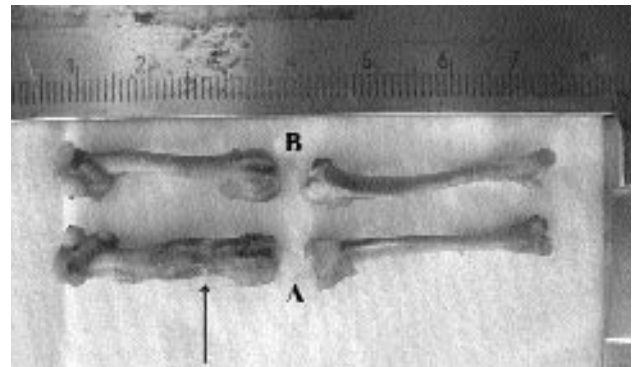
Deneyler süresince anestezi etkisiyle ölen iki sıçan ve delme işlemine bağlı metafizo-diyafizer kırık bulguları bulunan iki sıçan çalışma dışı bırakıldı. Kalan altı deneğin kemiklerinin ölçümünde ortalama uzunluk sağ femurda 29.9 mm (dağılım 28.0-31.0 mm), sol femurda 30.0 mm (28.5-31.5); sağ tibiada 31.5 mm (29-33.5) ve sol tibiada 31.8 mm (29-34.5) bulundu. Delme işleminin yapıldığı femur distal metafizo-diyafizer bölgelerinde kemiğin yapısal genişliğe uğradığı dikkat çekiciydi (Şekil 1). Kemiklerin mikroskopik ölçüm sonuçları Tablo I'de, büyüme plağı ve eklem kıkırdağındaki hücre sayım sonuçları Tablo II'de verildi.

İstatistiksel değerlendirmede, sağ femurlarda büyüme plağı ve eklem kıkırdağı kalınlığı sol tarafa göre anlamlı farklılık göstermekteydi ($p < 0.05$). Femur ve tibiaların uzunluklarıyla tibiaların büyüme plağı ve eklem kıkırdağı kalınlıklarında anlamlı farklılık saptanmadı.

Mikroskopik değerlendirmenin ikinci aşamasında, sağ femurların distal büyüme plağında istatistiksel açıdan anlamlı olmamakla birlikte, hem hipertrofik hem de proliferatif bölgedeki kondrositlerde sayıca artış ve belirgin hipertrofik görünüm saptandı (Şekil 2). Eklem kıkırdağındaki hücrelerin artışın anlamlı olması yanında ($p < 0.05$), kondrositlerde belirgin hipertrofi vardı (Şekil 3). Eklem kıkırdağındaki bu görünüm olgunlaşma sürecinin devam ettiği şeklinde yorumlandı.

TARTIŞMA

İkincil kemikleşme çekirdeğinin oluşmasıyla birlikte, büyüme plağı, uzun kemiklerin kıkırdağ yapıdaki uçlarında şekillenir. Kıkırdağ yapıdaki bu plak, bulundurduğu kondrositlerin farklılaşma evresine göre üç histolojik bölgeye ayrılır. İkincil kemikleşme merkezine en yakın olan istirahat bölgesinin görevi bilinmezken, proliferatif bölge hücreli bölünme ve ara maddenin üretildiği aktif bölümdür. Metafize komşu olan hipertrofik bölge, kondrositlerin kaçınılmaz ölümü ve ara maddenin mineralize olduğu bölgedir. Metafizer bölgede, kıkırdağ yapının mineralize ara maddesi ortadan kalkar, yerine kemik yapı oluşur ve bu kemik yeniden şekillenerek, süngerimsi ve kortikal kemiğin uzunlamasına büyümesini sağlar.^[9,10] Bu süreç, lokal ya da sistemik birçok faktörün etkisi altındadır. Kırıklar ve osteotomiler, lokal faktörler aracılığıyla uzunlamasına büyümeyi artıran uyaranlardır.^[6,7] Sunduğumuz modelde, metafizo-diyafizer delme



Şekil 1. İki numaralı deneğin yumuşak dokudan arındırılmış (a) sağ ve (b) sol femur ve tibia kemiklerinin görünümü. Kemikler arasında uzunluk farkı bulunmazken, sağ femur distal bölgesi sol tarafa göre kalınlaşmış görünmektedir (ok işareti).

TABLO II

Femurların distal büyüme plağı proliferatif bölgesi ile tam kat eklem kıkırdağının 200 büyütmede mikroskobik alan başına düşen ortalama hücre sayıları

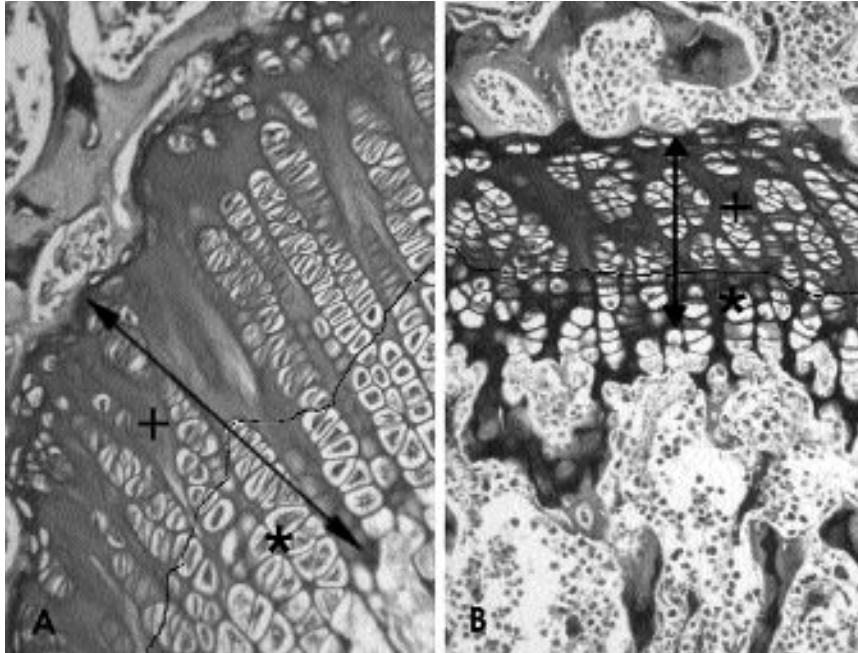
Olgu	Femur distal büyüme plağı (hücre sayısı/mikroskobik alan)		Femur distal eklem kıkırdağı (hücre sayısı/mikroskobik alan)	
	Sağ	Sol	Sağ	Sol
1	286.3	229.6	289.2	167.9
2	261.5	302.0	174.1	151.0
3	204.1	183.4	355.2	235.4
4	320.7	195.4	166.7	169.8
5	204.3	180.8	262.9	202.9
6	190.9	223.2	273.9	212.9
Ort. değer	244.6	219.1	253.7	190.0

ile kontrollü, az invaziv ve tekrarlanabilir bir yöntemle sınırlı lokal hasar oluşturmayı planladık. Varsayımımız, bu hasarın tamiri için açığa çıkan aracı faktörlerin büyüme plağındaki aktiviteyi de artırmasıydı. Delme işlemi sonucu oluşacak olası değişikliklerin işlem yapılan kemiğe özgü olup olmadığını araştırmak için, tibiaların proksimali de değerlendirmeye alındı.

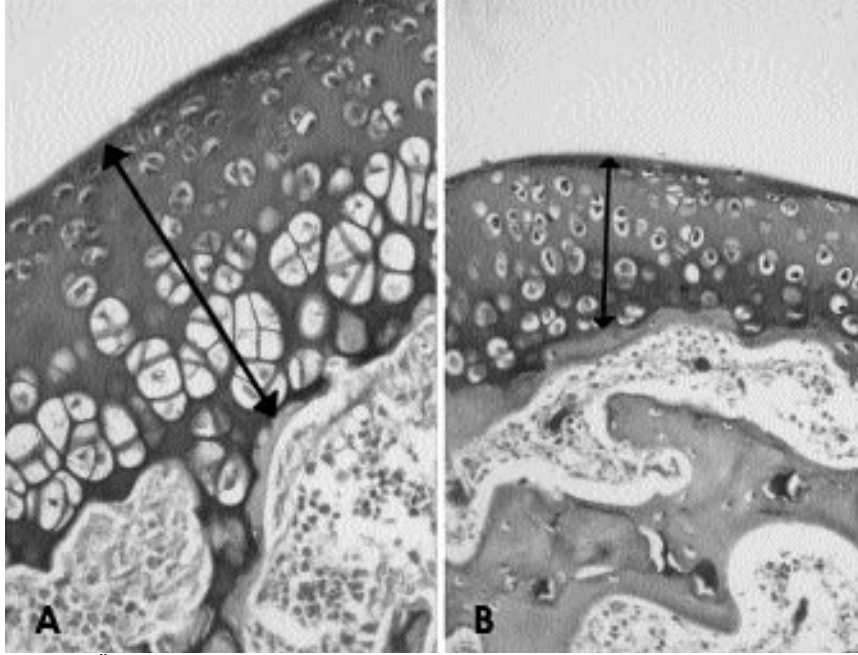
Çalışmamızda büyüme plağı dışında, eklem kıkırdağının etkileşimi de değerlendirildi. Büyüyen

kemikte kıkırdak, eklem yüzü olmanın dışında epifiz çekirdeğinin eklem bakan tarafında endokondral kemikleşme için mikro-epifizer plak görevi de görür.^[11] Bu özellik nedeniyle modelimizde, büyüme plağıyla birlikte kıkırdağın da etkilenebileceğini düşündük ve mikroskobik değerlendirme yaptık.

Çalışmamızdaki modelin belirlenmesinde, İnan ve ark.nın^[12] deneyimi etkili oldu. Bu araştırmacılar çalışmalarında, şaşırtıcı bir sonuç olarak, kontrol



Şekil 2. Dört numaralı deneğin (a) sağ ve (b) sol femur distal büyüme plağının mikroskobik görünümü (Toluidin mavisi, $\times 200$). Sağda büyüme plağında sola göre kalınlık artışı (ok işaretleri) ve proliferatif (artı simgeleri) ile hipertrofik (yıldız simgeleri) bölgelerindeki hücrelerde sayıca artış ve belirgin hipertrofik görünüm dikkat çekmektedir. Proliferatif ve hipertrofik bölgeler ince siyah bir çizgiyle ayrılmıştır.



Şekil 3. Üç numaralı deneğin (a) sağ ve (b) sol femur distal eklem kıkırdağının mikroskopik görünümü (Toluidin mavisi, $\times 200$). Sağda eklem kıkırdağında sola göre kalınlık artışı (ok işaretleri), hücrelerin sayıca artışı ve hipertrofik görünümlü olması dikkat çekmektedir.

amaçlı metafizer delme yapılan, ancak elektrot yerleştirilmeyen tavşan femurunda, elektrik akımı verilen gruptan daha fazla büyüme plağı kalınlaşması ve hücresel artış saptamışlardır. Biz de modelimizde metafizer bölgenin delinmesini esas aldık. Farklı olarak, işlemin belli aralıklarla tekrarlanması ve perkütan yapılmasını planladık. Modelin perkütan yapılması nedeniyle, metafizo-diyafizer olarak tanımlanmasını daha uygun gördük.

Büyüme potansiyeli olan kemiklerin kırılmasıyla uzunlamasına büyümenin arttığı^[3,4,6] ve hasarın daha fazla olduğu kırık^[3] ya da stabilitenin sağlanmadığı osteotomi^[4] olgularında bu büyümenin daha fazla olduğu bildirilmiştir. Kırık ya da osteotominin hasar ve tamir sürecini andıran modelimizde, benzer şekilde büyüme plağı ve eklem kıkırdağındaki aktivitenin arttığına dair bulgular saptadık. Modelimizde her ne kadar stabil olmayan bir kırık oluşumu söz konusu değilse de, hasarın uzunca bir süre tekrarlanmasının belirgin mikroskopik farklılıkların oluşmasıyla sonuçlandığını düşünüyoruz.

Kırıkların, epifiz ve metafiz bölgelerinin kanlanmasını artırarak, büyümenin artmasına neden olduğu yaygın kabul gören bir kanıdır. Ancak, yapılan çalışmalarda, kırık ve hatta mekanik yüklenmenin kondrosit metabolizması ve bölünme hızını

artıran aracı moleküller üzerinden etkili olduğu gösterilmiştir.^[6,7] Kullandığımız değerlendirme yöntemi nedeniyle modelimizin hangi mekanizmayla etkili olduğu hakkında bir fikir öne süremeyiz. Çalışmamızda, sadece sağ femurun hem büyüme plağı hem de eklem kıkırdağı etkilendi; ancak, aynı taraf tibiada belirgin bir değişiklik saptanmadı. Bu sonuç, oluşturduğumuz sınırlı hasarın tek kemiğe sınırlı kalacak şekilde kondrogenезi artırdığını göstermektedir.

Bu çalışmanın ana kısıtlılıkları denek sayısının azlığı ve mikroskopik ölçüm yapılırken, mikroskopik alan içinde büyüme plağı ve eklem kıkırdağı kalınlığının değişiklik göstermesidir. Sözü edilen kısıtlılığın çalışma sonuçları üzerindeki olumsuz etkisini en aza indirmek için, ortalamalar, her kemik için 10'ar kesitte beşer ölçüm (toplam 50'şer ölçüm) yapılarak hesaplanmıştır.

Sonuç olarak, tekrarlanan metafizo-diyafizer perkütan delme, büyüme çağındaki kemiğin büyüme plağı ve eklem kıkırdağındaki kalınlık ve kondrosit hücre artışına yol açmasına karşın, belirgin bir uzunluk farkı oluşturmamaktadır. Bu modelin ışık tuttuğu bir sonraki adım, tek aşamalı, ancak uzun etkili bir metafizer uyarıcıyla selektif kemik uzatma çalışması olabilir.

KAYNAKLAR

1. Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. *J Bone Joint Surg [Am]* 2003;85:715-26.
2. Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, Whelan MC, Schoenfeld D, Doctrow SR. Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth-factor I and basic fibroblast growth factor. *J Bone Joint Surg [Am]* 1993; 75:177-89.
3. Eren OT, Kucukkaya M, Kockesen C, Kabukcuoğlu Y, Kuzgun U. Open reduction and plate fixation of femoral shaft fractures in children aged 4 to 10. *J Pediatr Orthop* 2003;23:190-3.
4. Garces GL, Garcia-Castellano JM, Nogales J. Longitudinal overgrowth of bone after osteotomy in young rats: influence of bone stability. *Calcif Tissue Int* 1997;60: 391-3.
5. Takei N, Akai M. Effect of direct current stimulation on triradiate physeal cartilage. In vivo study in young rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg* 1993;112:159-62.
6. Kaya Alpar E. Growth plate stimulation by diaphyseal fracture. Autoradiography of DNA synthesis in rats. *Acta Orthop Scand* 1986;57:135-7.
7. Lucchinetti E, Bhargava MM, Torzilli PA. The effect of mechanical load on integrin subunits alpha5 and beta1 in chondrocytes from mature and immature cartilage explants. *Cell Tissue Res* 2004;315:385-91.
8. van der Eerden BC, Gevers EF, Lowik CW, Karperien M, Wit JM. Expression of estrogen receptor alpha and beta in the epiphyseal plate of the rat. *Bone* 2002; 30:478-85.
9. Cadet ER, Gafni RI, McCarthy EF, McCray DR, Bacher JD, Barnes KM, et al. Mechanisms responsible for longitudinal growth of the cortex: coalescence of trabecular bone into cortical bone. *J Bone Joint Surg [Am]* 2003;85:1739-48.
10. Johnstone EW, Leane PB, Byers S, Hopwood JJ, Foster BK. Metaphyseal factors promote calcium incorporation in physeal chondrocyte cultures. *J Orthop Sci* 2000;5:593-9.
11. Mankin HJ, Mow VC, Buckwalter JA, Iannotti JP, Ratcliffe A. Articular cartilage structure, composition, and function. In: Buckwalter JA, Einhorn TA, Simon SR, editors. *Orthopaedic basic science, biology and biomechanics of the musculoskeletal system*. 2nd ed. Rosemont, IL: American Academy of Orthopaedic Surgeons; 2000. p. 443-70.
12. İnan M, Gürses İ, Alat Ş, Kekili E, Harma A, Germen B. İntrameduller pulsatil elektrik akımının büyüme plağına etkileri (Deneysel çalışma). In: XVIII. Milli Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi; 18-23 Ekim 2003; İstanbul. Cilt II. İstanbul: Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliğı Derneğı; Kongre kitabı, 2003. s. 11.