

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

RATLARDA KRİTİK BÜYÜKLÜKTEKİ ZİGOMA KEMİK DEFEKTİNDE ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. GAYE TOPLU

DÜZCE – 2012

T.C.
DÜZCE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

RATLARDA KRİTİK BÜYÜKLÜKTEKİ ZİGOMA KEMİK DEFEKTİNDE ADİPOZ DOKU KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİ

Dr. GAYE TOPLU
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı
Prof. Dr. DERYA ÖZÇELİK

DÜZCE – 2012

ÖNSÖZ

Bu tezin kurgusu ve planlaması Prof. Dr. Derya Özçelik'e aittir.

Uzmanlık eğitimi boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, yanında çalışmaktan onur duyduğum ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli hocam Sayın Prof. Dr. Derya Özçelik'e ve asistanlığım süresince daima yanımda olduğunu hissettiğim, çalışma süresince değerli bilgi ve becerilerini esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Cemal Şenyuva'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca, bu çalışmanın hazırlanması sürecinde istatistiksel analizini yapan Sayın Prof. Dr. Handan Ankaralı'ya, radyolojik incelemeleri yapan Sayın Doç. Dr. Ömer Önbaş'a, histopatolojik incelemeleri yapan Sayın Yard. Doç. Dr. Havva Erdem'e, tezin hazırlanması sürecinde düzenlemelerindeki yardımları için sevgili kardeşim Selçuk Göksel Toplu'ya teşekkürlerimi sunarım.

Ekim 2012 Dr. Gaye TOPLU

TÜRKÇE ÖZET

Defektli fasiyal kırıklar klinikte karşımıza sık çıkan sorunlardır. Tedavilerinde çoğunlukla kemik greft ve ya flepleri kullanılmaktadır. Bu da donör alan morbiditesi ve ameliyat süresinin uzamasına neden olmaktadır. Kemik defektlerinin tedavisinde halen en geçerli yöntem kemik greftlerinin kullanımı olmasına rağmen, hücre bazlı stratejilerin önemi de gün geçtikçe artmaktadır. Bu amaçla farklılaşmamış (kök hücre) hücreler kullanılmaktadır. Biz ratlarda zigoma kritik büyüklükteki membranöz kemik defektinde, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik etkisinin olup olmadığını incelemek için bu çalışmayı planladık. Temin edilmesi kolay olan adipoz kökenli kök hücrelerin defekt oluşturulmuş membranöz kemik dokusunda yeni kemik oluşumunu artırıp artırmadığını radyolojik ve histolojik olarak inceleyip, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark olup olmadığını araştırdık.

15 aylıktan büyük 20 adet erkek Wistar-Albino rat kullanılarak, lateral insizyonlar ile sağ ve sol zigomatik arklar ortaya konuldu. Ratların bilateral zigomatik arklarında (40zigoma) standart olarak 3mm kemik defekt oluşturuldu. 1.grupta (deney grubu), inguinal yağ yastıkçığından elde edilen yağ dokusu santrifüj işlemi uygulanarak elde edilen kök hücreden zengin materyal sağ zigomatik ark kemik defektinin bulunduğu alana enjekte edildi, 2. grupta (kontrol grubu) sol zigomatik arkta 3mm'lik kritik kemik defekti oluşturuldu ve sekonder iyileşmeye bırakıldı. Postoperatif 10. ve 20. haftalarda kemik defektlerinin iyileşme alanları 3 boyutlu tomografi ile değerlendirildi ve sonrasında denekler sakrifiye edilerek kemik iyileşmesi histolojik olarak incelendi.

10. haftadaki denek sayısı 5 idi (5 zigoma deney grubunda, 5 zigoma kontrol grubunda), 20. haftadaki denek sayısı 13 idi (13 zigoma deney grubunda, 13 zigoma control grubunda).

Kök hücrelerinin gerekli dokularda başkalaşım geçirerek kemik iyileşme hızını artırması beklenen bir durumdur. Yağ doku da kök hücreden zengin bir

kaynaktır. Kemik defekt modelinde yağ dokudan elde edilen kök hücrelerinin kemik iyileşmesini artırması durumunda, klinikte kemik greft ve fleplerinin kullanımının yerini alabileceği düşünülmektedir.

Bu nedenle kök hüreden zengin yağ dokusunun sıçan zigoma kemik defekt modelinde kemik iyileşmesi üzerine pozitif etkisinin varlığı ve düzeyi incelendi. Çalışmanın sonucunda; 10. haftada çekilen üç boyutlu bilgisayarlı tomografi filmlerinde deney grubunda, 5 zigomanın 1'inde (% 20) kısmi kemik rejenerasyonu (%44.3) gözlendi. Diğer 4'ünde (%80) defekt orjinal halinden (ortalama %37.5) daha genişlemiş olarak ölçüldü. Kontrol grubunda ise, 5 zigomanın hiçbirinde (%0) tam ya da kısmi kemik rejenerasyonu gözlenmedi. Yani tamamında (%100) defekt alanı orijinal ebatından (ortalama %65) daha fazla genişlemişti.

Onuncu hafta deney grubu histolojik incelemede; 5 zigomanın hiçbirinde nekroza rastlanmadı, 5'inde inflamatuar yanıt, 5'inde granülasyon dokusu, 5'inde osteoblastik hücre artışı, 1'inde fibrokondroid hiperplazi, 4'ünde yeni kemik oluşumu (kallus), 5'inde vasküler kanal formasyonu gözlendi. Onuncu hafta kontrol grubu histolojik incelemede; 5 zigomanın hiçbirinde nekroz ve fibrokondroid hiperplaziye rastlanmadı, 3'ünde inflamatuar yanıt, 5'inde granülasyon dokusu, 5'inde osteoblastik hücre artışı, 1'inde yeni kemik oluşumu (kallus), 5'inde vasküler kanal formasyonu gözlendi Yirminci haftada çekilen üç boyutlu BT film sonuçlarında deney grubunda 13 zigomanın 3'ünde (%23) tam kemik rejenerasyonu gözlendi. Deney grubunda iyileşmenin kısmi olduğu gözlenen 6 zigomada defekt; %70, %44, %44, %14, %7, %3.4 oranında kapanmıştı. Diğer 4 zigomada ise defekt genişliği ortalama %59 oranında orjinal defekt genişliğine göre artma göstermişti. Kontrol grubunda 13 zigomanın 1'inde (%7) tam kemik rejenerasyonu gözlendi. Kontrol grubunda iyileşmenin kısmi olduğu gözlenen bir zigomada defekt %70 oranında kapanmıştı. Diğer 11 zigomada ise defekt genişliği %85.1 oranında orijinal defekt genişliğine göre artma göstermişti. Yirminci hafta deney grubu histolojik incelemede; 13 zigomanın 1'inde nekroz, 6'sında inflamatuar yanıt, 11'inde granülasyon dokusu, 13'ünde osteoblastik hücre artışı, 1'inde fibrokondroid

hiperplazi, 8'inde yeni kemik oluşumu (kallus), 12'inde vasküler kanal formasyonu gözlendi. Yirminci hafta kontrol grubu histolojik incelemede ise; 13 zigomanın 3'ünde nekroz, 12'sinde inflamatuar yanıt, 12'inde granülasyon dokusu, 13'ünde osteoblastik hücre artışı, 1'inde fibrokondroid hiperplazi, 1'inde yeni kemik oluşumu (kallus), 13'ünde vasküler kanal formasyonu gözlendi. Yapılan karşılaştırmalar sonucunda 10. haftada sağ (deney grubu) ve sol (kontrol grubu) zigomada ölçülen yeni kemik rejenerasyon miktarları arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın (p=0.317), 20. haftada deney grubunda ölçülen yeni kemik rejenerasyon miktarı istatistik olarak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde daha fazla bulunmuştur (p=0.033). Sonuç olarak yağ doku kökenli kök hücrelerin, osteogenezi potansiyalize edebildiği ve kemik uçlarında nekroz gelişme olasılığını düşürdüğü sonucuna varıldı..

ANAHTAR SÖZCÜKLER

Adipoz, kemik, osteogenez, rat, zigoma

İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)

Facial bone defects are frequently encountered problems in clinical practice. Bone grafts or flaps are often used in their treatment. This leads to donor site morbidity and prolongation of the operation. Despite the best current method in the treatment of bone defects is using bone grafts-flaps, the importance of cell-based strategies is increasing day by day. For this purpose, undifferentiated cells (stem cells) are used. We have planned this study to examine whether adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have osteogenic effect in the critical sized membranous bone defect of the zygoma. For this hypothesis, we examined whether easily-harvested adipose derived stem cells improve the new bone formation in the membranous bone defect. To observe new bone formation radiological and histological studies are performed. Then results are evaluated whether there is a

statistically significant difference regarding new bone formation as compared with the control group.

Used 20 male Wistar-Albino rats that are older than 15 months, the right and left zygomatic arches were opened with lateral incisions. A standard 3-mm bone defect was created bilaterally on the zygomatic arches of the rats (40 zygomas). In the first group (study group), the stem cell-rich material which was obtained by applying centrifugal process to the adipose tissue derived from the inguinal fat pad was injected into the site of the right zygomatic arch bone defect. In the second group as the control group, left zygomatic arch was left to heal secondarily after a 3-mm critical bone defect was created. In the postoperative tenth and twentieth weeks, the healing areas of bone defects were assessed by a three-dimensional tomography, and then, the rats were sacrified and bone healing was examined histologically. At tenth week, number of rats were 5 (5 zygoma in study group, 5 zygoma in control group). At twentieth week, number of rats were 13 (13 zygoma in study group, 13 zygoma in control group).

It is an expected situation that stem cells increase the rate of bone healing by differentiating in certain tissues. Also, fat tissue is a rich source of stem cells. It is predicted that if adipose tissue-derived stem cells can increase bone healing in the bone defect model, this application could replace the use of bone grafts and flaps in clinical practice. For this reason, the presence and the level of positive impact of the stem cell-rich adipose tissue on bone healing in the zygoma bone defect model of rats were examined.

As a result of the study; in study group in the three-dimensional computed tomography films taken 10^{th} week postoperatively, in the one of the five zygomas (%80) partial bone regeneration (%44.3) was observed. In the other four zygomas (%80), defect was measured as more widened (mean, 37.5%) than the original size. In the control group, complete or partial bone regeneration were not observed in any of the 5 zygomas (0%). So, in all of them (100%) the defect area had widened more than the original size (mean, 65%).

In the histological examination 10^{th} week postoperatively in study group; there was no necrosis in any of five zygomas, there was inflammatory response in 5, granulation tissue in 5, osteoblastic cell proliferation in 5, fibrochondroid hyperplasia in 1, new bone formation (callus) in 4 and vascular channel formation in 5 of the zygomas. In the control group, no necrosis and fibrochondroid hyperplasia was observed in any of the zygomas. There was inflammatory response in 3, granulation tissue in 5, osteoblastic proliferation in 5, new bone formation(callus) in 1 and vascular channel formation in 5 of the zygomas.

As a reasult of the three-dimensional CT films taken 20^{th} week postoperatively in the study group, complete bone regeneration was observed in the 3 of 13 zygomas (23%). Partial regeneration of the defect was seen in the 6 zygomas in the study group; the defect was healed 70%, 44%, 44%, 14%, 7% and 3.4%. In the other 4 zygomas, the size of the defect increased %59 compared with the original size. In the control group, complete bone regeneration was observed in 1 of 13 zygomas (7%). In the control group there was a zygomas with partial heal (70%). In the other11 rats, the size of the defect had increased %85.1 compored with the original size.

In the histological examination in the twentieth week of the study group, there was necrosis in 1, inflammatory response in 6, granulation tissue in 11, osteoblastic cell proliferation in 13, fibrochondroid hyperplasia in 1, new bone formation(callus) in 8 and vascular channel formation in 12 of the 13 zygomas. In the control group, there was necrosis in 3, inflammatory response in 12, ganulation tissue in 12, osteoblastic cell proliferation in 13, fibrochondroid hyperplasia in 1, new bone formation(callus) in 1 and vascular channel formation in 13 of the 13 zygomas.

As a result of the comparisons, despite the absence of a statistically significant difference ($p=0.317$) in the amounts of the new bone formation of the right (test group) and left (control group) zygomas in the 10^{th} week, in the 20^{th} week the new bone formation amount of the in the study group was observed as statistically significantly higher ($p=0.033$) than the control group.

As a reasult, it is concluded that adipose tissue-derived stem cells can potentiate osteogenesis and reduces the possibility of developing necrosis on the bone ends.

KEY WORDS
Adipose, bone, osteogenesis, rat, zygoma

İÇİNDEKİLER

Sayfalar

Önsöz i
Özet ii
İngilizce Özet (Abstract) v
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini viii
1. Giriş ve Amaç 1
2. Genel Bilgiler 6
2.1. Embriyoloji ve anatomi 6
2.2. Kemik biyolojisi 7
2.2.1. Kemiğin yapısal özellikleri 7
2.2.2. Periost 9
2.2.3. Kemiğin kan akımı 10
2.2.4. Kemik hücrelerinin morfolojisi 10
2.2.5. Kemik makriks bileşimi 12

2.2.6. Kemik yapımı 12
2.2.7. Kemik mineralizasyonu 15
2.2.8. Modeling-remodeling 15
2.3. Kırık iyileşmesi 16
2.3.1. Kırık iyileşmesi 16
2.3.2. Kırık iyileşmesinde kan akımı 21
2.3.3. Kırık iyileşmesini etkileyen faktörler 21
2.4. Kırık iyileşmesinin uyarılması 22
2.4.1. Biyolojik uyarma 22
2.5. Sıçan kafatası anatomisi 27
2.6. Kritik büyüklükte kemik defekti 28
2.7. Mezenkimal Kök Hücreler 28
2.7.1. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi 30
2.7.2. Mezenkimal kök hücrelerin bağışıklık sistemini baskılayıcı özellikleri 30
2.7.3. Mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamaları 32
2.7.4. Kemik rejenerasyonunda MKH bazlı stratejiler 32
2.8. Kök hücre ve yağ doku kaynaklı kök hücrelerin tanınması 35
2.8.1. Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin plastik cerrahideki yerleri 39
2.9. Adipoz doku 41
3. Gereç ve Yöntem 43
3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Gereçler 44
3.2. Gruplar 45
3.3. Kırık Modeli 45
3.4. Bakım 46
3.5. Ameliyat Tekniği 46
3.5.1. Sıçan mezenkimal kök hücrelerin (sMKH) elde edilmesi 46
3.5.2. Kırık modelinin oluşturulması 54
3.6. Değerlendirmeler 55
3.6.1. Klinik değerlendirme 55
3.6.2. Radyolojik değerlendirme 55

3.6.3. Histolojik değerlendirme 55
3.7. İstatistiksel Analiz 56
4. Bulgular 57
4.1. Klinik Değerlendirme Sonuçları 57
4.2. Radyolojik değerlendirme Sonuçları 59
4.2.1. Onuncu hafta 59
4.2.1. Yirminci hafta 62
4.3. Histolojik Değerlendirme Sonuçları 77
4.3.1. Onuncu hafta 77
4.3.2. Yirminci hafta 81
5. Tartışma 89
6. Sonuç 97
7. Kaynaklar 98

SİMGELER VE KISALTMALAR

aFGF: Asidik fibroblast büyüme faktörü

AP: Alkalen fosfataz

ADSC: Yağ doku kaynaklı kök hücre

BMP: Kemik morfojenik protein

TGF-B: Dönüştürücü büyüme faktörü beta

BT: Bilgisayarlı tomografi

3BBT: 3 boyutlu bilgisayarlı tomografi

EKH: Embriyonik kök hücreler

HKH: Hematopoetik kök hücreler

IDO: Indoleamine 2,3-dioxygenase

IGF-I: İnsüline benzeyen büyüme faktörü I-II

KİKKH: Kemik iliği kaynaklı kök hücreler

MKH: Mezenkimal kök hücre

MYPH: Multipotent yetişkin progenitör hücre

PDGF: Trombosit kökenli büyüme faktörü

PLA: İşlenmiş lipoaspirat

SVF: Stromal vasküler fraksiyon

sMKH: Sıçan Mezenkimal kök hücreler

YKH: Yetişkin/somatik kök hücreler

YDKKH: Yağ doku kökenli kök hücre

YDKH: Yağ doku kökenli kök hücre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Yüz kırıkları plastik cerrahi kliniklerinde sık tedavisi yapılan bir sorun olmakla beraber, iyileşme sürecini araştıran yeterli çalışma mevcut değildir.

Thaller ve Kawamoto 1990 yılında ikinci kez operasyon gerektiren 10 yüz kırığı hastasında yüz kemik kırıklarının iyileşmesinin kemiksel olduğunu histolojik çalışma ile gösterinceye kadar olan dönemde, yüz kemik kırıklarının fibröz bağ dokusu ile iyileştiği düşünülmekteydi (1). Yüz kemik kırıklarının iyileşme mekanizması günümüzde halen tam olarak anlaşılabilmiş değildir. Kırık iyileşme sürecini hızlandırmak için bir çok farklı materyal üzerinde çalışılmıştır. Son yıllarda yağ hücre kaynaklı mezenkimal kök hücrelerinin yara iyileşme mekanizmaları hızlandırdığına dair çalışmalar literatürde sık olarak karşımıza çıkmaktadır. Yüz kemik defektlerinde, adipoz doku kaynaklı. mezenkimal kök hücrelerin osteojenik etkisinin olup olmadığını ortaya koyan kontrollü bir çalışma literatürde yer almamıştır. Biz adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin yüz kemiklerinin kırık iyileşme mekanizmasını incelemek amacıyla bu çalışmayı planladık. Zigoma kemik defekt modelinde, ratlarda gerçekleştirdik.

Travma, onkolojik rezeksiyonlar, enfeksiyonlar gibi nedenlerle oluşan kemik defektlerinin onarımında geçmişten bugüne kadar altın ve gümüş gibi metaller, ksenogreftler, allogreftler ve otogreftler yanında alloplastik malzemeler de kullanılmıştır (2). Bu seçeneklerin rezorbsiyon, enfeksiyon, doku reaksiyonu ve verici alan morbibitesi gibi dezavantajları vardır (3). Kemik defektlerinin sekonder iyileşme ile kapanması arzu edilen ilk seçenektir, ancak belirli büyüklüğün üzerindeki defektler kendiliğinden kapanamazlar (4). Kritik büyüklükteki kemik defekti ‘organizmanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki kemik içi defekt’ olarak tanımlanmıştır. Bu tip defektler yeni kemik oluşumu yerine fibröz bir bağ dokusu ile dolar. Bu defektler kemik iyileşme modellerinde kullanılırlar. Örnek olarak erişkin sıçanlarda kraniyal kemikler için kritik defekt ebatı 6-8 mm çapındaki kemik defekti olarak bilinir (5,6). Sekonder iyileşmenin beklenmediği defektlerin kapanmasını sağlamak veya hızlandırmak amacı ile bir çok teknik denenmişse de son yıllarda giderek artan oranda gündeme

gelen mezenkimal kök hücre (MKH) uygulaması ile olan kemik iyileşmesi konusundaki araştırmalar olumlu sonuçlar bildirmektedir (7-9).

Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas gibi farklı mezenkimal dokulara 'in vitro' veya 'in vivo' olarak dönüşebilen multipotent, hematopoetik olmayan hücrelerdir (10). Bunlar kemik iliği hücrelerinin yaklaşık %0,01 ile %0,001'ini oluşturur (11). Cam ve plastiğe yapıştıkları için hematopoetik kök hücrelerden kolaylıkla ayrılabilirler(12). Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ, kas, deri gibi dokularda bulunurlar (13).

İn vitro çalışmalarda MKH'ler bir takım faktörler ile muamele edilerek bu hücrelerin kemoatraksiyonlarının arttırılması ve dokuya özel mitotik genişlemeleri sağlanabilir (14,15). İnsan ve hayvan MKH'leri immün rejeksiyon yapan antijenler içermediği ve rejeksiyona sebep olmadığını bildirilmektedir (14,15). Bu hipotezi destekleyen deneysel çalışmalarda allojen MKH transplantasyonunun otojen transplantasyonlar kadar başarılı olduğu göstermiştir (16). Mezenkimal kök hürelerden elde edilen keratinositlerin veya dermal fibroblastların yara iyileşmesinde, kondrositlerin kıkırdak iyileşmesinde, miyositlerin miyokard iyileşmesinde, retinal pigment epitel hücrelerinin yaşa bağlı maküler dejenerasyonda ve 'Shwann' hücrelerinin santral sinir sistemi'nin demiyelinizan hastalıklarının tedavisinde kullanımı araştırılmıştır (17-19).

Mezenkimal kök hücrelerin, bir matriks yardımı ile implant haline getirilip, hayvan modellerinde kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır (7,11,17-19). Özellikle uzun kemiklerin kendiliğinden kapanamayan defektlerindeki kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini inceleyen araştırmalar vardır (7,11,18). Mezenkimal kök hücrelerin kraniyal kemikler gibi yassı kemikler üzerindeki etkinliğini inceleyen çok az çalışma vardır (21).

Kemik defektlerinin tedavisinde halen en geçerli yöntem kemik greftlerinin kullanımı olmasına rağmen, hücre bazlı stratejilerin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Bu amaçla farklılaşmamış (kök hücre) hücreler kullanılmaktadır.

Bu çalışmada amaç; ratlarda zigoma kritik büyüklükteki membranöz kemik defektinde, adipoz doku kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin osteojenik etkisinin olup olmadığını ortaya koymaktır. Bu hipoteze yönelik olarak, temin edilmesi kolay olan adipoz kökenli kök hücrelerin defekt oluşturulmuş membranöz kemik dokusunda yeni kemik oluşumunu artırıp artırmadığı radyolojik ve histolojik olarak incelenip, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak fark olup olmadığı araştırılacaktır.

Büyüme faktörlerinin mevcut hücreleri aktive ederek kemik uzamasına olan katkılarını araştıran çalışmalar çoğunluktadır. Ancak bu faktörlerin yarı ömürlerinin kısa ve etkinliklerinin de az oluşu nedeniyle araştırmacılar, klinik ve deneysel çalışmalarda olumlu sonuçlar vermiş olan kök hücre ile onarım çalışmalarına yönelmişlerdir. Kemik iliği elde edilmesinin ağrılı olması, genellikle genel anestezi gerektirmesi ve elde edilen kök hücre miktarlarının yetersiz oluşu, araştırıcıları kemik iliği dışında mezenkimal kök hücre elde etmek için; kas, perikondriyum, adipoz doku gibi dokular kullanmaya yöneltmiştir (22).

Adipoz doku kemik iliği gibi multipotansiyel kök hücreleri barındırmaktadır. İzole edilebilmelerinin ve kültür ortamında çoğaltılabilmelerinin kolaylığı, yüksek sayılarda ve hızlı elde edilebilmeleri adipoz kökenli kök hücreleri, diğer kök hücrelere göre daha avantajlı kılan özelliklerdir (22).

Normal kırık iyileşmesi pluripotent osteoprogenitor hücreler üzerinden yürümektedir, bu hücreler multipotasiyalite özellikleri sayesinde osteoblastlara dönüşerek kemik iyileşmesini sağlamaktadır (22) .

Kafatasında oksipital hattın üst kısmında yer alan kemikler filogenetik açıdan membranöz kökenlidirler. Bu yapılar temporal kemiğin skuamöz kısmı, zigoma, maksilla, nazal kemikler, mandibulanın bir kısmını kapsamaktadır.

Bu çalışmada zigoma şu nedenlerle tercih edilmiştir:

1- Kalvaryum gibi saf membranöz kemiktir.

2- Birbirinden uzak olması nedeniyle yara iyileşmesinde etkileşim olmadan sıçanın her iki tarafında çalışmak mümkündür.

3- Karşılaştırmalı radyolojik görüntü elde etmek için uygundur.

4- Kırık fragmanlarını uygun pozisyonda tutmak için fiksasyon yöntemi gerektirmez, stabil bir kırık modelidir. Böylece hareket ve yabancı cismin kırık iyileşmesi üzerine etkisi ortadan kalkmaktadır (22,47,57,58).

5- Kendiliğinden stabil olduğundan, dolayısı ile ek bir fiksasyon metodu gerektirmediğinden kalvaryal kemik modeline çok benzer. Bu durum, duranın diğer nöral elemanlar olmaksızın kemik rejenerasyonu üzerine etkisini göstermede kalvaryum benzeri bir kemik kullanılmasını sağlamaktadır.

Bu çalışmada saf membranöz bir kemik olması nedeniyle zigoma kemik modelini tercih ettik. Zigoma kırıklarının fiksasyon gerektirmeyen stabil pozisyonları belirgin bir avantajdır. Çalışmada bir tarafdaki zigoma deney grubunu oluştururken, diğer taraf kontrol grubunu oluşturmuştur. Ratın her iki zigomasında 3mm'lik defekt oluşturulmuş sağ zigomalarının deney grubunu, sol zigomaların kontrol grubunu oluşturması planlanmıştır. Rejenerasyon kapasitelerini değerlendirmek amacıyla ratlarda bilateral zigomatik arklarında kemik defekti oluşturuldu. Deney zigoma defekt alanına inguinal bölgeden alınan adipoz kökenli kök hücreden zengin materyal enjekte edildi. Kontrol zigoma defekt alanına herhangi bir materyal konulmadı. Sekonder iyileşmeye bırakıldı. Ardından zigoma kırık iyileşmesi radyolojik ve histolojik açıdan incelendi. Ve istatistiksel kıyaslamaları yapıldı.

Yirmi adet 15 aylıktan büyük erkek Wistar-Albino sıçan kullanılmıştır.

1. grup (deney grubu): Sağ zigomatik ark orta kısmında 3 mm.'lik kemik defekti oluşturulmuştur. İnguinal yağ yastıkçığı alanlarından alınan yağ dokularına santrifüj işlemi uygulanarak elde edilen kök hücreden zengin materyal sağ zigomatik

ark kemik defektinin bulunduğu alana enjekte edildi. Bu işlem toplam 20 zigomada uygulanmıştır.

2.grup (kontrol grubu): Sol zigomatik ark orta kısmında 3 mm.'lik kemik defekti oluşturulmuştur. Kendi halinde iyileşmeye bırakılmıştır. Bu işlem toplam 20 zigomada uygulanmıştır.

Üç boyutlu BT çalışması, gruplar arasında kemik rejenerasyonu açısından oluşacak küçük farkları bile tesbit edebilmek amacıyla tercih edilmiştir. Operasyon sonrası 10. hafta (n: 5 sıçan; 10 zigoma) ve 20. haftada (n: 13 sıçan; 26 zigoma) üç boyutlu bilgisayarlı tomografi filmi çekildikten sonra, operasyon alanları açılmış ve zigoma kemikleri bütün arkı alacak biçimde çıkarılmıştır. Doku örnekleri hematoksilen-eosin ile boyanmış ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Onuncu ve yirminci haftalarda yapılan makroskopik incelemede, cerrahi alanında defekt oluşturulmuş bölgede kırık fragmanların stabilitesi ve gap mesafesinin tamamen kapanıp kapanmaması değerlendirilmiştir.

Temel olarak, kraniofasyal kırık defektlerinin onarımındaki iyileşme mekanizmasını anlamak ve iyileşme sürecine kök hücreden zengin yağ dokusunun etkisini ortaya koymak amacıyla bu çalışma planlanmıştır. İncelemede makroskopik değerlendirme, üç boyutlu bilgisayarlı tomografi kullanılmış ve histolojik çalışma yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Embriyoloji ve Anatomi

Fetal hayatın ikinci ayında kafatası üç kısımdan oluşur. Kondrokranium kıkırdak yapıdadır ve optik, nazal kapsüller ile beraber kafatabanını meydana getirir. Desmokranium membranöz yapıdadır ve beyin tabanını, lateral duvarlarını oluşturur. Apendiküler veya viseral kısım brankial arkın kıkırdak yapıdaki iskelet dizilimlerinden oluşur (23).

Kranyal kemikler beyin dokusunu saran fibröz doku desmokranium içinde membranöz ossifikasyon ile gelişirler. Bu differansiyasyon muhtemelen özel biokimyasal sinyaller ile başlatılmaktadır. Kemik yapı oluştukça fibröz doku dış (periosteal) ve iç (dura mater) tabakalara ayrılır.

Desmokraniumdan membranöz orjinli şu kemikler meydana gelir: Oksipital hattın üzerindeki kafatası kemikleri, temporal kemiğin timpanik ve skuamöz kısmı, sfenoid kemiğin piterigoid proseslerinin medial kısmı ve büyük kanatlarının bir bölümü ve de oksipital kemiğin skuamöz kısmının üst bölümü. Ayrıca üst yüzün kemiklerini oluşturan zigoma, maksilla, nazal kemikler ve alt yüzün kemiği mandibula (kondil ve alveol kısımları hariç) membranöz orjinlidir (24).

Hamilton ve Mossman membranöz kemiklerin enkondral kemiklere göre daha basit bir biçimde oluştuğunu belirtmişlerdir (25). Kranyofasyal iskeletin prenatal gelişiminde, membranöz kemik kıkırdak safhası olmadan fibröz bir membran içinde gelişmektedir (26). Endokondral kemikler iskeletin uzun kemikleri, kaburgalar, vertebralar, ve kafa kemiklerinin belirli kısımlarını oluşturmaktadır.

Embriyonik skeletogenez yüzey epiteli ile mezodermin yakın ilişkide olmasını gerektirmektedir. Hücre-hücre ilişkisinin doku diferansiyasyonunu belirlediği, ektodermin mezoderm farklılaşmasında, mezodermin de ektoderm farklılaşmasında rolü olduğu ortaya konmuştur. Embriyogenezin hücre düzeyinde araştırılması, kranyofasyal morfogenezinin daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır.

Kemik dokusu periost ile örtülüdür. Periost, dışta yoğun fibröz bağ dokusu ve içte osteoprogenitör hücreleri içeren hücresel bir tabakadan oluşmakta olup, eklem içi sinovyal yüzeylerde bulunmaz.

Kemik hücreleri, osteoblastlara dönüşen osteoprogenitör hücrelerdir. Osteoblastlar, organik matriksi salgılarlar ve çevrelerinde yeterli miktarda organik matriks oluşunca, laküna adı verilen boşluklar içerisinde osteositlere dönüşürler. Kemik iligi öncül hücrelerinin birleşmesinden oluşan osteoklastlar, çok çekirdekli, dev hücreler olup kemik rezorbsiyonu ve yeniden şekillendirilmesinden sorumludurlar.(23)

2.2. Kemik Biyolojisi

2.2.1. Kemiğin yapısal özellikleri

Mikroskobik seviyede kemiğin iki tipi mevcuttur.

1. İmmatür kemik
2. Lamellar kemik

Matür kemik medulladaki yağ veya hemapoetik ilik, kemik ve periosttan oluşmuştur.

İmmatür kemik normalde embriyonda, yenidoğan bebekte, kırık kallusunda, büyüyen kemiklerin metafizlerinde, mandibulanın alveolar bölümünde, kranyal kemiklerin sütürlerinde bulunur. İmmatür kemikte kollajen fibrillerin dizilimi uniform değildir. Birim hacimde içerdiği hücre sayısı lamellar kemiğe göre 4 kat daha fazladır. Üretimi ve metabolizması çok daha hızlıdır. İmmatür kemiğin mineralizasyonu düzensizdir ve radyolojik olarak da düzensiz görünür.

Lamellar kemik doğumdan bir hafta sonra görülmeye başlar. 4 yaşında immatür kemiğin yerini hemen hemen bütünüyle lamellar kemik almıştır. Lamellar kemik bir çok yapısal ve fonksiyonel sistemler içerir:

1. Trabeküler lameller (dış ve iç dairesel),
2. İnterstitial,
3. Osteonlar (Şekil 1).

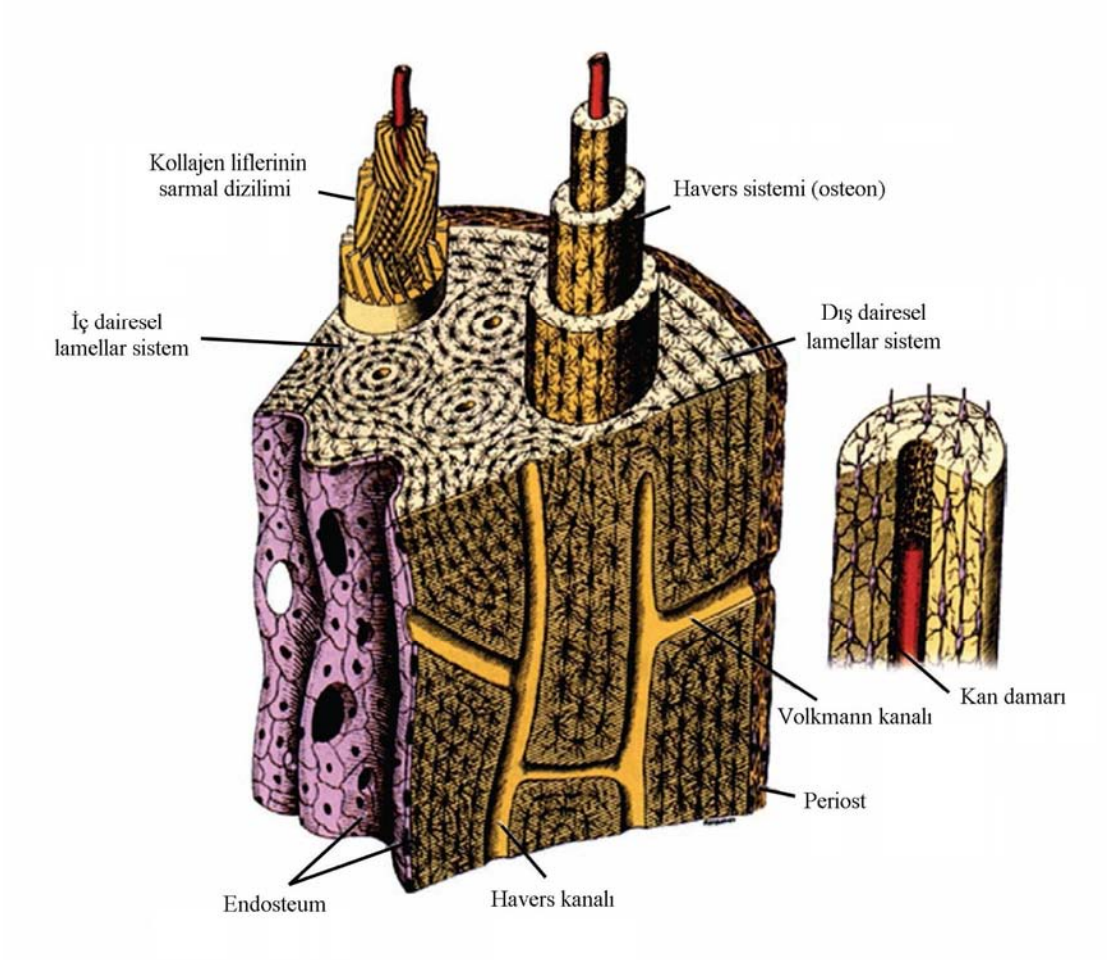
Osteon lamellar kemiğin bir formudur. Kemiğin boyuna uzunlamasına dizilmiş silindir şeklindedir. Ortasında Havers kanalı bulunur. Havers kanalı kan damarları ve sinir yapıları içerir. Havers kanalı çevresinde osteositler sirküler şekilde yerleşmiştir. Osteositlerin yerleştiği bölgelere lakuna denir. Lakunalar, kanalikülller aracılığı ile Havers kanalı ve diğer lakunalar ile birleşir. Mineralize kemik matriksinden difüzyon sınırlıdır. Osteositler bu kanalikülller aracılığı ile metabolik olaylarını yaparlar.

Her osteonun çevresinde sement hattı denilen ince organik matriks tabakası bulunmaktadır. Kanalikülller ve kollajen fibrilleri sement hattını geçmezler. Yani her osteon izoledir. Havers kanallarını diğerleri ile birleştiren oblik kanallar vardır. Bu kanallara Volkmann kanalları denir.

Lamellar kemik yapısal organizasyona göre iki tiptir.

1. Spongioz
2. Kortikal

Kortikal kemik ile spongioz kemiğin matriks kompozisyonu ve yapısı aynıdır. Ancak birim hacimdeki kortikal kemiğin kitlesi daha fazladır. Kortikal kemiğin dansitesi spongioz kemikten daha fazla, porozitesi daha azdır.



Şekil 1: Kortikal kemiğin morfolojik yapısı. Havers ve Volkmann kanallarının yerleşimleri (Jasvir S. Khurana. Bone Pathology, 2nd ed., Humana Press, New York, Chapter one, page 5, 2009).

2.2.2. Periost

Sinovyal eklemler, tendonların kemiğe bağlandığı bölgeler, ligamanlar, interossöz membranlar bölgesi hariç kemiğin dış yüzeyini örten zardır. İki tabakası mevcuttur:

1. Dış tabaka (fibröz tabaka)
2. İç tabaka (kambiyum ya da osteojenik tabaka)

Dış tabaka dens, fibröz yapıya sahiptir. Dış tabaka daha az hücre, daha çok kollajen içerir. İç tabaka ise daha damarsal ve hücreden zengindir.

İçerdiği hücreler osteoblastlara dönüşebilir, ayrıca bu hücreler uygun koşullarda hyalin kıkırdak üretebilirler. Kırık iyileşmesinde kemik dışı bölgelerde kallus oluşturabilirler. Kemik büyümesi sırasında organik matriks üreterek kemiğin çapının artmasını sağlarlar.

Periost yaşa göre değişiklik gösterir. Kambiyum tabakası çocuklarda kalın ve aktiftir. Yaş ilerledikce periost incelir ve osteojenik kapasitesi azalır. İskelet sistemi matüritesi tamamlandığında kambiyum tabakası çok incelir. Tüm bu değişikliklere rağmen periost hücreleri yaşam boyu kemik yaparlar, yaş ilerledikçe kemikler periost sayesinde kalınlaşır. Periost deri grefti gibi kolaylıkla revaskularize olur. Bu nedenle de kemik grefti ile beraber başka bir alana taşındığında alttaki kemiğin daha çabuk vaskularize olmasını sağlar (27). Periostun kalvaryal kemik defektlerinin iyileşmesindeki rolü ayrıca araştırılmış ve genç hayvanlarda defektlerin periost varken daha fazla kapandığı gözlenmiştir. Kalvaryumda duranın da periost benzeri görevi olduğu, kemik yapımı üzerine pozitif etki yaptığı gösterilmiştir (28).

2.2.3. Kemiğin Kan Akımı

Kemiğin üç adet ayrı fakat birbiri ile ilişkili dolaşım sistemi vardır.

1. Nutrisyen sistem
2. Metafizyel kompleks
3. Periosteal kapiller

Nutrisyen sistem majör arterini sistemik dolaşımdan alır. Bu üç sistem birbiri ile ilişkilidir. Örneğin medullar arter yaralandığında, periosteal sistem baskın hale geçer, korteksin revaskularizasyonunu sağlar.

2.2.4. Kemik Hücrelerinin Morfolojisi

Kemiğin 3 ana hücresi bulunur.

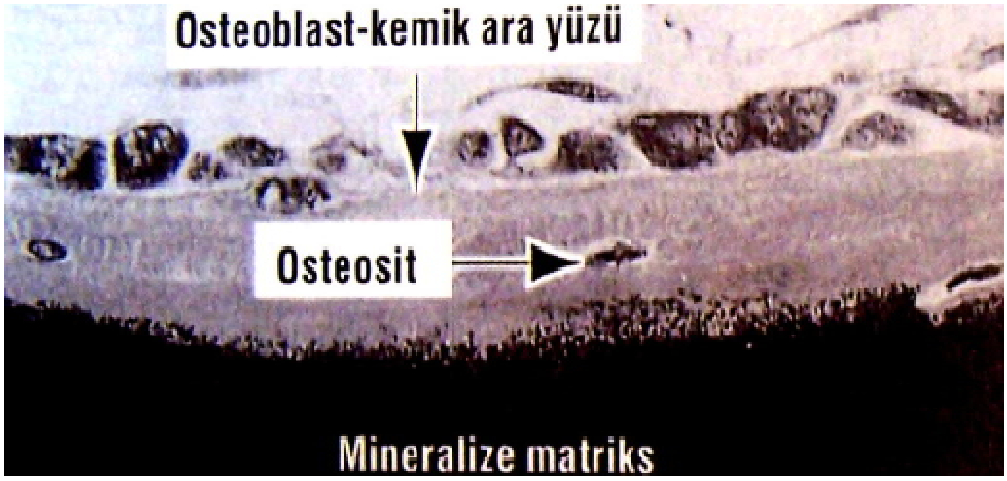
1. Osteoblastlar
2. Osteositler

3. Osteoklastlar

Osteoblast ve osteositler kemik yapan hücrelerdir. İki hücre arasında esas fark bulundukları yerdir. Osteoblastlar kemik yüzeyinde bulunurlar. Osteositler ise kemik mineralize matriksi ile örtülüdür.

Işık mikroskobu seviyesinde aktif osteoblastlar bazofilik boyanırlar (Şekil 2). Protein sentezler ve sekrete ederler. Elektron mikrografi çalışmalarında osteoblast hücre membranı ile mineralize kemik matriksi arasında, mineralize olmayan kemik matriksi oluştuğu saptanmıştır. Osteoblastların kemik matriksi ile çevrilmesi ve daha sonra bu matriksin mineralize olması ile nükleus/sitoplazma oranı düşer ve hücre içi organel miktarı azalır. Mevcut bu osteoblastlara osteosit denir. Osteositler konsantrik olarak osteonun santral lümeni ve lamellar kemik arasında bulunur

Osteoklastlar kemiğin rezorpsiyon yapan hücreleridir. Büyüklükleri ve birden fazla nükleusları ile karakterizedirler. Monositler ve makrofajlar gibi kemik iliğinin pluripotent hücrelerinden oluşurlar.



Şekil 2: Osteoblastların periosteum altında çizgisel olarak dizilimi. Kübik ya da alçak prizmatik yapıdaki bu hücrelerin iri çekirdekleri olup sitoplazmaları bazofiliktir. Hücreler arası sıkı bağlantıları yoktur ve ürettikleri kemik matriksini osteoblast-kemik ara yüzü boyunca saldıktan sonra osteosit halini alırlar

(Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. baslık, sayfa 120, 2006).

2.2.5. Kemik Matriks Bileşimi

Kemik; mineral, proteinler, su, hücreler ve diğer makromoleküllerden (yağ, şeker vs.) oluşur. Kemiğin ekstraselüler matriksi inorganik ve organik kısımlardan oluşur (29). Genel olarak kemik dokusunun % 60-70'i inorganik kısım, % 5-8'i su, geriye kalanı da organik matriksdir. Organik matriksin %90'ı kollajen, % 5'i nonkollajen proteindir. Kemiğin mineral kısmını kalsiyum hidroksiapatit kristalleri oluşturur.

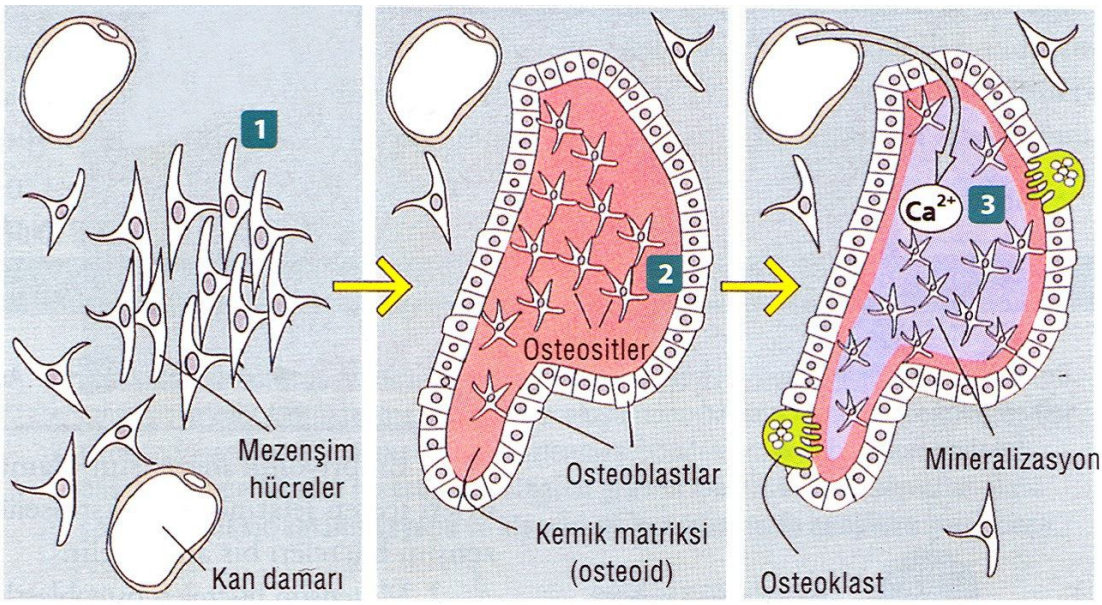
2.2.6. Kemik Yapımı

İskelet sisteminin oluşumu, devamı ve iyileşmesi için kemik dokusunun hayat boyu yenilenmesi gerekmektedir. İndiferansiye mezenkimal hücreler veya pre-osteoblastlar osteoblastlara dönüşür. Osteoblastlar ekstraselüler matriks üretir ve salgılarlar. Matriks mineralize olur, osteoblastlar mineralize matriks ile çevrilirler ve osteosit olurlar. Osteoklastlar meydana çıkarlar ve remodeling olayı başlar. Daha sonra immatür kemik matür lamellar kemik ile yer değiştirir.

Kırık iyileşmesi, iskelet sisteminin gelişimi ve büyümesi esnasındaki yolların aynısını izler. İskelet sisteminin gelişimi esnasında kemik yapımı üç şekilde olur.

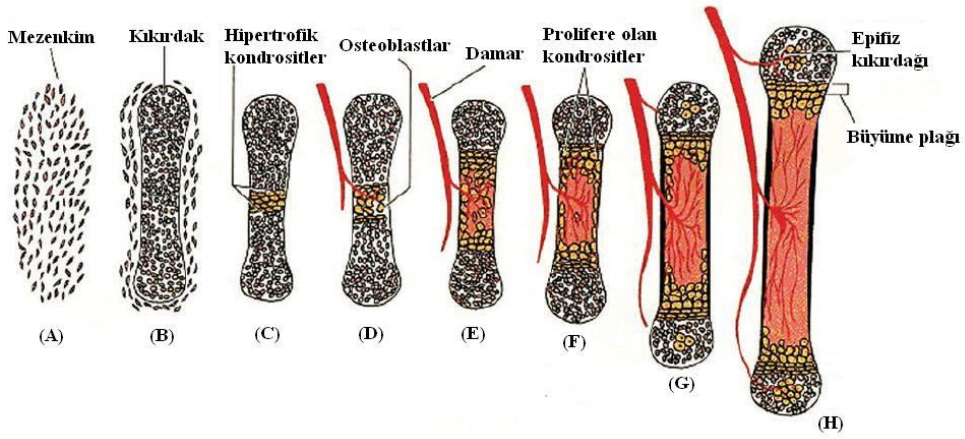
1. Enkondral kemik yapımı.
2. İntramembranöz kemik yapımı.
3. Apozisyonal kemik yapımı.

İntramembranöz kemik yapımında (Şekil 3) endokondral ossifikasyondan farklı olarak kıkırdak form yapılmaz. Mezenkimal hücreler direkt olarak osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar organik matriks üretirler ve mineralize olur. Yassı kemiklerin embriyonal dönemindeki gelişiminde, bazı kırıkların iyileşmesinde, distraksiyon osteogenezinde intramembranöz kemikleşme görülür.



Sekil 3: İntramembranöz kemikleşme. (1) Mezenkimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesidir. (2) Mezenşim hücreleri hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücreye farklılaşarak, sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler (3) Kapillerden osteoid dokuya kalsiyum ve fosfor iyonları taşınıp, osteoblastların salgıladığı alkalen fosfataz (AP) aracılığıyla kalsiyum fosfat moleküllerine dönüşerek kalsifikasyonu sağlarlar. Osteoklastlar kemikleri iç yüzlerinden rezorbe ederken, osteoblastlar da diğer bir taraftan yeni kemik lamelleri eklerler. Birincil kemik dokusu içeren trabeküller tamamen ortadan kalkar, geriye sadece ikincil kemik yapısındaki trabeküller kalır (Kierszenbaum A.L.Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir,4. baslık, sayfa 131, 2006).

Enkondral kemik yapımında (Şekil 4) önce kıkırdak yapılır. Mezenkimal hücreler embriyonda yoğunlaşır kondrositlere dönüşür ve kıkırdak matriks üretirler. Hyalin kıkırdak yapı olgunlaşır ve hipertrofiye olur. Hyalin kıkırdak sonrası periost meydana gelir ve tüm diafizi sarar. Kıkırdak mineralize olur, kan damarları ve kemik öncül hücreler tarafından işgal edilir. Kıkırdağın orta kısmı rezorpsiyona uğrar ve kemik medullası meydana gelir. Vasküler invazyon ile alana getirilen kemik öncül hücreler osteoblastlara dönüşür, mineralize kıkırdak üzerinde kemik matriksi üretirler. Sonra osteoklastlar kalsifiye kıkırdağı ve immatür kemiği rezorbe ederler. Osteoblastlar immatür kemik ve kıkırdak yerine lamellar kemiği meydana getirirler. Uzun kemiklerin embriyonda oluşumunda, fiz ve epifizlerde, özellikle kırık hattında hareket varken iyileşen kemikte, demineralize kemik matriksinden elde edilen büyüme faktörleri ile stimüle edilerek iyileşen kemikte endokondral ossifikasyon oluşur.



Şekil 4: Enkondral ossifikasyon. (A, B) Humerus, femur ve tibia gibi uzun kemikler mezenkimal kök hücrelerin yoğunlaşıp kondrositlere farklılaşması ile oluşan kıkırdak kemik modelinden meydana gelirler. (C) Şaft merkezindeki kondrositler hipertrofiye ve sonrasında apopitoza uğrar. Ölümleri bu bölgeye kan damarlarına izin verir (primer ossifikasyon merkezi) (D, E) Osteoblastlar kan damarları ile ortama gelerek kalsifiye kıkırdak kalıntıları üzerine yeni kemik

matriksini bırakırlar. (F-H) Sekonder ossifikasyon merkezleri de kan damarlarının kemik uç kısımlarına girmesi ile oluşur. (Jasvir S. Khurana. Bone Pathology, 2nd ed., Humana Press, New York, Chapter one, page 17, 2009).

Remodeling-modeling olaylarında kemiğin periostal genişlemesi apozisyonal kemik yapılımı ile olur. Apozisyonal kemik yapımında osteoblastlar kemik yüzeyinde osteoid matriks salgılarlar. Kranyumun gelişmesi esnasında sütür hatları boyunca apozisyonal kemik oluşumu gözlenir.

2.2.7. Kemik Mineralizasyonu

Mineralizasyon çözünebilir kalsiyum ve fosfatın, organik matriks içerisinde solid kalsiyum ve fosfata dönüşmesidir. Bu bir kimyasal reaksiyon değildir, faz transformasyonu şeklindedir. Mineralizasyon ile kemiğin dansitesi ve rijiditesi artar, su ve nonkollajen protein konsantrasyonu azalır (30).

2.2.8. Modeling-Remodeling

Normal iskelet sistemi fonksiyonları için kemik dokusunun yapılması yeterli değildir. Fonksiyonlara uygun farklı şekillerde kemik oluşması gerekmektedir. Kemik şeklinin oluşmasına 'modeling' denir. Kemiklerin şekillenmesi genetik şifre, hareket ve mekanik kuvvetlerin etkisi ile belirlenir. Kemiklerin şekillerinin değişmeden yapılıp yıkılmasına ise remodeling denir. Bu iki olay genellikle aynı anda meydana gelir, fakat farklı olaylardır. Fizyolojik remodeling olayı ile hayat boyunca aynı bölgedeki kemik uzaklaştırılır ve yeni kemik yapılır. Kemiğin dansitesi ve şekli bu olaydan etkilenmez.

2.3. Kırık İyileşmesi

2.3.1. Kırık İyileşmesi

Darbe anında enerji kemik tarafından absorbe edilir. Kemik mekanik ve yapısal olarak bozulur. Kırık iyileşmesinin biyolojisi gerçekte iyileşmeden çok doku rejenerasyonudur. Bu rejenerasyon olayı 3 evrede tanımlanmaktadır:

1. İnflamasyon
2. Tamir
3. Remodeling

Kırık oluşumundan hemen sonra kırık alanındaki trombositlerden ve ölen hücrelerden inflamatuvar medyatörler salınır. Polimorf hücreli lökositler, monosit veya makrofajlar kırık alanında toplanır. Hemen sonra fibroblastlar, mezenkimal hücreler, osteoprogenitör hücreler görülürler. Mezenkimal kök hücreler ve osteoprogenitör hücreler medüller kanalın içindeki endotel hücrelerinden, periosttan, çevre adale ve yumuşak dokulardan transforme olarak kırık bölgesine gelirler. Periostal kallusun kan damarlarının tamamı yeni yapılır ve çevre dokulardan ve medüller kanaldan gelir. İnflamasyon kırık iyileşmesinde, skar oluşumunu artırdığı fakat hızlı iyileşme ve fiziksel bütünlük sağladığı düşünülmektedir (31).

Kırık iyileşmesine ait bilgilerin büyük çoğunluğu enkondral kemik iyileşmesini açıklayan çalışmalardan elde edilmiştir. Bu nedenle de membranöz kemik kırığı iyileşmesinden bahsedilmesi gerektiğinde sıklıkla bu kaynaklar kullanılmaktadır. Temel iyileşme basamakların büyük kısmının aynı olduğu bilinmekle beraber, membranöz kemik iyileşmesinin olası farklı ya da aynı kısımlarını basit bir kırık modelinde veya greft olarak kullanımında olsun anlatan çok az objektif çalışma vardır. Membranöz kemiğin embriyolojik dönemde farklı şekilde oluşması, iyileşmesinde de farklılıklar olabileceğini düşündürmektedir (32). Membranöz kemik iyileşmesinin enkondral kemik iyileşmesinden farklı olduğu ortaya konmuş noktalardan biri, iyileşen kırık hattının röntgendeki görünümüdür. Yıllardır, iyileşen membranöz kırıklarda kırık hattında sebat eden lusent görünüm bu kemiklerin fibröz birleşmeyle iyileştiği görüşünün kabul edilmesine yol açmıştır (33). Bir bistüri insizyonu ile segmentlerin birbirinden ayrılacağı düşünülmüştür

(34). Kappel ve arkadaşları 1974 yılında mandibula kırıkları üzerinde çalışmış ve tedaviden 5 ay sonra %93.6'sında lusent görünümün sebat ettiğini göstermiştir (35). Membranöz kemik kırıklarında enkondral kemik kırıklarına göre, ortamda daha fazla sayıda hücre ve daha az miktarda hücreler arası kalsifiye madde bulunduğu düşünülmüş ve bu immatür kemiğin matür kemikten daha radyolusent görünmesinin doğal olduğu sonucu çıkarılmıştır. Fragmanlar arasında histolojik açıdan tam bir kemik iyileşmesi gözlenmesine rağmen röntgende kemik iyileşmenin izlenmemesi de bu şekilde açıklanmıştır (23). Tucker ve arkadaşları ise membranöz kemik kırık hattında yaptıkları analitik çalışmada gözlediği elemanların enkondral kırık hattındakilerle aynı olduğu fakat kalsiyum hidroksiapatit kristallerinin farklı yapısal dizilime sahip olabileceğini belirtmişlerdir (36).

Craft ve arkadaşları membranöz kemik kırık bölgelerinde yaralanmadan sonraki üçüncü haftada mikroskobik ve gros olarak belirgin bir güç kazanımı olduğunu göstermiştir (37). Tucker ve arkadaşları eğme gücü uygulayarak kırık örneklerinde, membranöz kemiklerin enkondral kemiklerden daha yüksek düzeyde dayanma gücüne ulaştığını gösteren kontrollü bir çalışma rapor etmişlerdir (38).

Kırık tamiri bütün evrelerde mekanik faktörlere duyarlıdır ve interfragmanter hareket ile direkt ilişkili olarak bilinmektedir. Bu yüzden tamir kısmını stabil olmayan kırıklarda ve stabil kırıklarda ayrı ayrı incelenmesi uygundur.

2.3.1.1. Stabil Olmayan Kırıklarda Tamir

Kemiğin, periostun, kemik iliğinin ve yumuşak dokuların kan damarlarının yaralanması sonucu kırık hematomu oluşur. Bu kırık iyileşmesinde ilk aşamadır. Hematom fibrin ağ oluşturarak tamir hücrelerinin migrasyonunu kolaylaştırır. Açık kırıklarda olduğu gibi kırık hematomunun boşalması tamir sürecini yavaşlatır.

Kırık uçları kan dolaşımı bozulduğu için nekrotiktir. Bazı kırıklarda haftalar sonra radyolojik olarak görülebilen bir boşluk oluşur. Bu rezorpsiyon olayından osteoklastlar sorumludur. Kırık bölgesine gelen mezenkimal hücreler proliferasyona

ve diferansiyasyona uğrayarak osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar kırık kallusunu oluştururlar. Vaskularizasyona zarar vermeyecek biçimde instabilite veya kırık uçlarında hareket mevcut olduğunda kallus oluşumu artar. Kallus; fibröz doku, kıkırdak ve immatür kemikten oluşur. Kallus kırık bölgesi boşluğunu ve çevresini doldurur. İlk dönemlerde yumuşak (fibröz ve kıkırdak) ve sert kallus (kemik) mevcuttur. Uzun kemiklerde periferde intramembranöz kemikleşme ile sert kallus oluşur. Oksijen basıncının düşük olduğu merkezi bölgelerde ise yumuşak kallus oluşur. Yumuşak kallus ise endokondral kemikleşme ile ossifiye olur. Kırık fragmanları böylece stabil hale gelir. Daha sonra kallus mineralize olur. Oluşan kallus immatürdür ve normal kemikten çok zayıftır. Bu yüzden remodele olması gerekmektedir. Tamir döneminin son kısmında ihtiyaç fazlası kallus rezorbe olur ve immatür kemik lamellar kemik ile yer değiştirir.

2.3.1.2. Stabil Kırıklarda Tamir

Kırık yüzeyleri rijid olarak birbirleri ile temas ettiğinde kallus görülmeden kaynama meydana gelmektedir. Bu tip iyileşmeye 'primer kırık iyileşmesi' de denilmektedir. Rijid internal fiksasyon ve primer kırık iyileşmesinin 4 prensibi tarif edilmiştir: 1. Anatomik redüksiyon, 2. Rijid internal tesbit, 3. Atravmatik cerrahi teknik, 4. Erken, ağrısız, aktif hareket (38-40).

Schenk ve Willenegger primer kırık iyileşmesinin iki tipini tanımlamıştır (41):

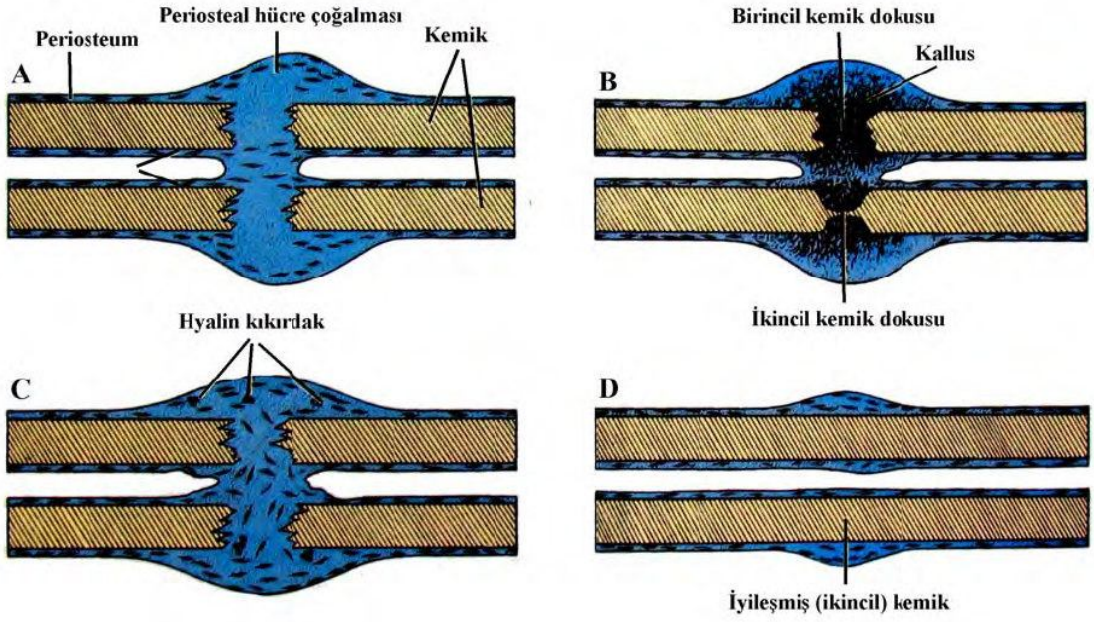
1. Primer temas iyileşmesi.
2. Primer boşluklu iyileşme.

Perren ve arkadaşları kompresyon osteosentezi sonrası yaptıkları gözlemlerde kortikal kırık uçlarının bütün olarak birbirleri ile temas etmediğini ve arada bir takım boşluklar olduğunu tesbit etmişlerdir (40). Kortikal kemikler arasında direkt temas olduğunda lamellar kemiğin osteondan osteona olduğu ve osteonların kemik uzun aksına paralel olduğunu belirlemişlerdir (40,41). Bu tip iyileşmede osteoklast

kümeleri kırık hattını geçerler. Osteoblastlar osteoklastları takip ederek yeni kemik oluştururlar. Kan damarları da osteoblastları takip ederek Havers kanalarını oluştururlar. Primer temasla iyileşmenin boşluklu iyileşmeye göre daha üstün olduğu belirtilmektedir. Ayrıca kemik uçlarındaki yaklaştırma ne kadar iyi olursa olsun her zaman için hem primer hem de sekonder iyileşmeye tabii olacak alanlar bulunmaktadır.

1960'larda osteotomi hattının rijid kompresyon plakları ile osteosentezinin kallus oluşumunu inhibe ettiği ve kırık uçlarının temas olan (contact) ve olmayan (gap) bölgelerde direk Haversian remodelingi ile kaynadığı keşfedilmiştir (41). Daha sonraları kırık iyileşmesi primer ve sekonder iyileşme olarak ikiye ayrılmıştır. Sekonder iyileşme (spontan) periosteal ve endosteal kallus oluşumu ile olmaktadır. Kırık iyileşmesinin ana amacı kortikal kemiğin rekonstrüksiyonunu sağlamakdır. Kırık esnasında kırık uçları nekrotikleşir ve avaskularize olur. Haversiyan remodelingi ile nekrotik dokuların revaskularizasyonu ve interkortikal kaynama sağlanır. Arada oluşan kallusun biyomekanik olarak yük taşıma özelliği yoktur. Kallus sadece Haversiyan remodeling olana kadar kemik uçlarını stabil tutar. Kaynamış kırığın sağlamlığı kırık hattını geçen osteon sayısına bağlıdır. Haversiyan remodeling için dizilim sağlanmalı, stabil fiksasyon oluşturulmalı ve yeterli kan akımı sağlanmalıdır. Kırık iyileşmesinde her zaman Haversiyan remodelingi için bir gecikme süresi mevcuttur. Bu insanlarda ikinci aydan itibaren başlar (42). Haversiyan remodeling için kırık uçlarının başlangıçta tam anlamı ile temas etmelerine gerek yoktur. Plak osteosentezlerinden sonra fragmanlar arasında minimal boşluklar kalmaktadır. Bu boşluklar büyüklüğüne göre lamellar veya immatür kemik ile dolmaktadır. Küçük boşluklar mevcut olduğunda (150-200µ: yaklaşık bir osteonun dış çapı kadar) hücreler kemik uzun aksına dik olarak lamellar kemik oluştururlar. Daha büyük boşluklarda ise (200µ - 1 mm) hücreler immatür kemik oluşturarak boşluğu doldururlar. Arada oluşan bu kemik doku iskele olarak kullanılarak Haversiyan remodeling ile sekonder osteonlar oluşturulur. Ancak gap büyük ise ya da maksillanın ön duvarı gibi ince kemikler kırılmışsa ossöz iyileşme yerine fibröz birleşme meydana gelebilir (1).

Kırık uçları arası dokunun gerilme sınırını aşmayan, rotasyonel olmayan, kontrollü aksiyel küçük hareket ile periosteal kallus oluşumunu arttırmakta ve kortikal rekonstrüksiyonu kolaylaştırmaktadır (43-45) (Şekil 5). Orta yüz kemikleri strese çok az maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle kırık fragmanlarının deplase olmamakta ve kemik kallus oluşması için gerekli uyaran oluşmamaktadır. Yüz kemiklerinde enkondral iyileşmenin olmamasını bu şekilde stres yokluğu ile açıklayan yazılar mevcuttur (1)



Şekil 5: Kortikal kemiklerde kemik iyilesme süreci (A) Periosteum altındaki ve endostiumdaki osteoprogenitör hücrelerin mitotik aktivitesi artar. (B) Periosteum altında çoğalan osteoprogenitör hücrelerin kemiğe en yakın kısımları osteoblastlara dönüşerek kemik manşet yapmaya başlarlar. (C) Kılcal damar büyümesi osteoprogenitör hücre çoğalmasından daha yavaş olduğu için, ortada kalan prolifere olmuş osteoprogenitör hücreler, azalmış oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücreler ve kondroblastlara dönüşerek kemik mantonun dış tabakasında kıkırdak yaparlar. (D) Kırık uçları kanselöz kemik ile birleştikten sonra, primer kemik yapısının sekonder kemik yapısı ile değistirilmesiyle yeniden şekillendirilme sağlanır (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10 th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 144 , 2003)..

Rever ve arkadaşları tavşan zigoma modeli üzerinde yaptıkları bir çalışmada basit fraktür iyileşmesi ile kemik defektli iyileşmeyi histolojik ve radyografik açıdan karşılaştırmışlardır. İki haftanın sonunda radyolojik olarak kallus oluşumu gözlenmiş, spesmenlerde artmış vaskularite ve defektli ve de basit kırıklı grupların her ikisinde kıkırdak oluşumu dikkati çekmiştir. Dördüncü haftada artmış mineralizasyon tesbit edilmiştir. Sekizinci haftada ise her iki grupta tam bir osseöz iyileşme, matür kemik oluşumu gözlenmiştir. Çalışmada dikkati çeken nokta her iki grupta da enkondral kemik iyileşmesine benzer tarzda kıkırdak oluşum safhasının izlenmiş olmasıdır. Kıkırdak matriksin mineralize olması ve bu çatı içinde kemik yapımının başladığı bildirilmiştir (46). Bu çalışma ile, yüz kemik kırıklarınının iyileşmesini sadece membranöz iyileşme ile açıklayan genel yaklaşımların dışına çıkılmıştır.

2.3.2. Kırık İyileşmesinde Kan Akımı

Kırık iyileşmesinin her aşamasında kan akımı farklı özellikler gösterir. Kırık esnasında damar yapılar zarar gördüğü için kan akımı azalır. Günler içerisinde kan akımı artarak ikinci haftada en yüksek düzeye çıkar. Daha sonra dereceli olarak 12. haftada normale döner. Kırığa nasıl müdahele edildiği, tespitte kullanılan yöntem türü kan akımını büyük ölçüde etkiler.

2.3.3. Kırık İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Yaralanma şiddeti fazla ise, yumuşak doku yaralanması, kemik ve yumuşak doku kaybı, kırık uçlarının deplasmanı, kırık bölgenin beslenme bozukluğu fazladır. Bu durumda kemik ve yumuşak doku nekrozu fazla olacaktır. Böylece canlı mezenkimal hücre sayısı azalacak ve damarsal gelişme daha güç ve geç olacaktır. Segmental kırıklarda, parçalı kırıklarda ve genellikle açık kırıklarda bu durum söz konusudur. Kas, tendon, fasya, damar, sinir gibi yumuşak doku interpozisyonu kırık kaynamasını olumsuz yönde etkilemektedir.

Kırık kaynamasında yaşın etkisi özellikle periostun çok daha aktif olduğu iskelet sistemi matüritesi tamamlanıncaya kadar olan dönemdedir. Daha sonraki dönemlerde yaşın kırık kaynamasına bir etkisi yoktur (47).

Kortikosteroidler muhtemelen osteoblast öncü hücrelerinin osteoblastlara dönüşümünü engelleyerek ve tamir için gerekli olan kemik matriks sentezini yavaşlatarak kırık kaynamasını olumsuz etkilemektedir. Deneysel çalışmalarda büyüme hormonu, tiroid hormonu, kalsitonin, anabolizan hormonlar, insülin hormonunun kırık kaynamasını uyardığı bildirilmektedir (48,49).

Enfeksiyon varlığında lokal kan dolaşımı bozulmakta inflamasyon cevabı artmaktadır. Bu etkiler de kaynamayı engellemektedir.

2.4. Kırık İyileşmesinin Uyarılması

Kırıklar genellikle problemsiz iyileşir. Ancak %5-10 oranında kaynama gecikmesi ve kaynamama problemleri ortaya çıkar. Hücresel ve moleküler biyoloji teknolojisinin gelişmesiyle kırık iyileşmesinin olumlu yönde etkilenmesi mümkün olmaktadır.

2.4.1. Biyolojik Uyarma (İndüksiyon)

Hücresel diferansiyasyon, ilişkide olan iki hücreden birinin diğerine etki etmesi ile oluyorsa bu mekanizmaya indüksiyon denilmektedir. Sonuçta uyarılan hücre osteoblasta dönüşüyorsa bu olay kemik indüksiyonu olarak adlandırılır. Embriyonik dönem indüksiyon sisteminde olduğu gibi uyaran ve uyarılan hücreler vardır. Uyarılan hücreler genelde mezenkimal hücrelerdir ve bir osteoblast, kondroblast, fibroblast veya yağ hücresine dönüşebilme kapasitesine sahiptirler. Uyarma sürecinin sonuda özelleşmiş yeni hücreler meydana gelir ve bir organ formunu alır (50,51).

Biyolojik uyarma yöntemleri lokal ve sistemik olarak ayrılabilir (Tablo 1).

Tablo 1:

Biyolojik Uyarma Yöntemleri

Lokal yöntemler

Osteojenik Yöntem

- Otojen kemik grefti
- Allojen kemik grefti
- Otojen kemik iliği grefti

Osteokondüktif Yöntem

Osteoindüktif Yöntem

- Dönüştürücü büyüme faktörü beta (TGF-B)
- Kemik morfojenik protein (BMP)
- Asidik fibroblast büyüme faktörü (aFGF)
- Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)
- İnsüline benzeyen büyüme faktörü I-II (IGF-I)

Sistemik yöntemler

2.4.1.1. Lokal Uyarma

2.4.1.1.1. Osteojenik yöntem

Osteojenik yöntemde, bazı maddeler kemik yapımını destekler veya stimüle eder. Bu amaçla otojen kemik iliği, otojen ve allojen kemik greftleri, demineralize edilmiş allojenik kemik matriksleri kullanılmaktadır. Otojen ve allojen kemik greftleri 100 yıldan beri kullanılmaktadır (52). Craft ve Sargent yazılarında, frontoparietal kemik grefti ile ilk kraniofasyal defekt onarımının 1890 yılında Konig ve Müller tarafından yapıldığını yayınlamıştır (53,54).

Greft alıcı bölgeye konduğunda hematom oluşmaktadır. Muhtemelen hematom içindeki hücrelerden biyoaktif moleküller salınmaktadır (47). Bu sırada greftin nekroze olması inflamasyonu uyarmaktadır. Günler içinde konak hücrenin kan damarları ve osteojenik öncül hücreler bölgeye gelir. Osteoklastlar grefti rezorbe ederler. Bu sırada greftteki çok az hücre canlılığını korur. Greft bu özellikleri ile osteojenik ve osteokondüktif etki gösterir. Rezorpsiyon esnasında ortaya çıkan sitokinler, proteinler inflamatuar yanıtla beraber greftin osteoindüktif etkisini gösterir.

Kuzuların mandibula defektlerinde yapılan bir çalışmada membranöz yol ile oluşmuş kemiklerden (ilium) alınan greftlerin konak kemik üzerinde stabil edildiklerinde %16, edilmediklerinde %6; enkondral yol ile oluşmuş bölgelerden (tibia) alınan greftlerin stabilize edildiğinde %42, edilmediklerinde %24 revaskularize oldukları saptanmıştır (55). Bunun yanısıra, membranöz kemik greftinin enkondral grefte göre daha hızlı iyileştiğini rapor eden çalışmalar da mevcuttur (37,57,58).
Sadece otojen kemik iliği de osteogenezi uyarmak amacıyla kullanılmaktadır (58).

2.4.1.1.2. Osteokondüktif yöntem

Defektli kemik bölgesine yerleştirilen maddelerin iskele görevi görmesi ile damarsal yapıların, kemik öncül hücrelerinin bölgeye gelmesinin kolaylaştırması yöntemidir. İskele görevi gören yapı sayesinde tamir daha kolay olmaktadır. Osteokondüktif maddeler kemik dışındaki bölgelerde kemik oluşumunu uyarmazlar. Hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat, kalsiyum aluminat seramikleri, biyoaktif camlar, sentetik polimerler üzerinde osteokondüktif etki açısından çalışılmaktadır. Normal şartlarda osteoblastlar uygun yüzeylerde kemik yapabilirler. Bu maddeler yüzey ortamı sağlarlar ve zaman içerisinde rezorbe olurlar.

Son zamanlarda inorganik kalsiyum-fosfat karışımları kemiğin mineral kısmını oluşturacak şekilde hazırlanmakta, kırık hattına enjekte edildiğinde fizyolojik ortamda dakikalar içerisinde sertleşmekte ve kırık hattında diğer yöntemler ile birlikte kullanıldığında stabilite sağlamaktadır. Materyal in vitro çalışmalarda zamanla rezorbe olmakta yerini alıcının oluşturduğu kemik dokusu almaktadır (59).

2.4.1.1.3. Osteoindüktif yöntem

Osteoindüktif yöntem ile indiferansiye perivasküler mezenkimal hücrelerin mitogenez ile osteoprogenitör hücrelere dönüşmesi ve kemik üretme kapasitesinin uyarılması sağlanır. Osteoindüktif maddeler kemik dışındaki dokularda da kemik oluşumu sağlayabilirler. Kırık iyileşme bölgesinden bir çok madde izole edilmiştir. Bunlardan en çok araştırılan maddeleri şöyle özetleyebiliriz:

Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta (TGF-B)

İskelet sistemine ait bir çok hücrenin diferansiyasyonunu (kondrosit, osteoblast, osteoklast için mezenkimal öncül hücreler dahil) kontrol eder (60). TGF-B makrofajlardan salgılanan en güçlü kemotaktik faktördür. Fibroblastlar aracılığı ile olan doku tamirini uyarır. Bazik fibroblast büyüme faktörünün ise periost hücrelerinden osteokondrojenik farklılaşma meydana getirdiği gösterilmiştir (61). Periost altına verildiğinde enkondral ossifikasyon oluştuğu gözlenmişdir (62).

Kemik Morfojenik Protein (BMP)

Urist 1965 yılında demineralize kemiğin iskelet sistemi dışında kıkırdak ve kemik doku meydana getirebildiğini göstermiştir. BMP'in kemik dışı bölgelere uygulanması ile mezenkimal hücreler kemotaksi, proliferasyon, diferansiyasyon ile geçici kıkırdak benzeri doku (kondroid: kondroosteoid) yaparlar. Ardından, kıkırdak doku kemik doku ile yer değiştirir (50). Demineralize kemik matriksi, BMP, BMP-otojen spongioz greft kombinasyonları uzun kemiklerin kaynama gecikmesi ve kaynamama problemlerinde kullanılmıştır (63-65).

Dura hücreleri üzerinde BMP'nin etkisinin araştırıldığı bir çalışmada durada kondroid ve immatür kemik oluşumu gösterilmiştir. İmmatür kemik 4 hafta sonunda matür kemik haline dönüşmüştür. Üretilen yeni kemik miktar olarak allojenik kemik matriksine cevap olarak üretilenden daha fazla olarak gözlenmiştir. BMP ile uyarılmış diferansiyasyonun histolojik kanıtı olarak kondroid doku oluşumu gösterilmektedir. Bu doku normalde bir kalvaryal kemik defektinin iyileşmesi esnasında yer almamaktadır (66). Erişkin köpeklerin temporal kemik bölgelerinde oluşturulan kemik defektine BMP uygulandığında tam bir kemik oluşum gözlenmemiştir. Ancak, bölgeye ek olarak kemik iliği grefti (ek osteoprogenitör hücre kaynağı) getirildiğinde tam iyileşme oluşmuştur. Duranın yaşla beraber azalan osteoprogenitör hücre kapasitesinin ek kaynak getirerek ve indükleme yaparak tekrar kazandırılabileceği, dolayısıyla kranial defektlerin kapatılmasında kullanılabileceği düşüncesi oluşmuştur (50). BMP'lerin rekombinant teknik ile üretilmesi, taşıyıcı matrikslerle bağlanması ve kobayların cilt altı dokularına yerleştirilmesi ile kemik oluşturduğu gözlenmiştir (67).

Asidik Fibroblast Büyüme Faktörü (aFGF)

Kemik dokuda yüksek konsantrasyonda bulunur. Enjekte edildiğinde kallus miktarı kontrol grubuna göre belirgin biçimde çoğaltmakta ve ayrıca kallusun toplam DNA ve kollajen içeriğini de artırmaktadır.

Trombosit kökenli büyüme faktörü (PDGF)

PDGF'ün ana fonskiyonu kemotaksidir. İnflamatuvar hücreleri kırık hattına çeker ve mezenkimal hücrelerin proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu artırır. PDGF'ün subperiosteal enjeksiyonlarının subperiosteal kemik yapımını artırdığı gözlenmiştir.

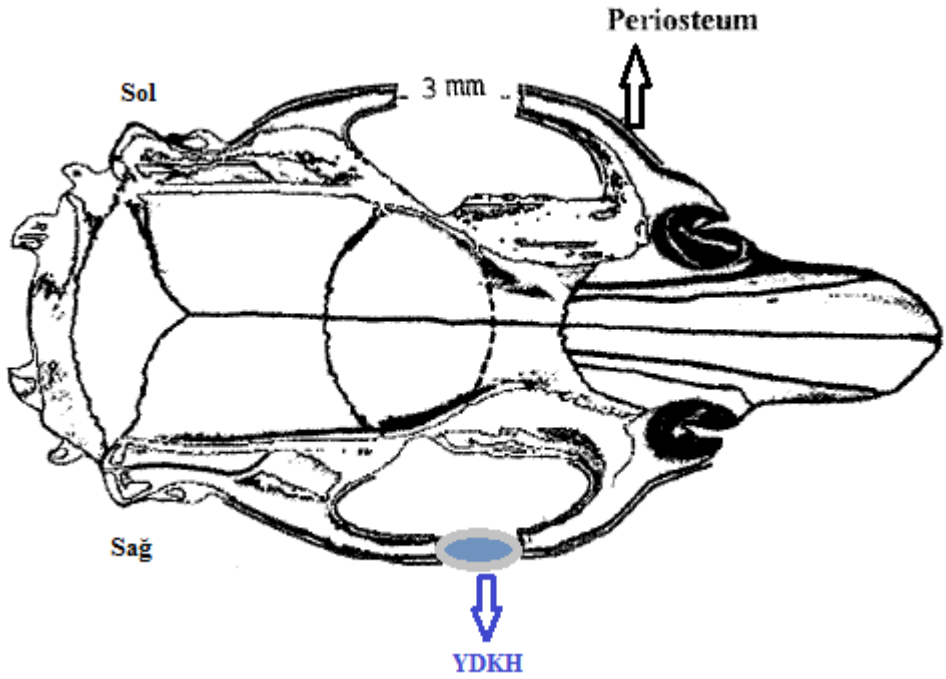
İnsüline Benzeyen Büyüme Faktörü I ve II (IGF-I), (IGF-II)

IGF-I'in zigoma arkında oluşturulan kemik defektli alanda iyileşmeyi kontrol grubuna göre hızlandırdığı, yüz kemiklerinde osteogenezi artırdığı gösterilmiştir (68).

IGF-II, kemik hücreleri proliferasyonunu ve kıkırdak matriks üretimini doza bağımlı olarak artırır.

2.5. Sıçan Kafatası Anatomisi

Labaratuvar sıçanı tipik bir omurgalıdır. İskelet sistemi 'aksiyal' ve 'appendiküler' bölümlere ayrılır. Aksiyal iskelet, kafatası, omurga, sternum ve kaburgaları, appendiküler iskelet ise pektoral kavsak, üst ekstremite, pelvis ve alt ekstremiteyi kapsar. Uzun nazal kemik yapının arkasında "kavum kranii'nin" tavanını yapan frontal ve paryetal kemikler bulunur. Paryetal kemik ile oksipital kemik ile arasında interparyetal kemik vardır.



Sekil 6: Sağ tarafta kritik boyutta kemik defekti (3mm) oluşturulmuş zigomaya yağ dokusu kökenli kök hücre (YDKKH) uygulanmış hayvan modelinin

şematik görünümü, sol tarafta periostun korunduğu işlem uygulanmamış kritik boyutta kemik defekti (3mm).

2.6. Kritik Büyüklükte Kemik Defekti

Schmitz and Hollinger 1986 yılında 'kritik büyüklükteki kemik defekti'ni tanımlamışlardır (5). Buna göre kritik büyüklükteki kemik defekti '**organizmanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki kemik içi defekt**' olarak tanımlanmıştır. Bu tip defektler yeni kemik oluşumu yerine fibröz bir bağ dokusu ile dolar (4). Bu defektler kemik iyileşme modellerinde kulanılırlar. Sıçanlarda kabul edilen kritik büyüklükteki zigoma kemik defekti 3 mm çapındaki tam kat kemik defektidir (5,69). Sıçanlarda kritik büyüklükteki kraniyal kemik defektinin primer fibröz kallus dokusu ile dolduğu ancak üç aylık periyotta minimal bir kemikleşmenin olduğu tespit edilmiştir (5,69,70).

2.7. Mezenkimal Kök Hücreler

Kök hücre biyolojisi ve klinikte kullanılabilirlikleri üzerindeki çalısmalar hızla artmaktadır. Kök hücreler bazı özelliklerinden dolayı diğer hücrelerden farklıdırlar. Belirli doku hücre karakteristikleri taşımayan ve uygun sinyal oluncaya kadar farklılaşmamış fenotiplerini koruyan hücrelerdir. Organizmanın tüm yaşamı boyunca kendini yenileme özelliklerine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı in vitro kültürlerde kolaylıkla çoğalabilmektedirler. Belirli biyolojik sinyaller altında fenotiplerinden tamamen farklı bir hücre tipine dönüşebilme potansiyelleridir. Kök hücreler bulundukları yere göre sınıflandırılabilirler. Embriyonik kök hücreler (EKH) erken embriyo döneminde blastokistin iç tabakasında bulunurken, yetişkin/somatik kök hücreler (YKH) yetişkin organizmanın dokularında bulunurlar. Embriyonik kök hücreler vücuttaki her hücre tipine dönebilen 'totipotent' özellik taşırken bazı kök hücre tipleri belirli dokuların hücre tiplerine dönüşebilen 'multipotent' özellik taşırlar. Mezenkimal kök hücreler bu tip 'multipotent' hücrelere örnektir. Hematopoetik kök hücreler (HKH) ise birçok kan hücresi tipine dönebilen

‘pluripotent’ kök hücrelerdir. ‘Unipotent’ özelliği olan kök hücreler ise sadece belirli hücre tipine farklılaşabilirler.

Mezenkimal kök hücreler osteojenik, kondrojenik, adipojenik, miyojenik ve fibroblastik stromal hücreler yönünde farklılaşırlar (8,71-73). Bu kök hücrelerin bir ön hücre tipi olan ve kültür kaplarına yapışan ‘multipotent yetişkin progenitör hücre (MYPH)’ tipi tespit edilmiştir. Multipotent yetişkin progenitör hücreler MKH’lere, endotelyal, epitelyal ve hatta hematopoetik hücrelere farklılaşabilmektedir (74).

Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği aspirasyonundaki çekirdekli hücre popülasyonunun % 0,0001’inden daha azını oluştururlar (11). Kemik iliği aspirasyon materyali yoğunluk farkı oluşturan ‘ficoll pague’ veya ‘percoll’ gibi ajanlarla muamele edildiğinde 1,5X106 hücre/cm2 yoğunlukta kümeleşirler. Primer kültürleri 12-16 günde elde edilirken daha sonraki kültürlerde sayıları çoğaltılır. Mezenkimal kök hücreler morfolojik olarak yapışan fibroblastlara benzerler. Mezenkimal kök hücreler mezenkimal stromal hücreler, kemik iliği stromal hücreleri, mezenkimal progenitör hücreler olarak da adlandırılmışlardır. İsimlendirme konusundaki tartışma devam etmektedir. Genç hayvanların periosteum ve kemik iliğinde bol bulunmasına rağmen yaşın ilerlemesi ile sayıları azalır (8). Orijinleri periost tabakası veya kemik iliği olabildiği gibi kas, yağ ve sinovyal dokuda da az sayıda bulunurlar (20). Mezenkimal kök hücrelerin sayısı ve aktivitesi metafiz bölgeleri ve kalın vasküler periostta daha çoktur ve bu bölgelerdeki iyileşme daha iyidir (71). Kemik iliği aspirasyon materyalinin %0,01’inden daha azı oranında bulunur (75). Son zamanlarda MKH’in kemik iliğinden başka eklem kıkırdakları, sinovya ve periosteum gibi iskeletsel yapılarda bulunduğu tespit edilmistir. Bazı çalışmalarda diz eklem yağ yastıkçıkları da dahil olmak üzere yağ dokuları ve hatta arter duvarı da MKH izolasyonunda kullanılmıştır (73,76,77). Bu gözlemler Virchow’un 1863 yılında damar duvarlarındaki ektopik kıkırdak ve kemik oluşumunu açıklayabilir (79). Ayrıca MKH göbek bağı ve fetal dolaşım gibi iskelet dışı yapılardan da daha az oranda izole edilebilmiştir (13,80). Mezenkimal kök hücreler belirli doku hücre karakteri taşımayan ancak belirli sinyaller altında belirli bağ dokusu hücreleri yönünde farklılaşabilen hücrelerdir. Bu sinyaller travma, kırık, inflamasyon, nekroz veya bir tümör olabilir (81). Bu hücrelerin hareketlenmesi ve farklılaşması

kemotaksis ve integrin gibi transmembran proteinlerin ekstrasellüler matriks ile etkileşmesi ile gerçekleşir (82).

Fakat MKH üretimi ve çoğaltılması kültürde yapıldığından in vivo sinyallerle çoğalan MKH'lerin tüm özellikleri tam anlaşılmış değildir. Song ve Tuan'ın yaptıkları çalışmada belirli alkalen fosfataz aktivitesine sahip osteoblastların fonksiyonel yağ yapan yağ hücrelerine veya kondrositlere dönüşmesi genetik yeni programlama ve yeni farklılaşma kavramını ortaya çıkarmıştır. Bu olaylar farklılaşmış bir hücrenin başka bir farklı hücre tipine farklılaşması olarak tanımlanır. Bu nokta MKH'lerin yüksek çoğalma potansiyelinden çok 'plastisiteleri' ve değişik hücre gruplarına dönüşüm yapabilme karakterleri olarak bilinir (83).

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyon teknikleri daha çok onların yapışma özelliği kullanılarak geliştirilmiştir (11). Yoğunluk farkına göre santrifüjü takiben yapılan kültürlerde, kültür kaplarının yüzeylerine yapışan fibroblast-benzeri koloniler yaparlar. Yapışmayan hücreler her kültür değişiminde alınarak konsantre MKH'ler elde edilir. Bu hücrelerde kontakt inhibisyon özelliği olmadığı için tekrarlayan pasajlarla çoğaltılarak saf bir MKH kültürü elde edilir (11,84).

2.7.1. Mezenkimal kök hücrelerin immünofenotiplendirilmesi

Mezenkimal kök hücrelerin henüz spesifik bir immünofenotip belirteçleri yoktur. Hematopoetik öncül hücreler gibi CD31, CD34, CD45, CD117 veya CD133 hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmezler (85). Değişik hücre tiplerinde eksprese edilen değişik tipte antijen yapıları vardır. Bundan dolayı belirlenmeleri adhezyon molekülleri, ekstraselüler matriks ve büyüme faktörü reseptörleri gibi farklılaşma ve belirli hücre tipini gösteren geniş bir monoklonal antikor çeşidi ile yapılabilir (86,87). Bugün için en çok kabul edilen immünfenotip profili CD105 (SH2) ve CD73 (SH3 ve SH4) ekspresyonudur (8).

2.7.2. Mezenkimal kök hücrelerin bağışıklık sistemini baskılayıcı özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin alıcının immün cevabından kaçtığına dair güçlü bulgular vardır. Bunun mekanizmaları olarak MKH'lerden sınırlı sayıda eksprese olan alloantijenlerin varlığı ve hücre temas mekanizmalarının bloke edilmesi olarak düşünülmektedir. Mezenkimal kök hücreler MHC sınıf I antijenler içermelerine rağmen MHC sınıf II antijenler ve CD40, CD70 ve CD86 gibi aktive edici moleküller içermezler. Bunun sonucu olarak MKH'ler MHC sınıf I antijenler ile T-hücrelerini aktive etseler bile diğer aktive edici molekülleri içermediğinden bu cevap yarım kalır. Mezenkimal kök hücreler T-hücre cevabını hücre çoğalması seviyesinde de bloke ederler. Mezenkimal kök hücreler T-hücre döngüsünü 'cyclinD2 downregulasyonu' yaparak G1 fazında durdurur. Yapılan çalışmalarda T-hücreler, MKH kültüründen alındıktan sonra interferon-C üretseler dahi çoğalamamaktadırlar (88). Mezenkimal kök hücrelerin oluşturduğu T-hücre çoğalmasının baskılanması kalıcı olmaktadır (70,84).

Mezenkimal kök hücrelerce hücre-hücre reaksiyonunda, baskılayıcı faktörler salınabilir veya etkileri arttırılabilir. 'Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)' enzimi bu mekanizmada rol oynar. Bu enzim 'kynurenine' adlı bağışıklık baskılayıcı bir maddenin tiriptofandan oluşumunu katalize eder. Bu madde otoantijen ve fetal allojenlerin T-hücre cevabını güçlü şekilde baskılar. T-hücre aktivasyonuna bağlı inflamatuar sitokinlerin stimule ettiği MKH'in 'Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)' oluşturduğu tespit edilmiştir (110). Mezenkimal kök hücreler immün cevapta rol oynayan B-hücreleri ve dendritik hücreleri de etkiler (88,89). Mezenkimal kök hücreler dentritik hücrelerin monositlerden farklılaşmasını engellemenin yanında IL-10 üreterek daha toleransı güçlü bir fenotip oluştururlar (89). Bağışıklık sistemini baskılama özelliklerinden dolayı tedavi edici olarak kullanılabilecekleri düşünülmüştür. İlk gözlemlerde MKH'lerin maymunlarda in vivo olarak 'MHC-mismatched' deri greftlerinin yaşayabilirliğini artırdığı görülmüştür (14). Klinik olarak allojen kemik iliği transplantasyonu yapılan bir hastada gelişen 'graft-versus-host' hastalığı allojenik MKH infüzyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir (90).

2.7.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda MKH uygulamalarının serebral hasar, miyokard iskemi/enfarktüs, müsküler distrofi ve kemik kırığı modellerinde hasarlı dokunun iyileşmesini arttırdığı görülmüştür (91). Fakat buna rağmen hala az sayıda klinik çalışmada direkt MKH'lerin etkisi ortaya konmuştur. Allojen kök hücre transplantasyonundan sonra ortaya çıkan 'graft-versus-host' hastalığının önlenmesi ve tedavisinde MKH başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Klinik olarak allojen kemik iliği transplantasyonu yapılan bir hastada gelişen graft-versus-host hastalığı allojen MKH infüzyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir (90,92).

Horwitz ve ark. 'osteogenezis impefecta'lı' 3 çocuğa verilen MKH'lerin tedavi edici etkisini göstermişlerdir (93). Ayrıca metakromatik lökodistrofi ve Hurler sendromunda da allojenik MKH'lerinin terapötik etkileri gösterilmiştir (94).

Mezenkimal kök hücrelerin terapötik potansiyellerinin tam olarak anlaşılabilmesi için alıcı kişinin bağışıklık sisteminin MKH'lere verdiği yanıt, MKH'leri doğru yere yönlendiren alıcının mekanizmaları, kendilerini yenileme ve seçilen hücre yönünde fonksiyonel olarak nasıl farklılaştıkları gibi soruların net bir şekilde cevaplanması gerekmektedir.

2.7.4. Kemik Rejenerasyonunda MKH Bazlı Stratejiler

Friedenstein, Piatetzky-Shapiro ve Petrakova'nın MKH'lerin yeni kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını belirten yayınlarından sonra (95), MKH'lerin yeni kemik oluşumu ve kemik iyileşmesindeki yeri gösterilmiştir. Bir çok çalışmada MKH'lerin deneysel olarak oluşturulan büyük kemik defektlerinin onarımındaki etkinliği gösterilmiştir (91).

Son zamanlarda açık cerrahi gerektirmeyen, enjekte edilebilen taşıyıcılar içine konan MKH'lerin etkinliği araştırılmıştır. Goel ve arkadasları tibia 'non-union' olan hastaların perkutan kemik iliği greftlemesi ile kemik iyileşmeleri sağlamıştır

(17). Tekniklerinin basit, az girişimsel ve düşük komplikasyon oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Siwach ve arkadaşları, gecikmiş, 'nonunion' kırık veya bacak uzatma yapılan ancak 'malunion' olan 72 hastanın 69'unda hastaların perkutan otojen kemik iliği greftlemesi ile iyileşme göstermişlerdir (96).

Geniş kemik defektlerinde MKH emdirilmiş taşıyıcılar ile tedaviler araştırılmıştır. Bu teknikle geniş kemik defektlerinin iyileşmesi sağlanmakla beraber birtakım büyüme faktörleri eklenmesi ile etkinin arttığı tespit edilmiştir (97,98). Borden ve ark. çalışmalarında, polimerik mikrosfer matriks ile kombine edilen kemik morfojenik protein-7'nin MKH'lerin osteojenik 35 aktivitesini arttırdığını tavşanda göstermişlerdir (99). Yoshitake ve ark. biyolojik olarak yıkılabilen ve trikalsiyum sitrat emdirilmiş jelatin porları içine emdirilmiş sıçan MKH'lerinin osteojenik yönde farklılaştığını göstermişlerdir (100).

Kemik rejenerasyonunda MKH bazlı üç temel strateji vardır. Birincil strateji olarak kemik iliği kaynaklı MKH organizmadan alınıp, kültürde çoğaltılıp uygun taşıyıcı ile yine aynı organizmaya verilmesidir (97). Köpekte spinal füzyon modelleri, koyunda ve köpekte femur ve tibiada büyük segmental kemik defekt modelleri bu bağlamda kullanılmıştır (18,101-103). Özellikle köpekte yapılan femur defekt modelinde poröz hidroksiapatit/trikalsiyum (Zimmer, Warsaw, IN), seramik silindirik taşıyıcı ile kullanılan otojen MKH'lerin iyileşmenin özellikle 12. haftasında en yüksek miktarda kemikleşmeyi sağladığı görülmüştür. İkinci srateji olarak MKH hematopetik hücre yüzey belirteçleri içermediğinden immün sistemi uyarmaz, bundan dolayı bunların allojen olarak çoğaltılıp kullanılabilir hücre kültürleri veya bankaları elde edilebilir (14-16,72,104-107). Mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesinde allojen olarak kullanımı köpeğin femurundaki kritik büyüklükteki kemik defektinde araştırılmıştır. Poröz hidroksiapatit/trikalsiyum seramik silindirik taşıyıcı ile kullanılan allojen MKH'lerin yeni kemik oluşturduğu ve çalışmanın hiç bir aşamasında immün rejeksiyona ve antikorlara neden olmadığı tespit edilmiştir (7). Ayrıca yeni kemikleşmenin enkondral yapıdan çok intramembranöz yolla oluştuğu tespit edilmiştir. Femur diafizindeki yeni kemik oluşumunun yeniden

şekillenmesinin de uygun olduğu görülmüştür. Bu çalışma allojen kök hücrelerin, otojen kök hücreler kadar immün rejeksiyona neden olmadan kemik iyileşmesinde etkili olduğunu savunmaktadır. Bu sonuçla allojen MKH'lerin cerrahi olarak kemik iyileşmesi için yapılan ameliyatlarda kullanılabileceği öngörülmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin dondurularak saklanması ve kişinin kendi kök hücre kültürünü beklemeye gerek bırakmaması nedeniyle tercih sebebi olabilir.

Üçüncü strateji, büyük kemik iliği aspiratlarınn (selektif hücre retansiyonu) konsantre edilerek hücre kültürü yapılmaksızın otolog olarak eş zamanlı intraoperatif olarak verilmesidir (108). Ancak bu teknik, kültürle elde edilen MKH konsantrasyonuna erişememektedir.

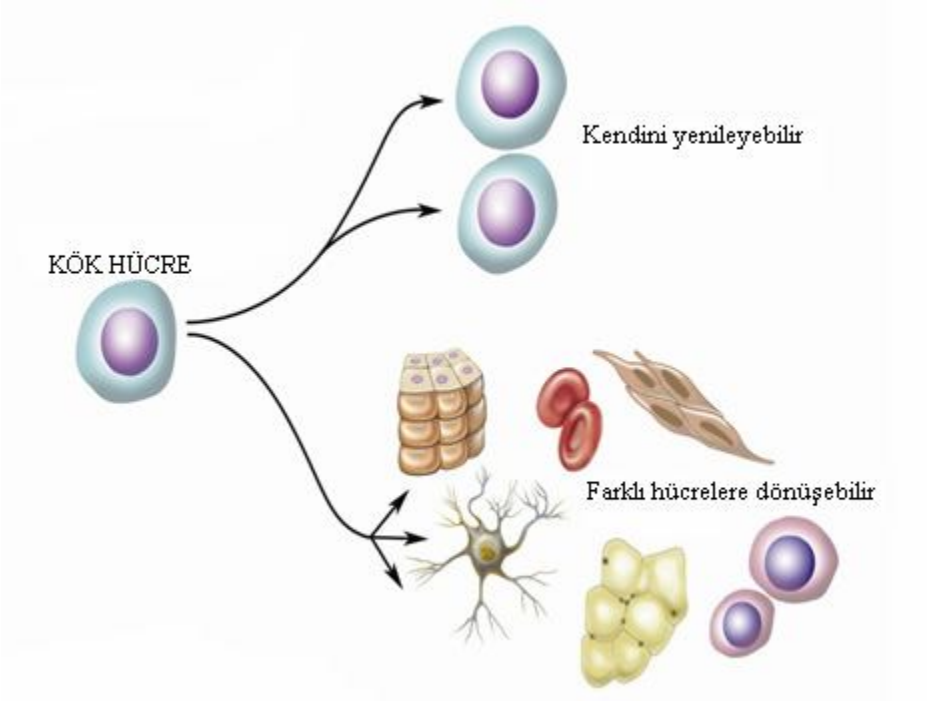
Bu hücrelerin osteoindüktif ve osteokondüktif materyallerle kemik defekti bölgelerine verilmeleri bu hücrelerin yeterli çoğalma ve farklılaşmalarını sağlamıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada DKM ve mineralize kanselöz kemik (çip) kombinasyonu (Allomatrix®, Veterinary Transplant Services, Kent, WA) selektif hücre retansiyonundan elde edilen MKH ile kombine edilmiştir. Bu çalışma sonucuna göre Alomatrix® ile kombine edilmiş selektif hücre retansiyonundan elde edilen MKH otojen kanselöz kemik kadar iyi bir iyileşme paterni göstermiştir.

Buna karşılık MKH'lerin kraniyal kemik defektleri ile ilgili kullanımı literatürde sınırlı sayıda hayvan çalışmalarında mevcuttur. Akita ve arkadaşları yaptıkları çalışmada T-hücre fonksiyonu olmayan 'nude-sıçanlarda' insan kaynaklı MKH'lerin, insan rekombinant kemik morfojenik protein-2 ve rekombinant bazik fibroblastik-büyüme faktör ile baraber verilmesi ile kraniyal kemik iyileşmesini hızlandırdıklarını göstermişlerdir. Chang ve ark. yaptıkları çalışmada insan kemik morfojenik protein-2 genini adenovirüslar yardımı ile kültürde ekspanse ettikleri domuz MKH'lere transfer etmişlerdir. Daha sonra bu MKH'leri tip I kollajen polimer tasıyıcı ile, domuzların kritik kraniyal kemik defeklerindeki iyileşme üzerine etkilerine baktıklarında, iyileşmeyi istatistiksel olarak anlamlı sekilde olumlu etkilediğini göstermişlerdir (109).

2.8. Kök Hücre Ve Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücrelerin Tanınması

Farklı tiplerde hücre ailelerine farklılaşma potansiyeline sahip kök hücrelerin, doku mühendisliği ve gen terapisi alanlarındaki terapötik potansiyelleri çok büyüktür.

Kök hücreler kendini yenileyebilen, uzun süre canlı kalabilen, özelleşmiş hücrelere dönüşebilen hücrelerdir (Sekil 7) .



Şekil 7: Kök hücre

Günümüzde bu tip uygulamalar için iki uygun grup kök hücre vardır:

1. Embriyonik kök hücreler
2. Yetişkin kök hücreler

Embriyonik kök hücreler birden çok değişik potansiyelleri olması dolayısı ile uygulama için uygun gibi gelse de bu hücrelerin elde edilmesinde ve kullanılmasında

hücre regulasyonu problemleri ve etik konular engeller teşkil etmektedir. Buna karşın yetişkin kök hücreler hem immunolojik olarak sorunsuzdur hem de benzer etik sorunları getirmezler. 1961 yılında Moss ve ark., kas dokusunda elde edilmiş satellit hücreleri ve 1963 yılında Becker ve ark., fare kemik iliğinde kendi kendini yenileyebilen hücreleri tanımladılar. Bunlar hematopoietik kök hücrelerdir. Bu tanımlar yetişkin kök hücrelerin ilk tarifleri olmuştur. Bundan sonra McCulloch ve Till'in araştırmaları ile 1960 'lı yılların sonunda çalışmalar hız kazanmış, kemik iliği mezenkimal kök hücreleri tanımlanmış ve 1970'li yılların başında "Ağır Kombine İmmun Yetmezlik" hastaları kemik iliği nakli ile tedavi edilmeye başlanmıştır. 1978 yılında kordon kanında yetişkin hematopoietik kök hücreler bulundu. 1992 yılında nöral kök hücreler tanımlandı (111).

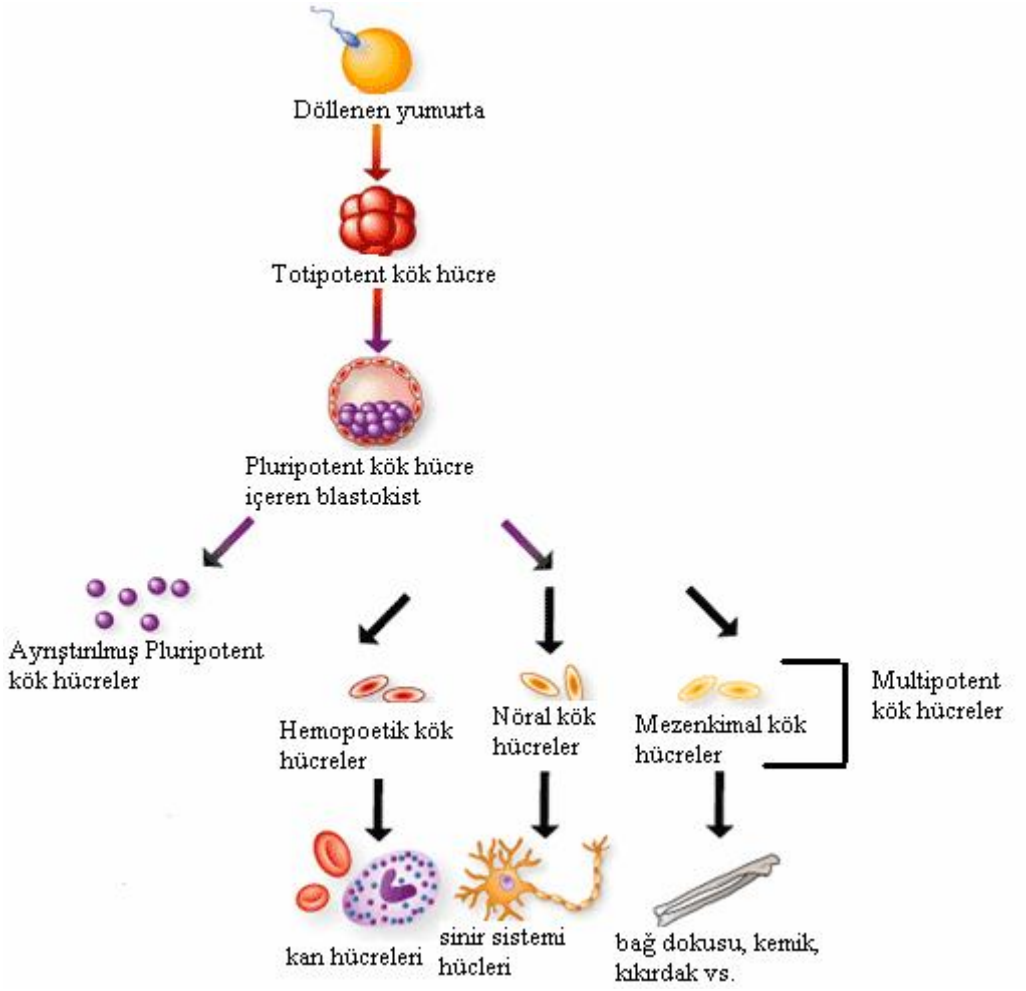
Yetişkin kök hücreler üzerinde yapılan birçok araştırma kemik iliği kaynaklı kök hücreler (KİKKH) üzerinde olmuştur. İnsan kemik iliği embriyonik mezodermden köken alır. Kemik iliği hücre grubu başlıca iki hücre grubundan oluşur; hematopoietik kök hücreler ve destek verici mezenkimal stromal hücreler. Hematopoietik hücrelerin büyüme ve farklılaşmaları iyi dokümante edilmiş olmasına rağmen stromal komponent hakkında bilgiler sınırlıdır. Hem deney hayvanlarında hem de insanlarda söz konusu stromal hücre grubu, heterojen hücre gruplarından oluşmaktadır, gruplardan biri de mezenkimal kök hücreler olarak adlandırılan bir grup hücredir. Mezenkimal kök hücre grubu üzerinde yapılan çalışmalar, bu hücrelerin adiposit, kondrosit, myoblast ve osteoblast hücrelerine farklılaşabildiklerini göstermiştir (112).

Doku mühendisliği için kemik iliğinden elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin umut verici olduğunu gösteren deneysel çalışmalar yapılmıştır. Dolayısı ile mezenkimal kök hücre grubu gelecekteki doku mühendisliği statejileri için önemli bir kaynak teşkil etmektedir. Öte yandan geleneksel kemik iliği biyopsi yöntemleri genel veya spinal anestezi gerektirecek kadar ağrılı olmakta, bu şekilde alınan materyalden ancak az miktarlarda mezenkimal kök hücre elde edilebilmektedir. Miktarın bu kadar az olması ex-vivo bir ekspansiyon işlemi gerektirmekte ve bu da zaman alıcı ve pahalı olmasının yanı sıra, hücre kontaminasyonu ve hücre kaybı

olasılığını getirmektedir. Böylece hastanın konforunu çok bozmayan ve hücre ekspansiyonunu gereksiz kılacak kadar hücre sayısını sağlayan, kolay bir teknikle kök hücre elde etme olanağı sağlayacak bir kaynak arayışı başlamıştır. Vücuttaki çoğu dokuda o dokuya farklılaşmaya programlanmış, bir çeşit kök hücre grubunun, bakım ve onarım için kullanılmak üzere varlığı bilinmektedir. Ek olarak çeşitli deney hayvanlarının birden çok organının içinde, farklılaşma programı o dokuya ait olmayan kök hücrelerin varlığı gösterilmiştir. Yağ dokunun da kemik iliği gibi embriyonik mezodermden köken alması ve heterojen stromal hücre topluluğu içeriyor olması, yağ dokudan kök hücre elde edilebileceği fikrini doğurmuştur (112).

2001 ve 2002 yıllarında Zuk ve ark., yağ dokudan, birden fazla farklı doku gruplarına farklılaşma yeteneği bulunan bir kök hücre topluluğunu ilk olarak izole etmeyi başarmışlardır (112,113). Bu hücre topluluğunun farklı öncü hücrelerden oluşan bir topluluk olmadığı, tek bir tip hücre olduğunu kanıtlamışlar ve bu hücreleri YDKKH (Yağ Doku Kökenli Kök Hücre) olarak tanımlamışlardır. Bu hücrelerin adipojenik, kondrojenik, osteojenik ve myojenik gibi farklı mezodermal hücre tiplerine farklılaşma yetenekleri gösterildi. Yanı sıra ektodermal menşeyli doku gruplarına farklılaşma da gösterilmiştir; nöron, oligodendrosit benzeri hücreler, fonksiyonel Schwan hücresi ve epidermal diziden hücreler. Ek olarak hepatosit ve pankreas adacık hücreleri gibi endodermal diziden bazı hücrelere farklılaşmaları sağlanmıştır. Bu hücrelerin embriyonal kök hücreler kadar fazla potansiyelleri olduğu ve üç germ dizisine de farklılaşabildikleri savunulmuştur (112,113).

Yağ dokusundan elde edilen kök hücreler eriskin kök hücrelere örnektir ve mezenkimal kökenlidir. (Şekil 8)



Şekil 8: Kök hücre tipleri

İlk tanımlandığından bu yana YDKKH'lerle sayıca çok fazla çalışma yapılmıştır. En yaygın araştırma konuları doku iyileşmesi ve rejenerasyonudur. İskemi sonrası revaskülarizasyon, kalp-damar sistemi rejenerasyonu, kemik-kıkırdak defektlerinin onarımı, intervertebral disk yenilenmesi ve üriner sistem rekonstrüksiyonu araştırılan en sıcak konulardır. Fakat bunlar dışında YDKKH ile deney hayvanlarında tendon iyileşmesinde ve periferik sinir iyileşmesinde gelişme, akut spinal kord yaralanmalarında iyileşme ile diabetik hayvanlarda kan şekerinde ve karaciğer hasarlı hayvanlarda karaciğer enzim düzeylerinde düşme sağlanmıştır (111).

Bazı yazarlara göre YDKKH'lerin yağ dokudaki hangi hücrelerden köken aldıkları tam olarak bilinememektedir. Kimi araştırmacılar bu hücrelerin endotele farklılaşma yeteneklerinden dolayı kan damarlarını çevreleyen perisitleri temsil ettiğini savunurken, farklı araştırmacılar bu hücrelerin yağ doku içindeki fibroblastların bir alt grubu olabileceğinden şüphelenmektedirler (113,114).

2.8.1. Yağ Doku Kökenli Kök Hücrelerin Plastik Cerrahideki Yerleri

Elde edilme yöntemleri sebebiyle ilk tarif edildiklerinden beri kök hücreler plastik cerrahlar tarafından ilgi görmektedir. Doku mühendisliği çalışmalarında mezenkimal kök hücrelerle ve klinikte yağ doku tranferleri ile çalışmaya alışık olan rekonstrüktif cerrahlar arasında YDKKH kolaylıkla kabul görmüştür. YDKKH'ler ile yapılan klinik çalışmalar başta yağ dokusu olmak üzere doku transferlerinin sonuçlarını düzeltmeye ağırlık vermiştir. Deneysel çalışmalar ise YDKKH'lerin yeni damar oluşumu, doku veya doku onarımları için kemik, kıkırdak, kas ve yağ dokusuna farklılaşma özellikleri üzerine olmuştur (114).

YDKKH elde etmek için yağ emme yöntemi ile alınan yağda hemen çalışılmaya başlanabilir, eğer yağ dokusu abdominoplasti ya da başka bir tür vücut şekillendirme ameliyatı ile elde edilmişse çalışmaya başlamadan önce yağ dokunun çok küçük parçalara bölünmesi gereklidir (mikrodisseksiyon). Bundan sonra sırasıyla, eritrosit sayısını azaltmak için yıkama, kollajenaz sindirimi, arkasından filtrasyon ve santrifüj yapılır. Elde edilen süspansiyonda, stromal vaskuler fraksiyonda YDKKH bulunur. Bu aşamadan sonra bu fraksiyon direkt olarak kullanılabileceği gibi kültür ortamına koyularak çoğaltılabilir (114). Stromal vasküler fraksiyon ile "aşılanmış" ya da "zenginleştirilmiş" yağ dokusu transferlerinin, yüz atrofisi, kozmetik meme büyütme gibi alanlarda başarılı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir (115,116).

Kültüre konan ve çoğaltılan YDKKH'lerin olası bir uygulama alanı, dokularda hücre tedavisi ile neovakülarizasyonun sağlanmasıdır. Neovaskülarizasyon tedavisi doku greftlerinin yaşayabilirliğinin ve iskemik dokuların iyileştirilmesi

üzerinde umut vaat etmektedir. Flep cerrahisi sonrasında, tam veya kısmi doku iskemisi ve nekroz seyrek rastlanılan bir sorun değildir. Bu sorun flebin beslenmesinde bir bozuklukla ilgilidir. Cerrahi teknik dışında, hastada sigara içiciliği, diabetes mellitus, periferik arter hastalığı gibi sebepler de buna neden olabilir.

Dokuda yeni damar gelişimi anjiogenez ve vaskülogenez olarak iki ayrı grupta incelenir. Anjiogenez mevcut kapillerlerden tomurcuklanma ve uzama ile yeni dal oluşması olarak tarif edilebilir. Burada endotel hücreleri uyarılarak bölünür ve çoğalır. Vaskülogenezde ise embriyonal mezodermal hücreler öncelikle anjioblastlara ve ardından endotelyal hücrelere farklılaşırlar (117).

Daha önce vaskülogenezin sadece embriyonal dokularda geliştiği düşünülüyordu, Ashara ve ark. 1997 yılında periferik kandan elde edilmiş hematopoietik öncü hücrelerin invitro ortamda endotelyal bir fenotipe farklılaşabildiklerini göstererek yetişkin dokularda da vaskülogenez olabileceğini kanıtlamıştır (118).

Vaskülogenez, sadece embriyoda değil yetişkin dokularda da varlığı gösterildiğinden beri iskemik dokuların kurtarılmasında ilgi çeken bir hedef olmuştur. Flep yaşayabilirliğini artırmak için terapötik vaskülogenezin uygulanabileceği fikri ile bazı çalışmalar yapılmıştır. Anjiogenez ve vaskülogenezi uyarabilecek "vascular endothelial growth factor" (VEGF; damar endoteli büyüme faktörü) gibi büyüme faktörlerinin kullanımı başarılı olmuştur (119). Fakat sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin yarı ömrünün kısa olabilmesi, hem anjiogenez hem de vaskülogenez için farklı sitokinlerin ve faktörlerin, farklı zamanlarda etkimesi gerekliliği ve benzeri sebeplerden dolayı, tek başlarına başarılarının sınırlı olabileceği düşüncesi benimsenmeye başlamıştır (120,121).

Dokuya yeni damar gelişimini uyaran sitokinler yerine yapıtaşı olarak kök hücre verilmesi, yeni damar gelişiminin ortamdaki belirli sayıda endotelyal hücrelerle sınırlı kalmamasını sağlar. Bir veya birkaç sitokinin dokuya

uygulanmasından ziyade birçok farklı hücreye farklılaşabilme potansiyeline ve muhtemelen karmaşık vaskülogenez basamaklarını düzenleyici etkiye sahip kök hücrelerin terapötik vaskülogenez için kullanılmaları savunulmaktadır (119).

YDKKH'lerin gösterilmiş olan vaskülogenez potansiyelleri endotelyal hücrelere farklılaşma yeteneklerinin yanı sıra salgıladıkları büyüme faktörlerinden de kaynaklanmaktadır. YDKKH'lerin invitro ortamda VEGF salgıladıkları gösterilmiştir (122-124).

2006 yılında Mizuno ve ark., rastgele beslenen cilt fleplerinde damarlanmayı artırmak için, fleplere YDKKH uygulaması sonrası fleplerde canlılığın arttırılabildiğini ve damarlanma artışı sağlanabileceğini göstermiştir (119).

Verilen YDKKH'lerin yeni damar yapısında endotel olarak yer aldıklarını gözlemişlerdir. YDKKH'lerin ayrıca ratlarda iskemik arka uzvu kurtardığı, myokard enfarktüsü sonrası kalp ventrikül fonksiyonlarını düzelttiği gösterilmiştir (125,126).

2.9. Adipoz Doku

Yağ dokularının aktarımı, plastik cerrahide ham onarım hem de kozmetik amaçlı uygulamalarda başvurulan yöntemlerden biridir. Yağ dokularının aktarmı sırasında cerrahiden sonraki geç dönemde sık karşılaşılan problemlerden biri, aktarılan yağ dokularının canlılık ve kalıcılık oranlarıdır. Kalıcı sonuçlar elde edebilmek amacıyla litartürde çeşitli cerrahi ya da cerrahi dışı yöntemler belirtilmiştir. Ancak yağ dokularının aktarım amacıyla hazırlanması aşamasında satandat ve vücudun bir yerinden başka bir bölgesine nakli esnasında ya da sonrasında canlı kalan yağ doku oranı, kulanlar tekniğe göre değişiklik göstermektedir. Literatürde ve pratik uygulamalarda yüksek frekanslı santrifüj uygulamasının yağ canlılığını azlttığı ileri sürülmektedir. Santrifüj işleminin yetersiz yapılması ise katı yağ oranının azalmasına, aktarılan dokunun eriyen içeriğinin gerekenden fazla olmasına neden olmaktadır. Sonuçta erken dönemde aktarılan yağ

dokusu yeterli bir kontür sağlamış gibi gözükmekte ancak geç dönemde yağ dokusununu içerisindeki eriyen doku miktarının fazla olması nedeniyle beklenen olumlu sonuç elde edilememektedir. Bu nedenle santrifüj işleminin yağ doku aktarımında zorunlu olduğu belirtilmektedir. Çeşitli otör ve merkezlerin kilink tecrübesine göre bu santrijüj yoğunluğu değişiklik göstermektedir. Literatür incelemesinde ideal santrifüj frekansına ait yeterli sayıda çalışmaya rastlanamamıştır.

Yağ hücreleri doku büyütmede kullanılan en eski materyallerden biridir. Hemifasiyal atrofi, akne skarları, travmatik skar, radyodermatit, skleroderma, liposuction sırasında oluşan depresyonlar, cerrahi eksizyonlar sonrasında oluşan deformiteler gibi pek çok etiyolojik sebebe bağlı olarak vücut kontürlerinde oluşan deformiteler, hastalarda fizik ve emosyonel problemler yaratmaktadır. Liposuction işlemi sıranıda elde edilen otolog yağ dokusunun, yağ grefti olarak vücudun çeşitli bölgelerinde dolgu maddesi şeklinde kozmetik ya da rekonstrüktif amaçlı kullanım bu çeşit problemlerin ortadan kaldırılmasında son yıllarda çok yaygın bir prosedür olarak kullanılmaktadır. Yağ doku aktarımları ile ilgili makro ve mikro düzeyde birçok teknik geliştirilmeye devam etmektedir. Bu konu ile ilgili deneysel bazdaki çalışmalar incelendiğinde yağ dokusunun aktarımı sırasındaki hazırlık aşamasında santrifüj oranıyla ilgili farklı görüş ve uygulamaların bulunduğunu görmekteyiz. Literatür verileri incelendiğinde, alınan yağ dokularının, Coleman'ın tarif ettiği tekniğe göre 4 dakika süreyle 3500 devir/dk. santrifüj işlemine tabi tutulduğu ve ardından yeni lokalizasyonuna aktarıldığı görülmektedir. Coleman, elde ettiği sonuçların kabul edilebilir oranda olduğunu belirtmektedir (127).

Bizim çalışmamızda, genel anestezi altında sıçan inguinal yağ yastıkçığı alanından alınan yağ dokusuna 3500 devirde 4 dakika santrifüj işlemi uygulandıktan sonra altta kalan yağ doku kökenli kök hücreden zengin materyal oluşturulmuş sağ zigoma defekt alanına uygulandı.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Düzce Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 15.09.2011 tarih ve 2011/003 karar numaralı izni ile, Düzce Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında gerçekleştirildi.

Araştırmada kök hücreden zengin yağ dokusunun sıçan zigoma kemik defekt modelinde kırık iyileşmesi üzerine pozitif etkisinin varlığı ve düzeyi incelendi.

Daha önce elde edilen verilerle karşılaştırma yapmayı olanaklı kılan veri tabanları bulunması, bu çalışmanın yapılabilmesi için uygun doku, boyut ve anatomiye sahip ve insandaki durumu simüle etmek için çok uygun bir fizyolojik model oluşturması sebebiyle sıçan modeli kullanılması kararlaştırılmıştır.

Bu çalışmada; yirmi erişkin (15 aylıktan büyük) yaş grubuna ait Wistar-Albino erkek sıçanlar kullanıldı. Erişkin sıçanların ortalama ağırlığı 300-350 gram olarak ölçüldü.

Sıçanların sağ zigomatik kemiklerinin deney grubunu, sol zigomatik kemiklerinin kontrol grubunu oluşturması planlandı. Yirmi sıçanın her iki zigomasına lateral insizyon ile ulaşıldı (Resim 2) ve ark orta kısmında 3mm'lik standart kemik defektleri oluşturuldu (Resim 3-4). Kemik defektinin 3mm ebatı, adult zigomasının kritik defekt ebatı olduğu için tercih edildi. Kemik fragmanı uzaklaştırıldı.

Deney grubunu oluşturan sağ zigomatik ark kemik defektinin bulunduğu alana inguinal yağ yastıkçığı alanlarından alınmış olan yağ dokularına santrifüj işlemi uygulanarak elde edilen kök hücreden zengin materyal enjekte edildi (n:20 zigoma). Ve yağ enjeksiyonunun kemik defekt iyileşmesindeki rolü araştırıldı.

Kontrol grubunu oluşturan sol zigomatik ark kemik defektinin bulunduğu alan kendi halinde iyileşmeye bırakıldı (n: 20 zigoma).

3.1. Kullanılan Hayvanlar ve Gereçler

Türü: Wistar-Albino, erkek sıçan.

Yaş: Erişkin sıçan (15 aylık).

Adet: 20 adet.

Ağırlığı: 300-350 gram.

Grup sayısı: 1. grup (deney grubu) 20 adet sıçanın sağ zigomatik kemiği,
2.grup (kontrol grubu) 20 adet sıçanın sol zigomatik kemiği.

Çalışılan model: 3mm defekt içeren zigoma kırığı.

Deri onarımı için 4-0, 16 mm, keskin uçlu, ipek sütür materyali.

Kullanılan aletler:

1cc'lik insülin enjektörü,

15 numara bistüri,

Bir adet 3 mm uçlu osteotom,

Bir adet periost elevatörü,

Bir adet kaba portegü,

Bir adet makas,

Bir adet Adson penset.

Bir adet Petri kutusu (Şekil 16a).

2cc'lik kuru tüp (Şekil 16b).

Pipet (Şekil 16c).

Diğerleri:

Ringer laktat solüsyonu,

Ketamin 100 mg/ml,

Povidon iodine %10

Vorteks cihazı

Santrifüj cihazı

3.2. Gruplar

Gruplar aynı hayvandaki deney ve kontrol grubu farklarını da inceleyebilmek amacıyla aşağıdaki biçimde oluşturuldu.

1. grup (deney grubu: 20 zigoma): 20 adet sıçanın sağ zigomatik ark orta kısmında 3 mm.'lik kemik defekti oluşturuldu. İnguinal yağ yastıkçığı alanlarından alınan yağ dokularna santrifüj işlemi uygulanarak elde edilen kök hücreden zengin materyal sağ zigomatik ark kemik defektinin bulunduğu alana enjekte edildi.

2. grup (kontrol grubu: 20 zigoma): 20 adet sıçanın sol zigomatik ark orta kısmında 3 mm.'lik kemik defekti oluşturuldu. Kendi halinde sekonder iyileşmeye bırakıldı.

3.3. Kırık Modeli

Kafatasında oksipital hattın üst kısmında yer alan kemikler filogenetik açıdan membranöz kökenlidirler. Bu yapılar temporal kemiğin skuamöz kısmı, zigoma, maksilla, nazal kemikler, mandibulanın bir kısmını kapsamaktadır.

Bu çalışmada zigoma şu nedenlerle tercih edilmiştir:

1- Kalvaryum gibi saf membranöz kemiktir.

2- Birbirinden uzak olması nedeniyle yara iyileşmesinde etkileşim olmadan sıçanın her iki tarafında çalışmak mümkündür.

3- Karşılaştırmalı radyolojik görüntü elde etmek için uygundur.

4- Kırık fragmanlarını uygun pozisyonda tutmak için fiksasyon yöntemi gerektirmez, stabil bir kırık modelidir. Böylece hareket ve yabancı cismin kırık iyileşmesi üzerine etkisi ortadan kalkmaktadır (68,128,129).

5- Daha önce mezenkimal kök hücrelerin kemik rejenerasyonu üzerine etkisini göstermede zigomatik kemik ile ilgili deneysel çalışmanın yapılmamış olması literatüre katkı sağlayacaktır.

3.4. Bakım

Sıçanlar 12 saat sürüyle ışık gören, 12 saat süreyle karanlık olan sıçanlar için özel hazırlanmış ortamda; yiyecek ve içeceğe istedikleri zaman ulaşabildikleri, her kafes içinde iki sıçan yer alacak biçimde barındırıldılar. Tüm ratlar deney öncesi ve deney süresince standart laboratuar yemi ile beslendiler.

3.5. Ameliyat Tekniği

Deneysel araştırma başlamadan önce, tasarlanmış olan çalışma planı 4 sıçan üzerinde pilot çalışma yapılarak denendi. Böylece operasyon tekniği ve deney planı iyileştirildi. Operatif tekniğin detayları aşağıda anlatılmıştır.

3.5.1. Sıçan Mezenkimal Kök Hücrelerin (sMKH) Elde Edilmesi

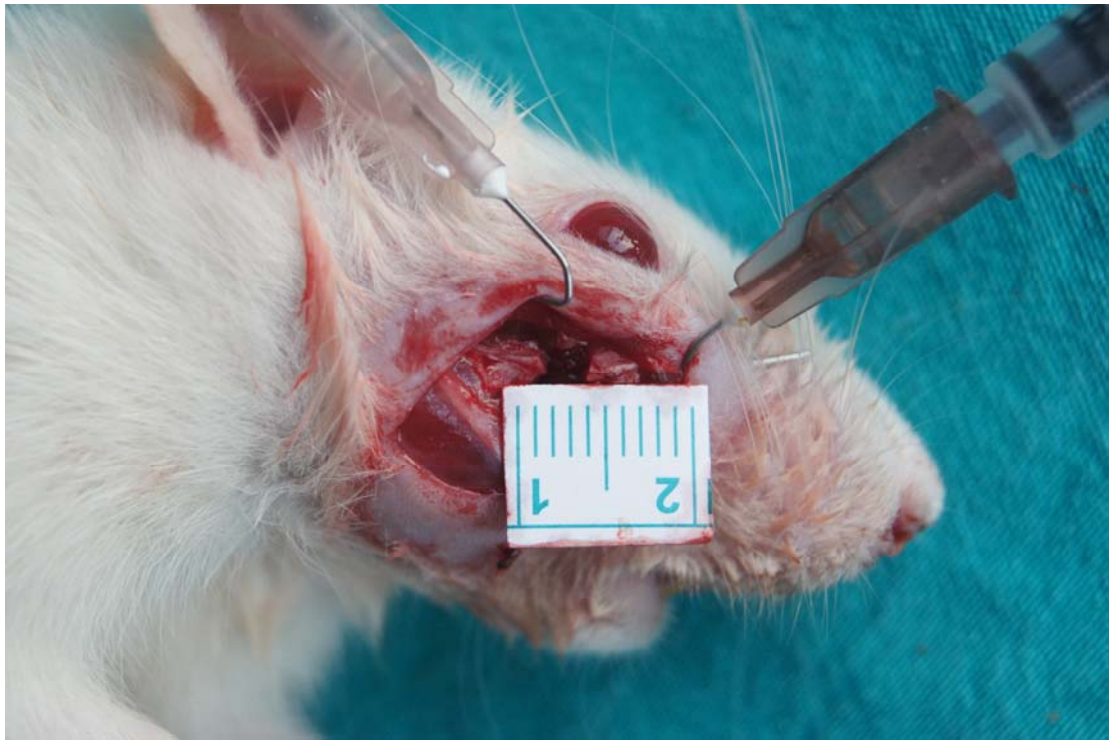
Ratların inguinal bölge deri altı yağ dokularında kök hücre bulunduğu ve bu hücrelerin farklı uyaranlarla osteosit, kondrosit, düz kas hücresi, nöral hücre vs. dönüşebildiği bilinmektedir (130). Anestezi altındaki ratların inguinal bölgeleri traşlandı (Sekil 12) steril %10 povidon iyot ile temizlendi (Sekil 13). İnguinal krize paralel olarak yapılan insizyon ile girilerek (Sekil 14) inguinal yağ yastıkçığından 1 adet 2x1cm büyüklüğünde yağ dokusu eksize edildi (Şekil 15). İnsizyon alanı 4/0 ipek sütür ile dikildi. Çıkarılan yağ dokuları birkaç kez %0.09 NaCl ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra dokular kuru bir petri kutusuna alınıp bistüri yardımıyla en büyük parça 1mm3 oluncaya kadar kıyıldı (Sekil 17). 5 ml lik ratların numaraları verilen kuru tüplere 1 ml yağ dokusu ve 1ml SF eklendi yağ dokularında homojenizasyon sağlanana kadar vortekslendi (İçindeki hücrelere zarar vermeden

yağ dokusunu çok küçük parçalara ayırıp, homojen hale gelmesini sağlamak amacıyla 2400RPM devirde 2 saniye çalkalanması sağlandı) (Şekil 18). Daha sonra santrüfüj cihazına konulan tüpler 3500 RPM'de 4 dakika santrifüjlendi (Şekil 19). Santrifüj edildiğinde oluşan süspansiyon üç kısma ayrıldı; üstte olgun yağ hücrelerinden açığa çıkan trigliserit, ortada olgun yağ hücreleri ve en altta stromal vasküler fraksiyon (Preadiposit, fibroblast, endotel hücresi, kök hücre) (Şekil 20). Santrifüj sonrası elde edilen tüpün üst kısmındaki matür adipositlerden oluşan süpernatant kısmı uzaklaştırıldı. Dibe çöken pellet kısım filtreden süzülerek sağ zigoma kemik defekti alanına pipet ile konulduğu yerden kaymayacak şekilde yerleştirilmeye çalışıldı. Deri 4-0 separe olarak konan ipek sütürlerle kapatıldı.

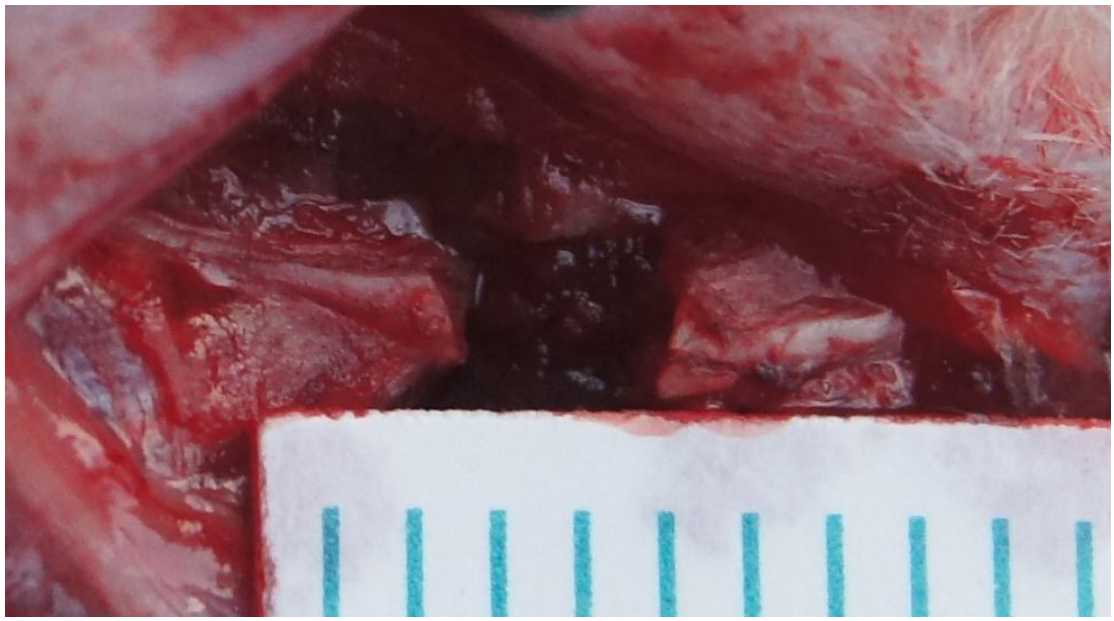
Ratlardan alınan yağ dokuları aynı rata uygulandı. Yağ enjeksiyonları santrifüj sonrasında, önceden hazırlanmış olan zigomanın üzerine bekletilmeden enjekte edildi (Şekil 21).



Şekil 9: Zigomatik arkın lateral insizyon ile ortaya çıkarılması.



Şekil 10: Kemik defektinin makroskobik görünümü



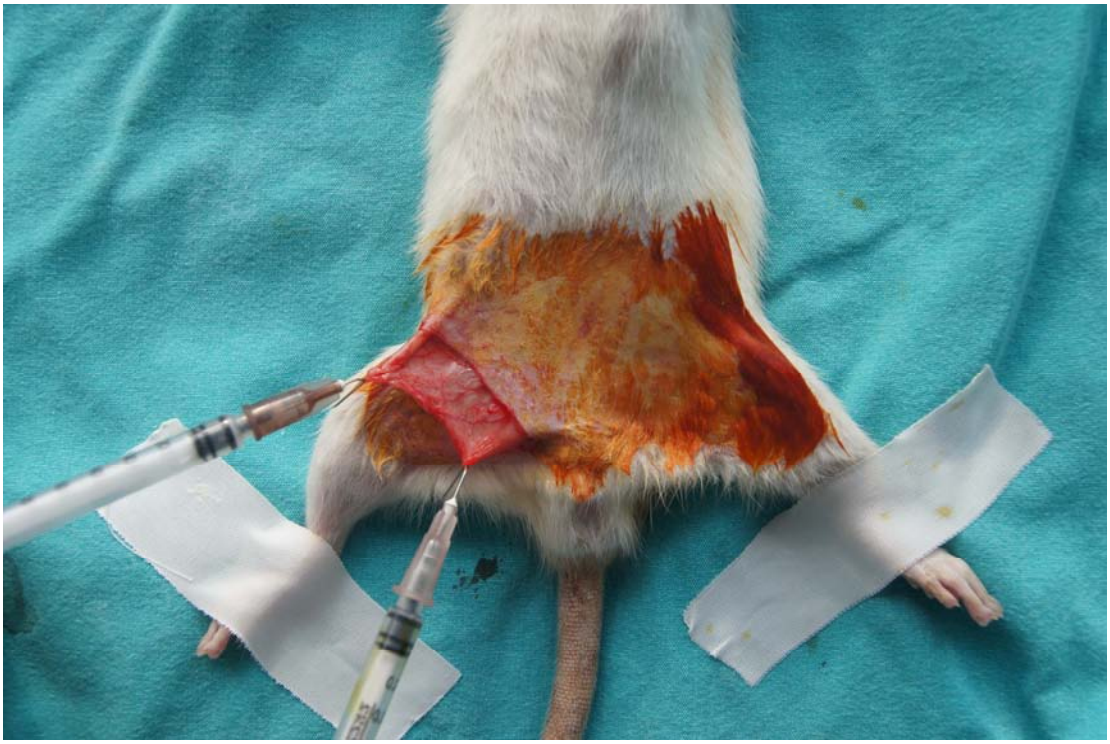
Şekil 11: Zigomatik arkın orta bölgesinde oluşturulmuş 3mm'lik defekt içeren kırık modeli. Mikroskobik görünüm.



Şekil 12: Yağ elde etmek için inguinal yağ yastıkçığına ulaşmak için inguinal bölgenin traşlanması.



Şekil 13: Povidon iyot ile temizlik



Şekil 14: İnguinal yağ yastıkçığının kaldırılışı (tek taraflı).



Şekil 15: İnguinal yağ yastıkçığı (tek taraf)



Şekil 16: Ekipman (a: Petri kutusu, b: 2 cc lik kuru tüp, c: Pipet)



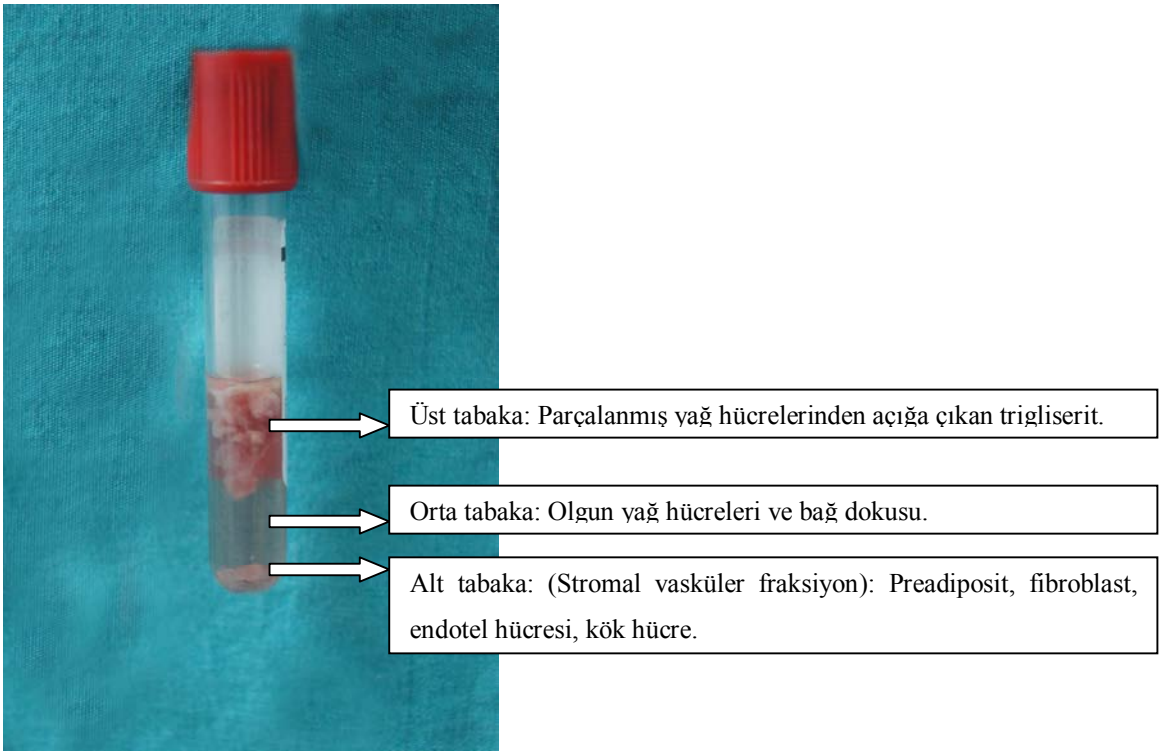
Şekil 17: Bistüri ile kıyılmış inguinal yağ yastıkçığı.



Şekil 18: Vorteks aleti: Bir test tüpü içindeki solüsyonun girdap oluşturacak şekilde ve iyice karıştırılmasını sağlayan alet.



Şekil 19: Santrifüj aleti



Şekil 20: Fraksiyonlarına ayrılmış yağ dokusu.



Şekil 21: Sağ zigomatik alana pipetle yağ dokudan kaynaklı kök hücre içeren materyalin aktarılması.

3.5.2. Kırık Modelinin Oluşturulması

Erişkin sıçanların genel anestezisi intramuskülar ketamin enjeksiyonu (100 mg/kg) ile sağlandı. Lateral insizyonlar ile operasyon alanına ulaşılarak her iki zigoma ortaya çıkarıldı. Erişkin sıçan zigomasının yaklaşık olarak 2-3 mm eninde, 7-8 mm uzunluğunda olduğu gözlendi. Her iki zigomada ince bir osteotom kullanarak ark orta kısmında 3 mm'lik kemik defekti oluşturuldu. Kemik fragmanı ortamdan uzaklaştırıldı. Zigoma ortasında kemik defekti oluşturma işlemi yirmi erişkin sıçanın tamamına ve her iki zigomasına uygulandı. Sonuç olarak her bir sıçanda 2 adet kritik boyutta defekt oluşturulmuş zigoma kemik defekti elde edildi.

1. grupta (n:20 zigoma): Sağ zigomatik ark orta kısmında 3 mm.'lik kritik boyutta kemik defekti oluşturuldu. İnguinal yağ yastıkçığı alanlarından alınan yağ dokularına santrifüj işlemi uygulanarak elde edilen kök hücreden zengin materyal

sağ zigomatik ark kemik defektinin bulunduğu alana enjekte edildi. Bu işlem toplam 20 sıçanın sağ taraf zigomalarına uygulandı.

2. grup (n:20 zigoma): 1. gruptaki sıçanların sol zigomatik ark orta kısmında 3 mm.'lik kritik boyutta kemik defekti oluşturuldu. Kendi halinde iyileşmeye bırakıldı. Bu işlem 20 sıçanın solda yer alan toplam 20 zigomasında uygulandı.

Deneklerin takiplerinde 2 denek postoperatif komplikasyonlar nedeniyle kaybedildi. 18 denek araştırmayı tamamladı.

Onuncu haftada, 5 sıçana; yirminci haftada, geriye kalan 13 sıçana tekrar anestezi yapıldı ve üç boyutlu bilgisayarlı tomografi (BT) filmi çekildi. Yirminci haftada BT filmi çekildikten sonra operasyon alanları açıldı. Makroskobik inceleme yapıldı ve her iki zigoma histolojik çalışma yapmak amacıyla defekti ve her iki fragman ucunun bütünlüğü korunacak biçimde alındı. Ardından intrakardiak ketamin uygulayarak sakrifikasyon işlemi gerçekleştirildi.

3.6. Değerlendirmeler

3.6.1. Klinik Değerlerdirme

Cerrahi alanında makroskobik değerlendirme, defekt oluşturulmuş bölgede kırık fragmanların stabilitesi ve gap mesafesinin tamamen kapanıp kapanmaması gözetilerek yapıldı.

3.6.2. Radyolojik Değerlendirme

Operasyondan sonraki 10. haftada 5 sıçana, 20. haftada 13 sıçana her iki zigomayı gösterecek şekilde üç boyutlu bilgisayarlı tomografi (BT) filmi çekildi. Üç boyutlu BT çalışması, gruplar arasında kemik rejenerasyonu açısından oluşacak küçük farkları bile tesbit edebilmek amacıyla tercih edildi.

3.6.3. Histolojik Değerlendirme

Operasyon sonrası 10. hafta (n: 5 sıçan; 10 zigoma) ve 20. haftada (n: 13 sıçan; 26 zigoma) bilgisayarlı tomografi çalışmasından sonra, operasyon alanları lateral insizyon ile açıldı ve zigoma kemikleri bütün arkı alacak biçimde çıkarıldı. Zigomatik arklar kırık hattı iyileşmeyen sıçanlarda, aradaki yumuşak dokuların bütünlüğünün bozulmamasına özen göstererek en bloc biçimde alındı. Doku örnekleri hemen %10'luk fiksatif formalin içine konuldu ve 1 gün bekletildi. Ardından nitrik asit içinde dekalsifiye edildi, parafin içine gömüldü ve defekt kısmını içeren horizontal kesitler alındı. Her bloktan 3-5 adet olacak biçimde 4-mikron kalınlığında seri kesitler elde edildi. Preparatlar hematoksilen-eosin ile boyandı, ışık mikroskobu altında incelendi. Kemik iyileşmesi, spesmenlerin hangi gruba ait olduğunu bilmeyen uzman bir patolog tarafından değerlendirildi. Uygun bulunan yerlerden fotomikrograflar alındı.

3.7. İstatistiksel Analiz

Üç boyutlu BT filmlerinden hesaplanan kemik rejenerasyon miktarı, kök hücreden zengin yağ dokusu yerleştirilmiş sağ zigoma kritik kemik defekti ve hiçbir işlem yapılmamış sol zigoma kritik kemik defekti olan 2 grubun kemik rejenerasyon miktarları karşılaştırıldı. Ayrıca, yağ doku kökenli kök hücreden zengin materyalin membranöz kemik iyileşmesi üzerine olan etkisini değerlendirmek için, gruplar arasında da aynı şekilde karşılaştırma yapıldı. Bu amaca yönelik olarak Wilcoxon signed rank testi kullanıldı. $P< 0.05$ istatistiksel açıdan anlamlı olarak değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Değerlendirme Sonuçları

Onuncu ve yirminci haftalarda operasyon alanı tekrar açıldığında öncelikle zigomayı çevreleyen yumuşak dokular incelendi. Hiçbir denekte inflamasyon bulgusuna rastlanmadı ve makroskobik olarak yumuşak dokulardaki iyileşme normal olarak değerlendirildi. Yağ dokusundan elde edilmiş kök hücreden zengin materyal konuldukları yere tamamen entegre olmuşlardı ve çevre dokudan ayırt edilemiyorlardı. Onuncu ve yirminci haftalarda kırık defekti olan alanların farklı düzeylerde olmakla beraber, granülasyon dokusu ile dolduğu gözlendi.

Onuncu hafta;

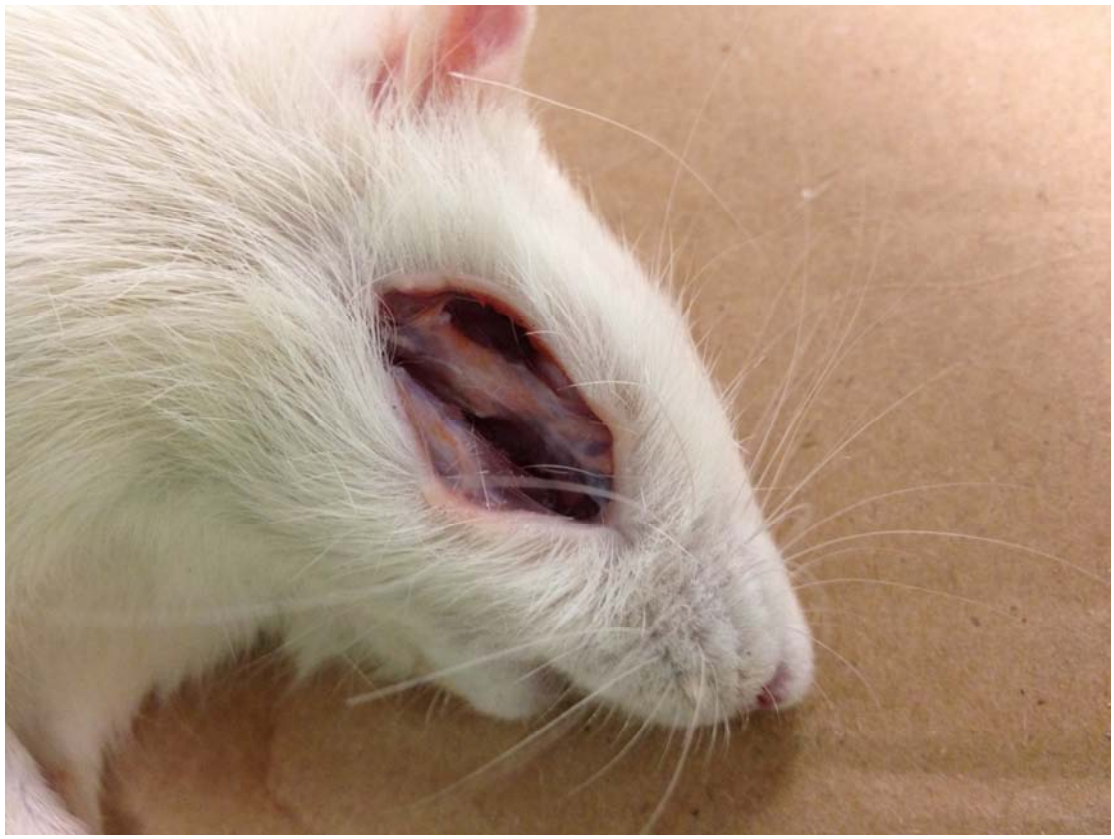
Deney grubunda (sağ taraf zigoma) 5 zigomanın 1'inde (%20) kısmi kemik rejenerasyonu ve kalın fibröz bağ dokusu ile birleşmiş stabil kırık hattı gözlendi. Geri kalan 4 zigomada ise mobil kırık hattı ve kemik defektinin yumuşak granülasyon dokusu ile kaplı olduğu gözlendi.

Kontrol grubunda (sol taraf zigoma) 5 zigomanın hiçbirinde (%0) tam ya da kısmi kemik rejenerasyonu ve stabil kırık hattı gözlenmedi. Beş zigomanın 5'inde mobil kırık hattı ve kemik defektinin yumuşak granülasyon dokusu ile kaplı olduğu gözlendi.

Yirminci hafta;

Deney grubunda (sağ taraf zigoma) 13 zigomanın 4'ünde (%31) tam kemik rejenerasyonu ve stabil kırık hattı gözlendi (Resim 22). Kısmi kemik rejenerasyonu olan 5 (%39) zigomada ise kırık hattı kalın fibröz bağ dokusu ile birleşmişti. Geri kalan 4 zigomada ise mobil kırık hattı ve kemik defektinin yumuşak granülasyon dokusu ile kaplı olduğu gözlendi.

Kontrol grubunda (sol taraf zigoma) 13 zigomanın 1'inde (% 7.6) tam kemik rejenerasyonu ve stabil kırık hattı gözlendi. Kısmi iyileşme olan 1 (% 7.6) zigomada ise kırık hattı kalın fibröz bağ dokusu ile birleşmişti. Geri kalan 11 zigomada ise mobil kırık hattı ve kemik defektinin yumuşak granülasyon dokusu ile kaplı olduğu gözlendi.



Şekil 22: Yirminci haftada klinik değerlendirme. Kemik iyileşmesini gözleyebilmek amacıyla zigoma üzerini kaplayan yumuşak dokular uzaklaştırıldı. Birinci gruba ait olan bu örnekte tam kemik iyileşmesi gözleniyor. (Yağ dokudan kaynaklı kök hücre eklenmiş grup)

4.2. Radyolojik Değerlendirme Sonuçları

4.2.1. Onuncu Hafta

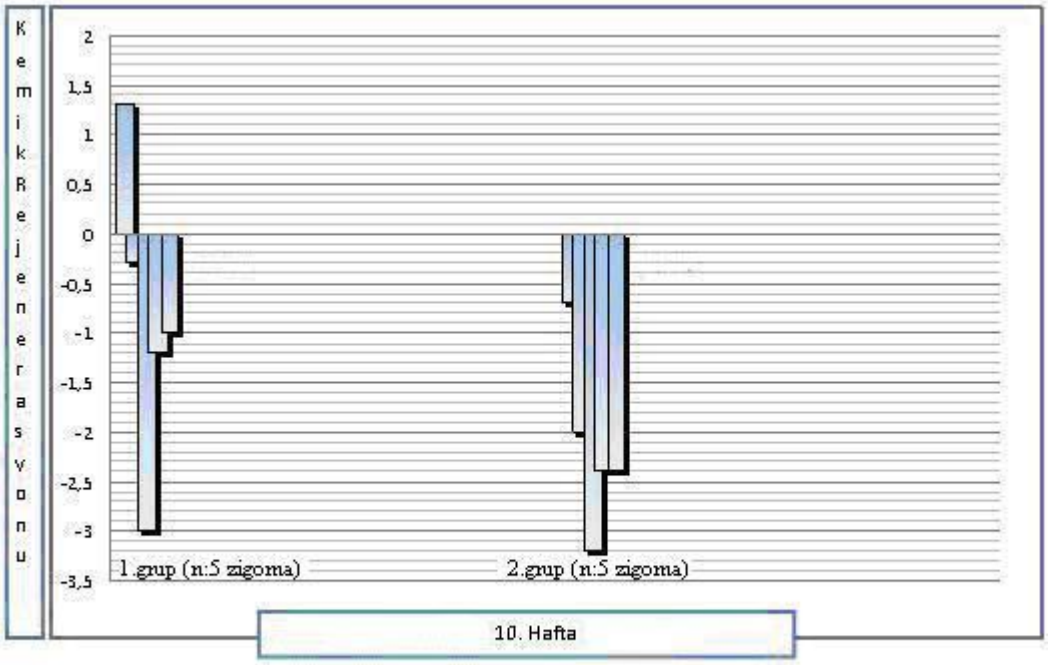
Operasyon sonrası 10. haftada çekilen üç boyutlu BT film sonuçlarından elde edilen, gruplardaki kemik iyileşme oranları şu şekilde idi:

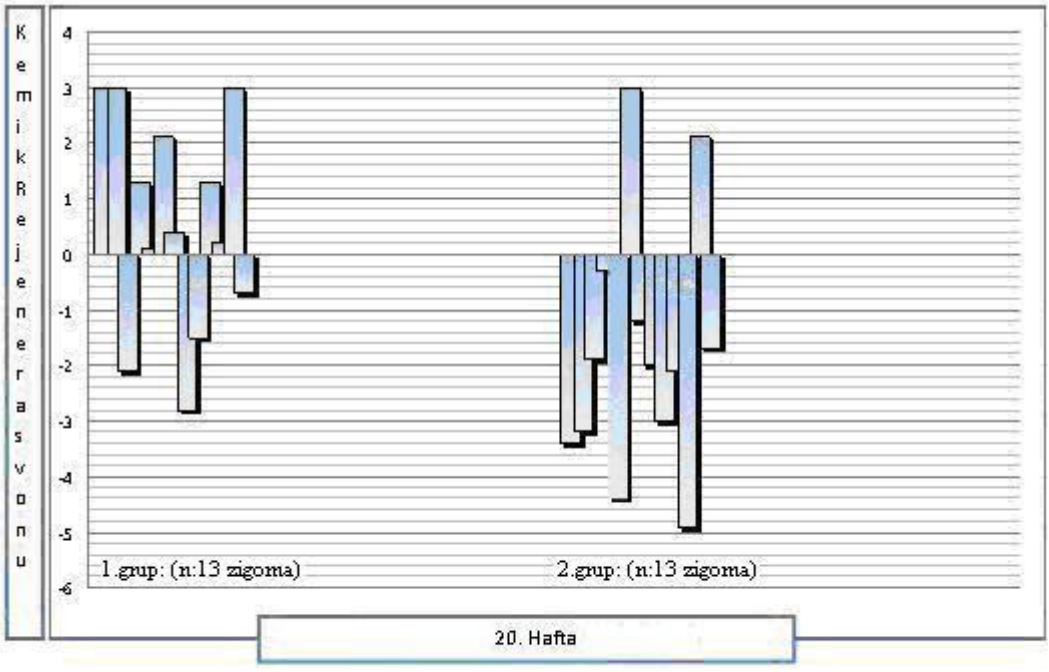
Deney grubunda (sağ taraf zigoma) 5 zigomanın 1'inde (% 20) kısmi kemik rejenerasyonu (%44.3) gözlendi. Diğer 4'ünde (%80) defekt orjinal halinden (ortalama %37.5) daha genişlemiş olarak ölçüldü.

Kontrol grubunda (sol taraf zigoma) 5 sıçanın hiçbirinde (%0) tam ya da kısmi kemik rejenerasyonu ve stabil kırık hattı gözlenmedi. Yani tamamında (%100) defekt alanı orijinal ebatından (ortalama %65) daha fazla genişlemiş olarak ölçüldü.

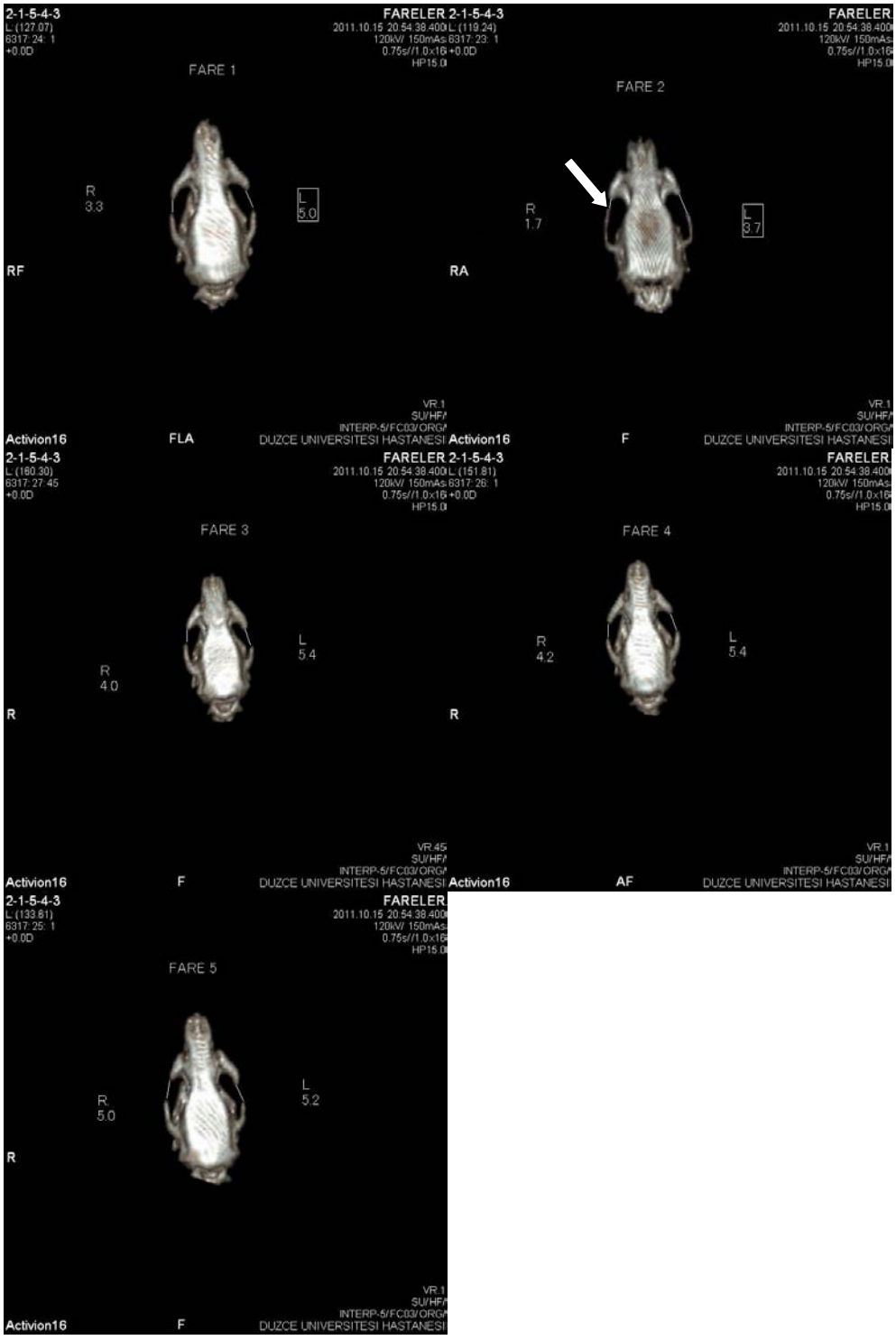
Operasyon sonrası 10. haftada makroskopik inceleme ve üç boyutlu BT film sonuçları kontrol grubunda aynı iken; deney grubunda 1 zigomada farklılık gösterdi. Bu bir zigomadaki iyileşme makroskopide tam gibi görünmesine rağmen, tomografi incelemesinde kısmi olduğu belirlendi.

Onuncu ve yirminci haftalarda BT sonuçlarından her bir zigomada hesap edilen yeni kemik oluşum miktarı grafikte sunulmuştur (Tablo 2). Negatif değerler kırık uçlarının dejenerasyonu nedeniyle defekt mesafesinde oluşan artmayı göstermektedir.





Tablo 2: Operasyon sonrası 10. ve 20. haftada, her bir zigomada, üç boyutlu BT ile ölçülmüş yeni kemik oluşum miktarını gösteren grafik. Negatif değerler kemik defekt ebatından başlangıç değerine göre genişleme gözlenmiş olması ile ilgilidir.



Şekil 23: Operasyon sonrası 10.haftadan, yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Sağ zigomalar 1.grubu, sol zigomalar 2.grubu oluşturuyor. Bir zigoma hariç (okla gösterilmiştir) 9 zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşmasına bağlı olabilecek defekt mesafesinde genişleme gözleniyor.

4.2.2. Yirminci hafta

Operasyon sonrası 20.haftada çekilen üç boyutlu BT film sonuçlarından elde edilen, gruplardaki tam kemik iyileşme oranları şu şekilde idi:

Deney grubunda (sağ taraf zigoma) 13 zigomanın 3'ünde (%23) tam kemik rejenerasyonu gözlendi.

Kontrol grubunda (sol taraf zigoma) 13 zigomanın 1'inde (%7) tam kemik rejenerasyonu gözlendi.

Makroskopik inceleme ve üç boyutlu BT film sonuçları deney ve kontrol gruplarında aynı iken; Deney grubunda bir zigomada farklılık gösterdi. Bu bir zigomadaki iyileşme makroskopide tam gibi görünmesine rağmen, tomografi incelemesinde kısmi olduğu belirlendi. Bilgisayarlı tomografinin yeni oluşan kemik kırığı iyileşmesini tanımada eksikliği mevcuttur. Deney ve kontrol grubu aynı hayvanda bilateral karşılaştırıldığı için 3 boyutlu tomografinin yeni kemik oluşumunu erken dönemdeki tanıma yetersizliğinin (163) her iki gruba da aynı ölçüde yansıdığı düşünülmüştür.

Deney grubunda iyileşmenin kısmi olduğu gözlenen 6 sıçanda defekt; %70, %44, %44, %14, %7, %3.4 oranında kapanmıştı. Diğer 4 sıçanda ise defekt genişliği ortalama %59 oranında orjinal defekt genişliğine göre artma göstermişti.

Kontrol grubunda iyileşmenin kısmi olduğu gözlenen bir sıçanda defekt %70 oranında kapanmıştı. Diğer 11 sıçanda ise defekt genişliği %85.1 oranında orijinal defekt genişliğine göre artma göstermişti.

Her bir zigomada hesap edilen yeni kemik oluşum miktarı grafikte sunulmuştur (Tablo 2). Negatif değerler kırık uçlarının dejenerasyonu nedeniyle defekt mesafesinde oluşan artmayı göstermektedir.

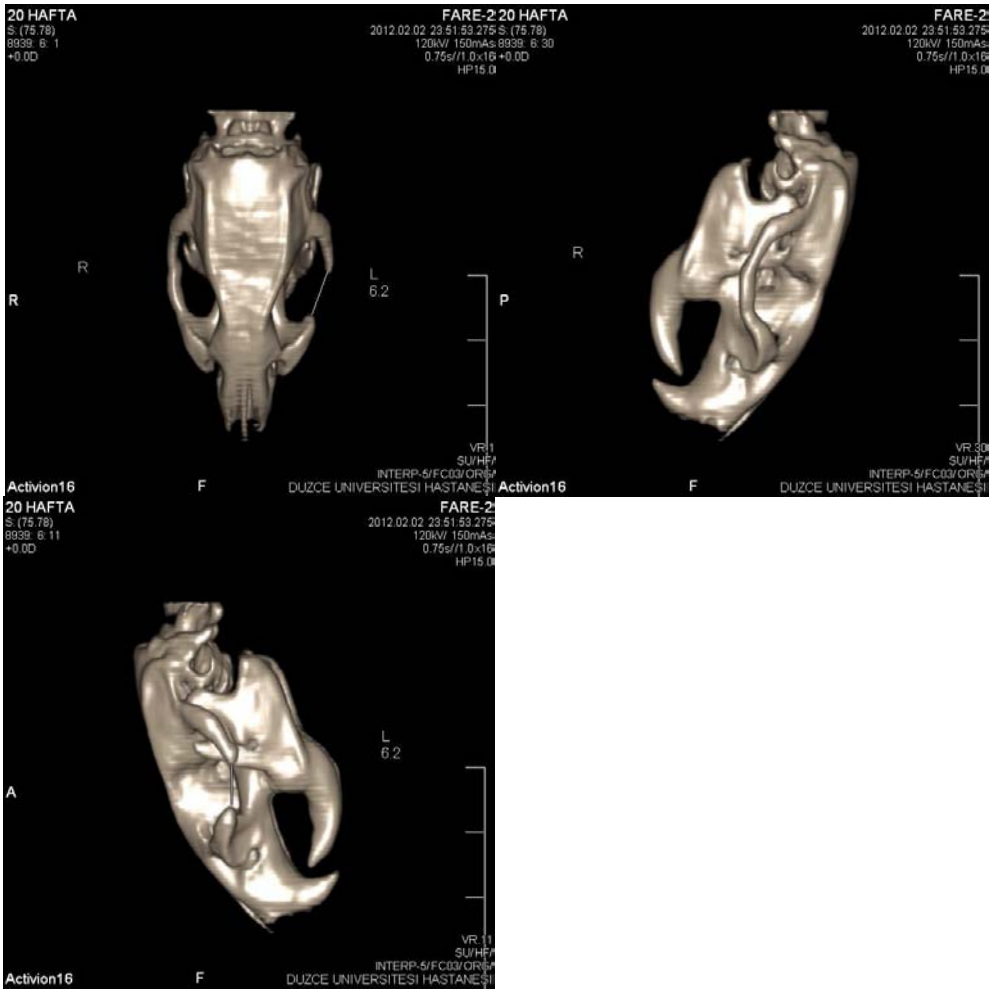
Kemik rejenerasyon miktarları ölçümde değerlendirilmiştir. Kemik iyileşmesi ölçümlerinde defekt 3mm den daha geniş hale gelmişse kemik nekrozu oluşmuş gibi düşünülmüştür ve kemik rejenerasyon ölçümleri 0mm olarak değerlendirilmiştir..

Deney ve kontrol gruplarında ölçülen yeni kemik oluşum miktarlarının incelenmesinde Wilcoxon signed rank test kullanılmış ve $p < 0.05$ düzeyi istatistik olarak anlamlı kabul edilmiştir (Tablo 3).

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Standart Sapma	p değeri
Deney grubu 10.hafta	5	,00	1,30	,2600	,58138	,317
Kontrol grubu 10.hafta	5	,00	,00	,0000	,00000	Anlamsız
Deney grubu 20.hafta	13	,00	3,00	1,1077	1,25993	,033
Kontrol grubu 20.hafta	13	,00	3,00	,3923	,97507	Anlamlı

Tablo 3: 10. ve 20. haftalarda deney ve kontrol gruplarında ölçülen yeni kemik rejenerasyon miktarlarına ait tanımlayıcı değerler.

Yapılan karşılaştırmalar sonucunda 10. haftada deney ve kontrol grupları arasında meydana gelen yeni kemik rejenerasyon miktarları arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın ($p=0.317$), 20. haftada deney grubunda meydana gelen yeni kemik oluşma miktarı kontrol grubunda meydana gelen yeni kemik oluşma miktarından istatistik olarak anlamlı düzeyde daha fazla bulunmuştur ($p=0.033$).

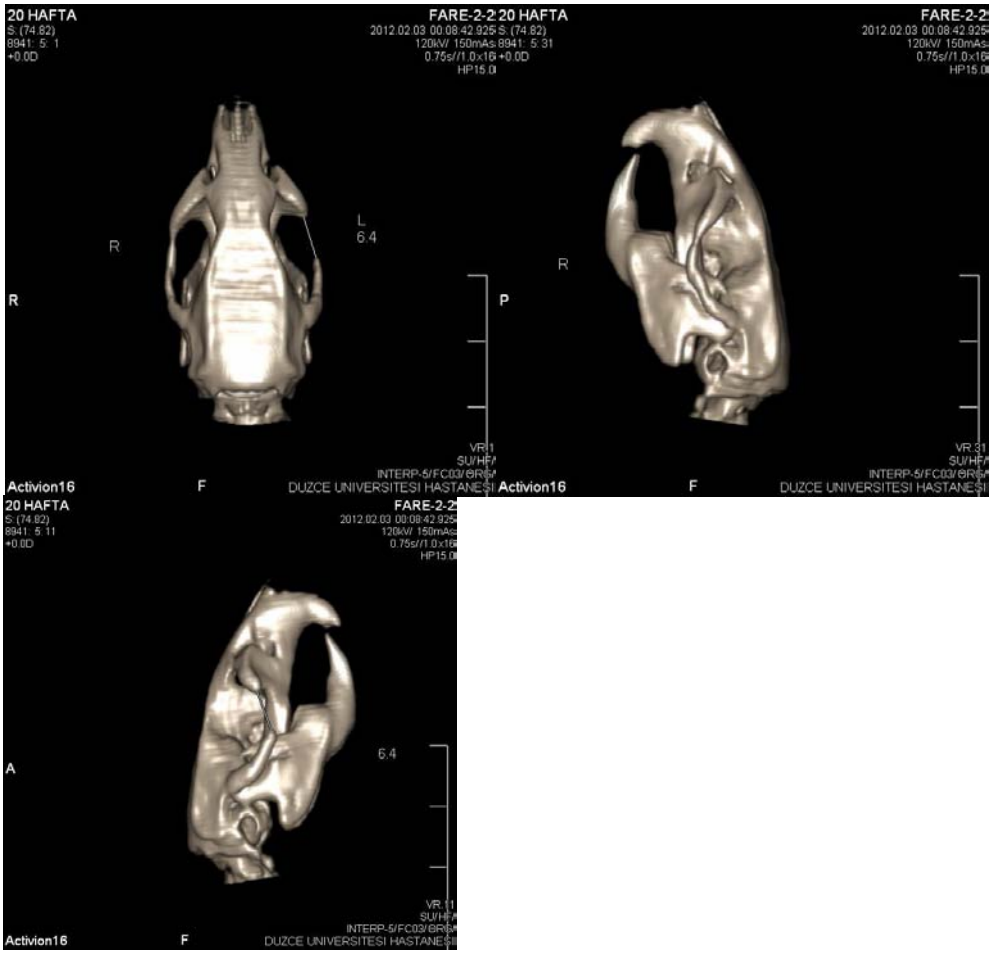


Şekil 23: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu)

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada tam kemik iyileşmesi (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 6.2 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

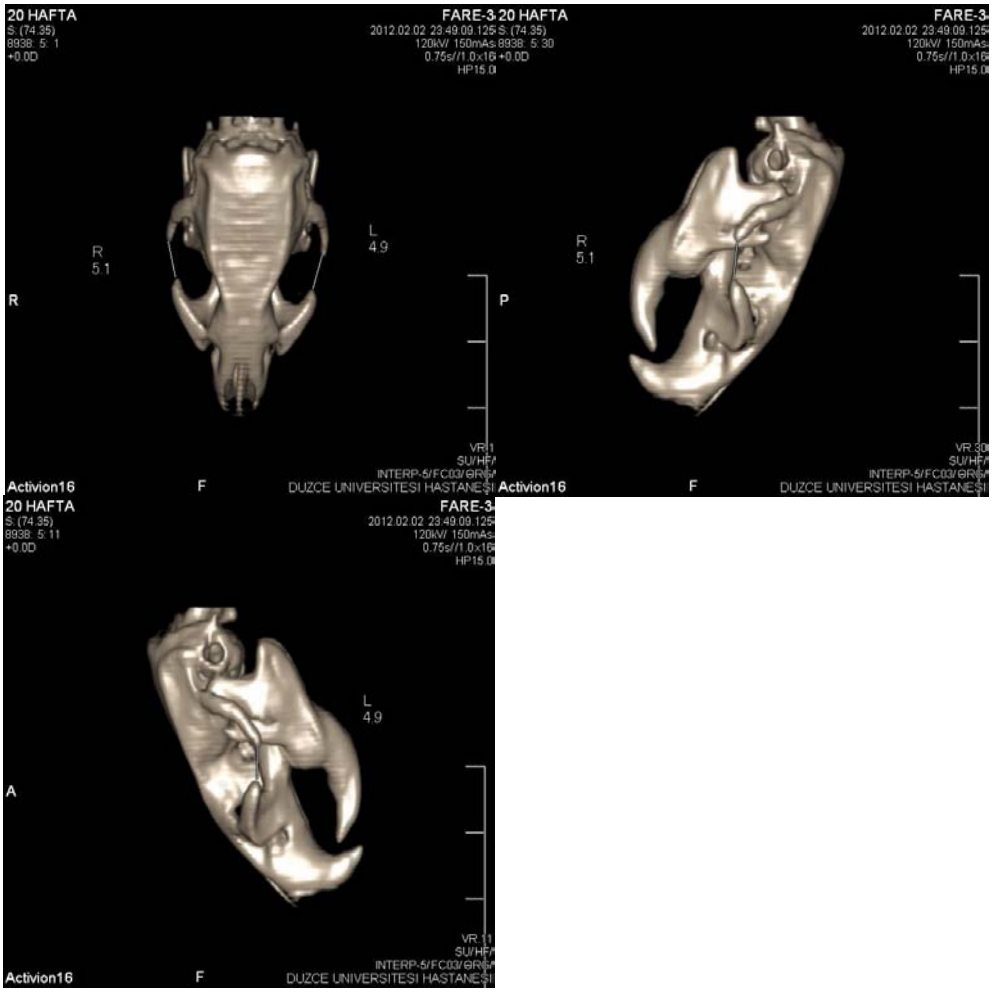


Şekil 24: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada tam kemik iyileşmesi (Deney grubu) .

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 6.4 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

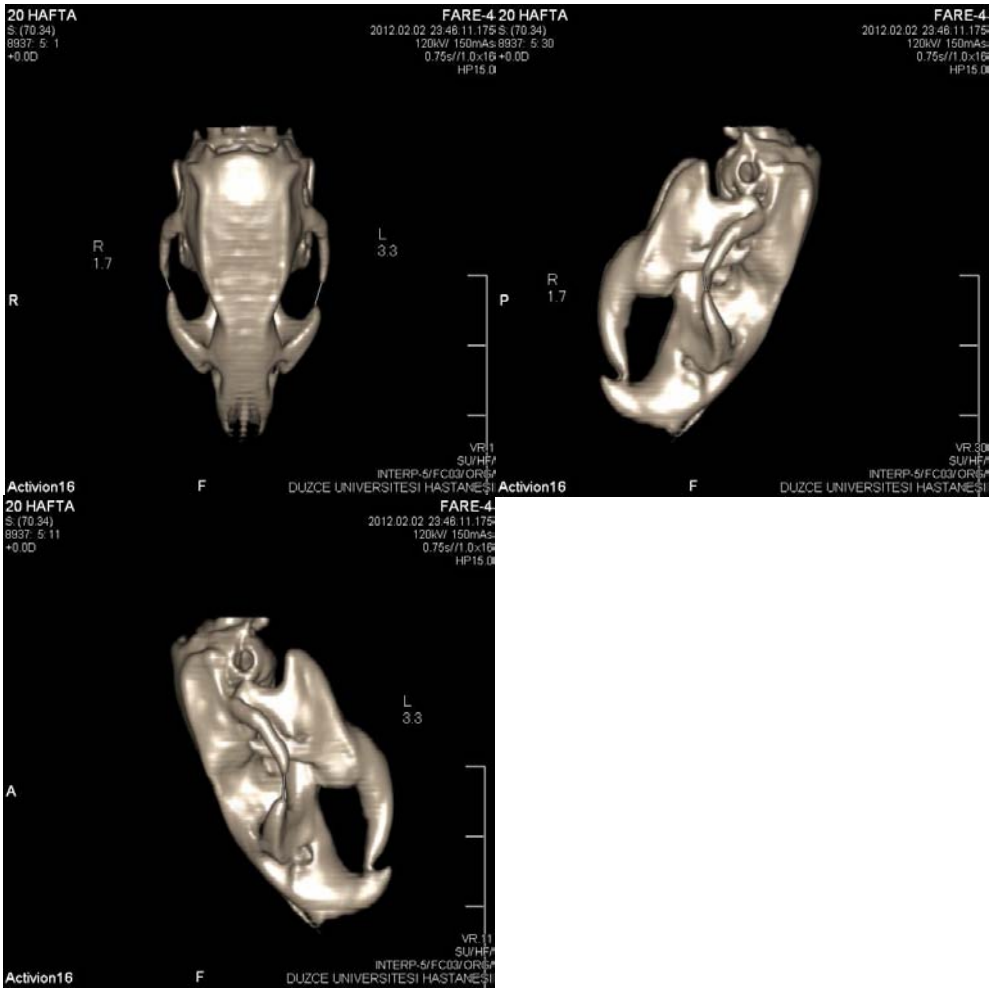


Şekil 25: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu)

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 5.1 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 4.9 mm) gözleniyor (Kontrol grubu)

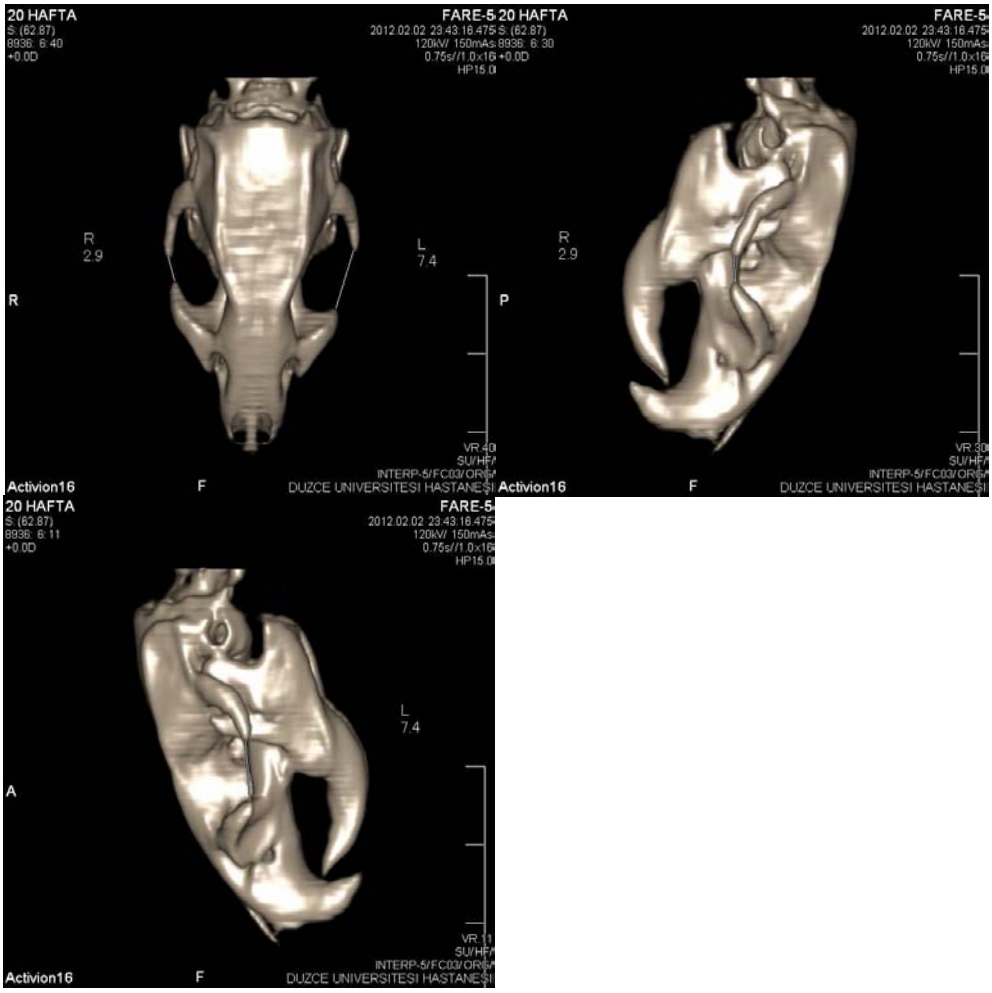


Şekil 26: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu)

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada kısmi kalsifikasyon (gap mesafesi 1.7 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 3.3 mm) gözleniyor (Kontrol grubu)

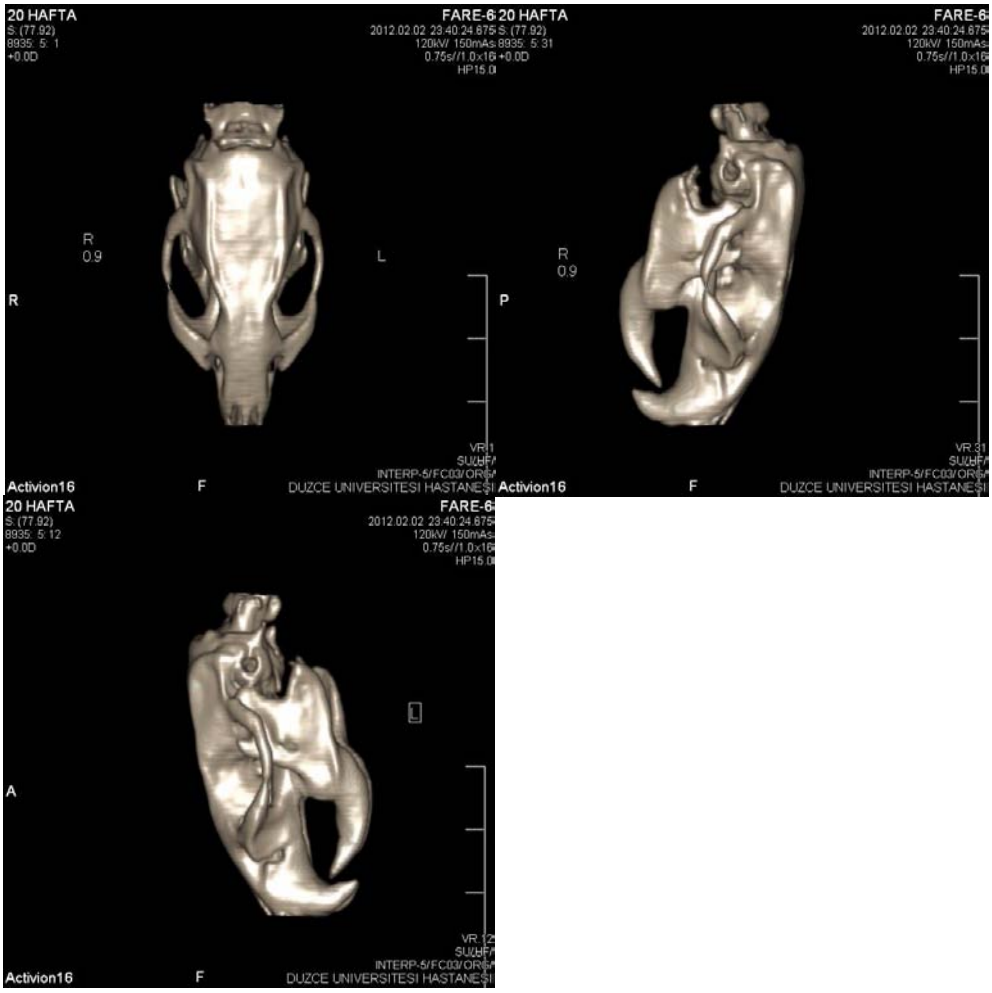


Şekil 27: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada kısmi kalsifikasyon (gap mesafesi 2.9 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 7.4 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

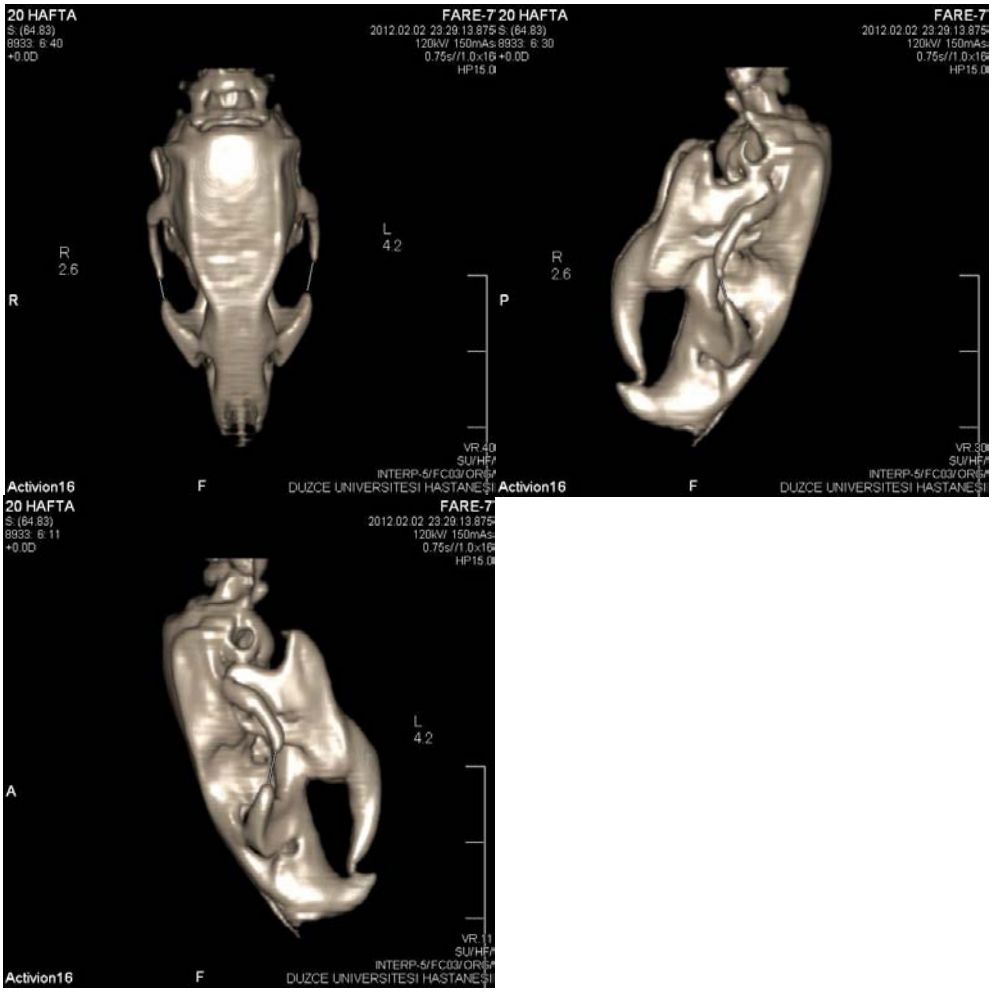


Şekil 28: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada kısmi kalsifikasyon (gap mesafesi 0.9 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada tam kemik iyileşmesi (Kontrol grubu).

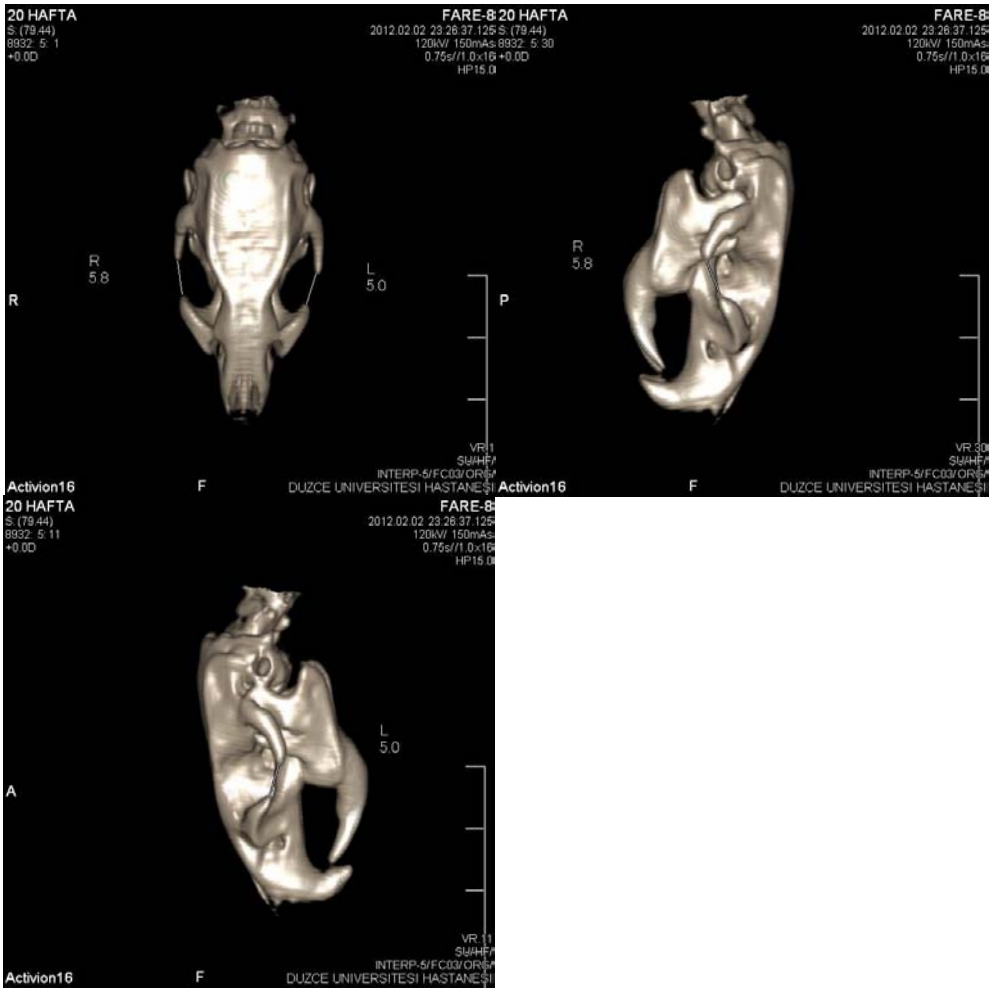


Şekil 29: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada kısmi kalsifikasyon (gap mesafesi 2.6 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 4.2 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

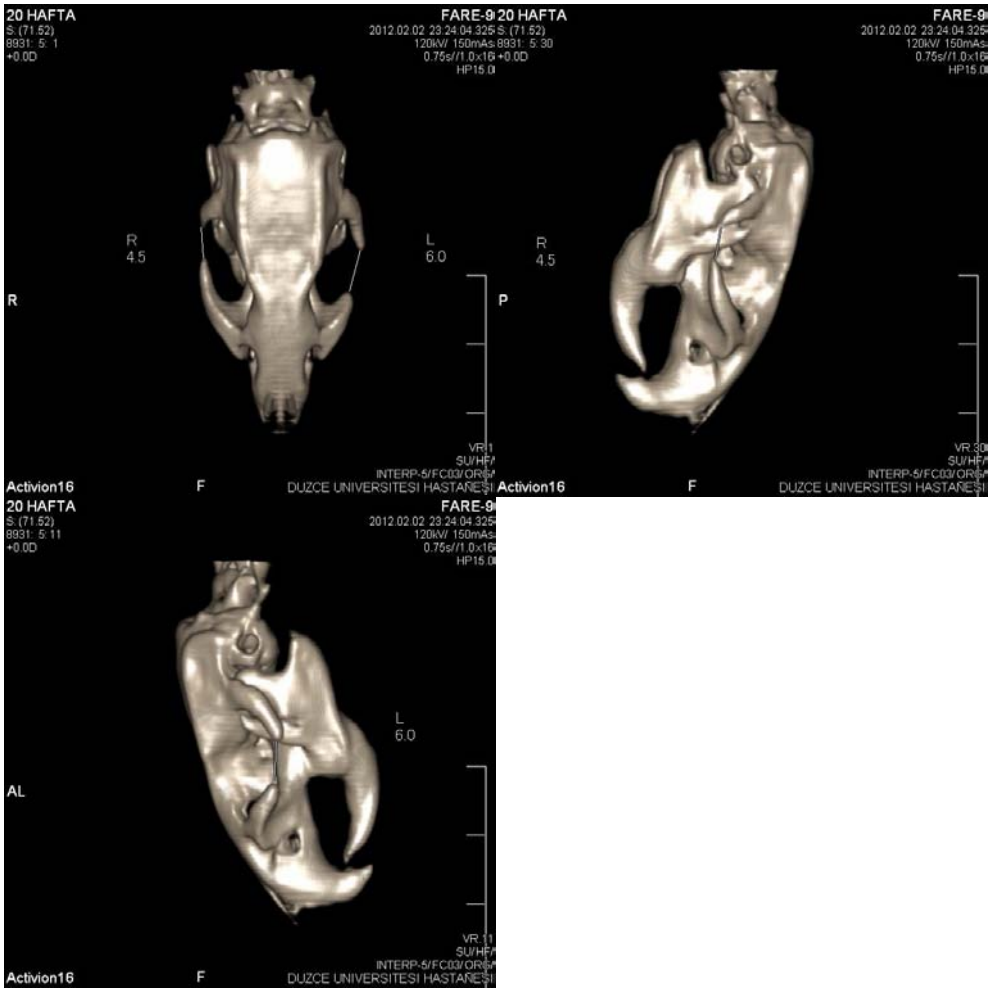


Şekil 30: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm Sağ zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 5.8 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 5.0 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

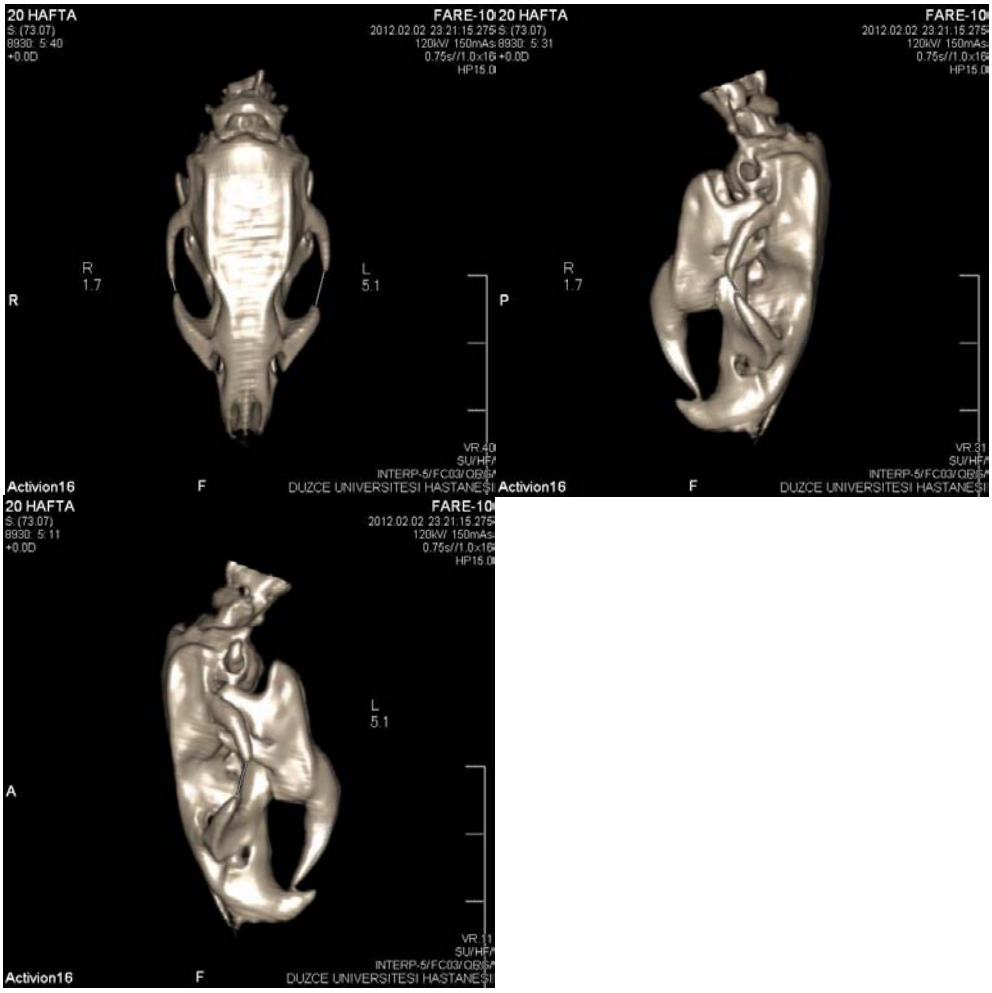


Şekil 30: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm Sağ zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 4.5 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 6.0 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

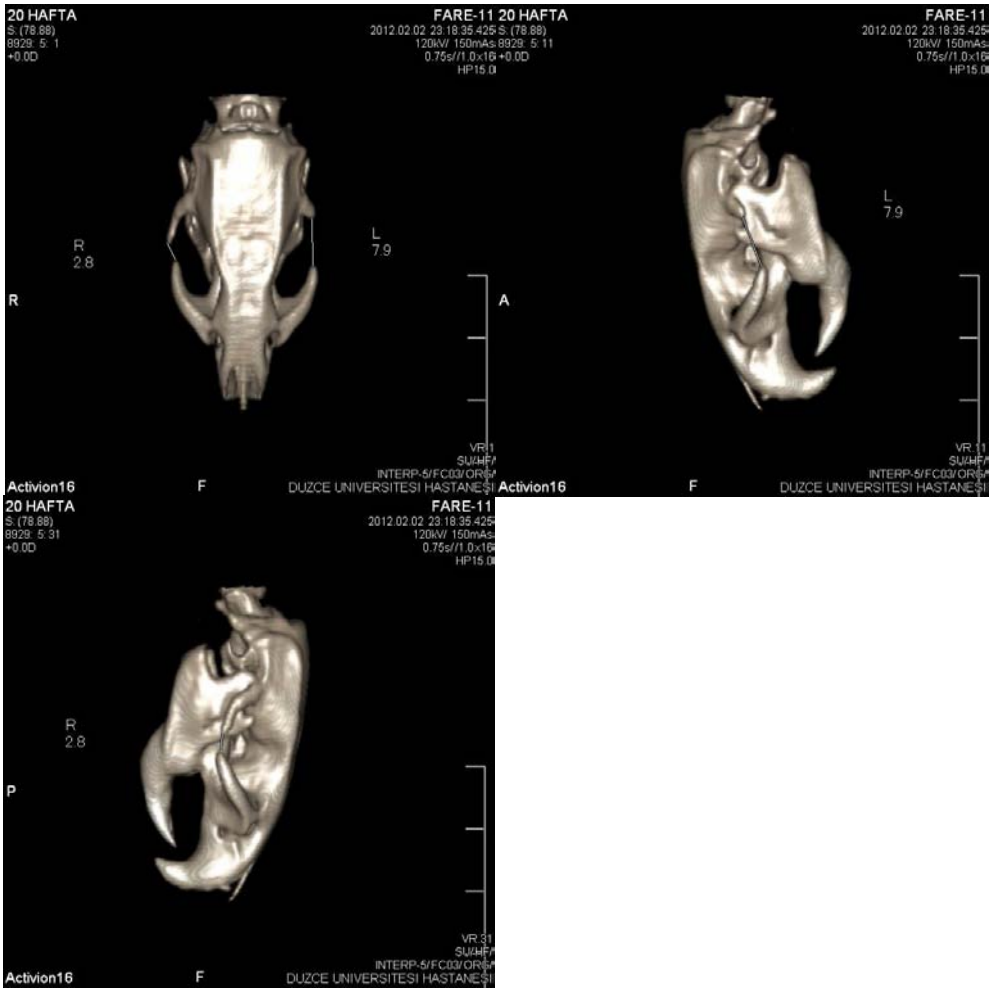


Şekil 31: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm Sağ zigomada kısmi kalsifikasyon (gap mesafesi 1.7 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 5.1 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

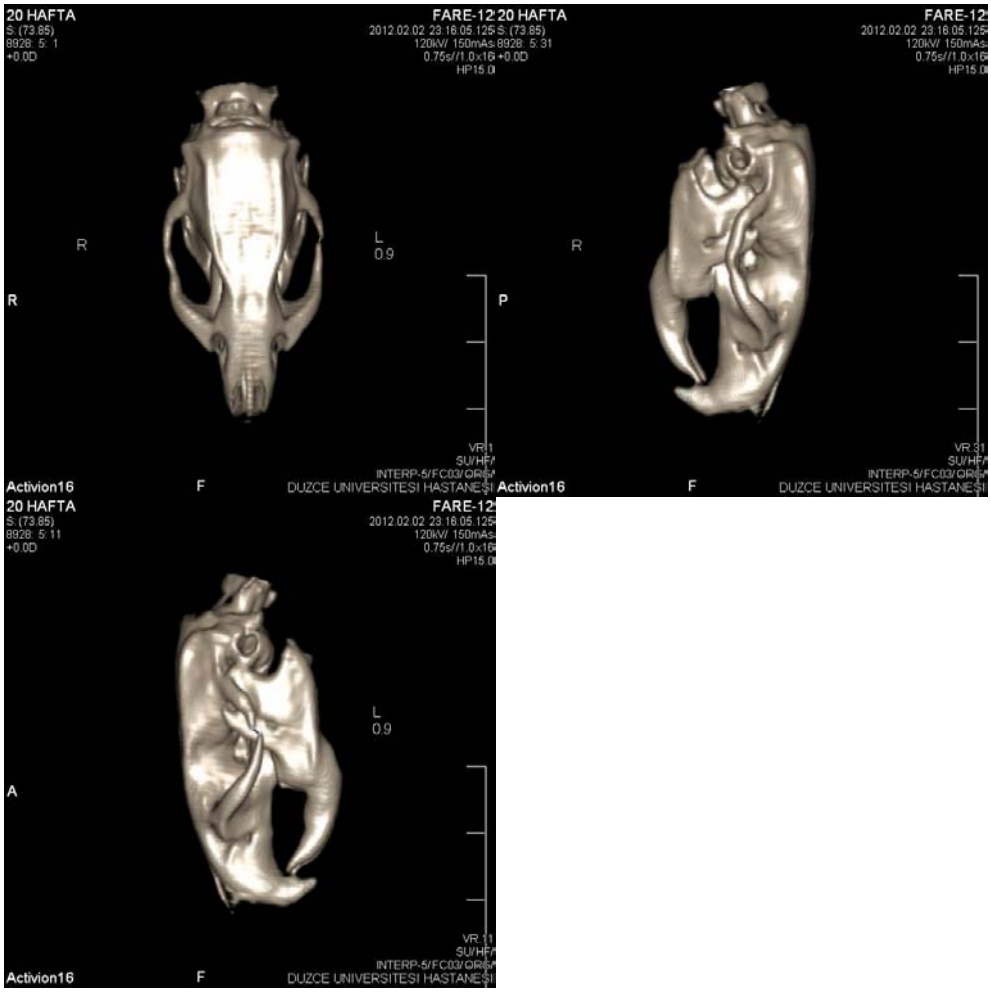


Şekil 32: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu)

Sağ lateral görünüm Sağ zigomada kısmi kalsifikasyon (gap mesafesi 2.8 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 7.9 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

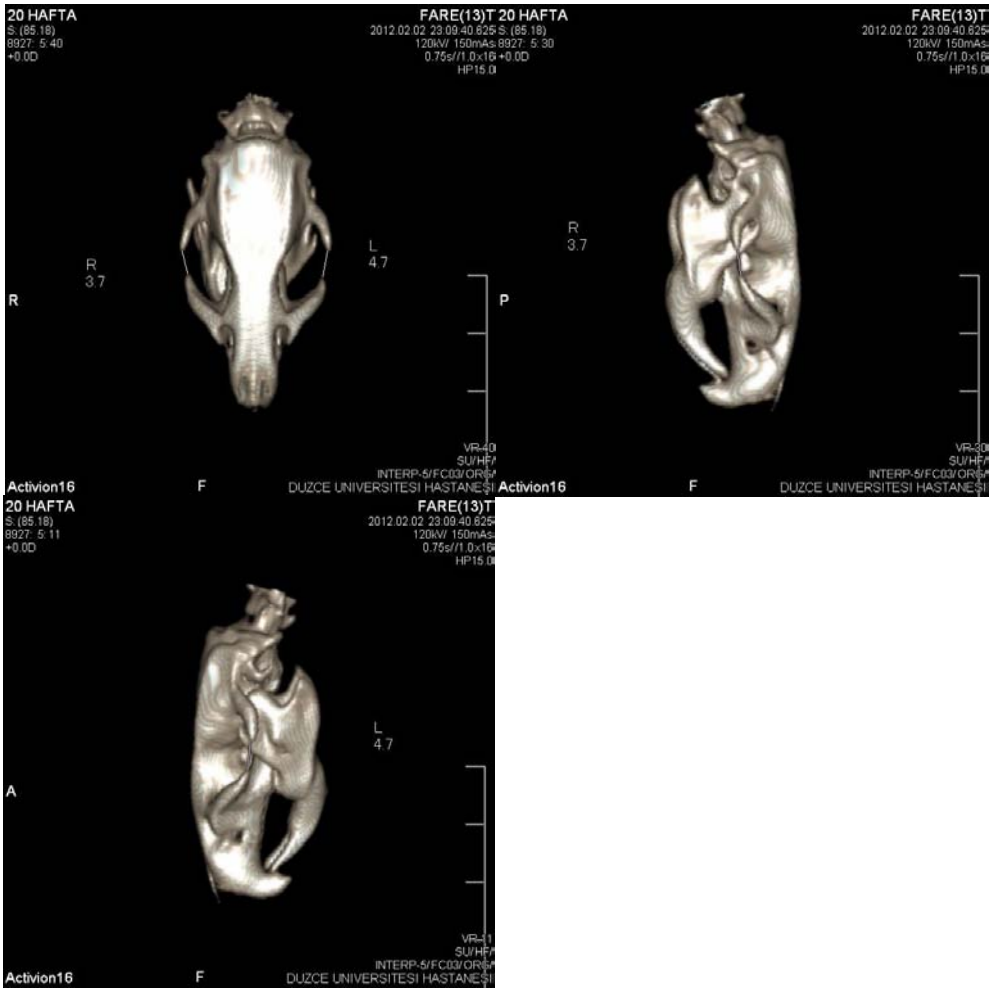


Şekil 33: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu).

Sağ lateral görünüm: Sağ zigomada tam kemik iyileşmesi (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kısmi kalsifikasyon (gap mesafesi 0.9 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).



Şekil 34: Operasyon sonrası yirminci haftada yeni kemik oluşumu gözlemek amacıyla çekilmiş üç boyutlu BT analizleri.

Süperior görünüm: Her iki zigomanın karşılaştırmalı görüntüsü. Sağ zigoma (Deney grubu) – Sol zigoma (Kontrol grubu)

Sağ lateral görünüm Sağ zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 3.7 mm) gözleniyor (Deney grubu).

Sol lateral görünüm: Sol zigomada kırık uçlarında nekroz ve dejenerasyon oluşması sonucu defekt mesafesinde genişleme (gap mesafesi 4.7 mm) gözleniyor (Kontrol grubu).

4.3. Histolojik Değerlendirme Sonuçları

(Hematoksilen-Eosin boyaması)

4.3.1. Onuncu Hafta

Kallus oluşumunu, inflamasyon reaksiyonunun düzeyini, kemik oluşumunun başlangıç safasını gözlemek amacıyla yapılan onuncu hafta histolojik inceleme sonuçları aşağıda sunulmuştur.

4.3.1.1. Deney grubu (sağ zigoma) (n:5, zigoma)

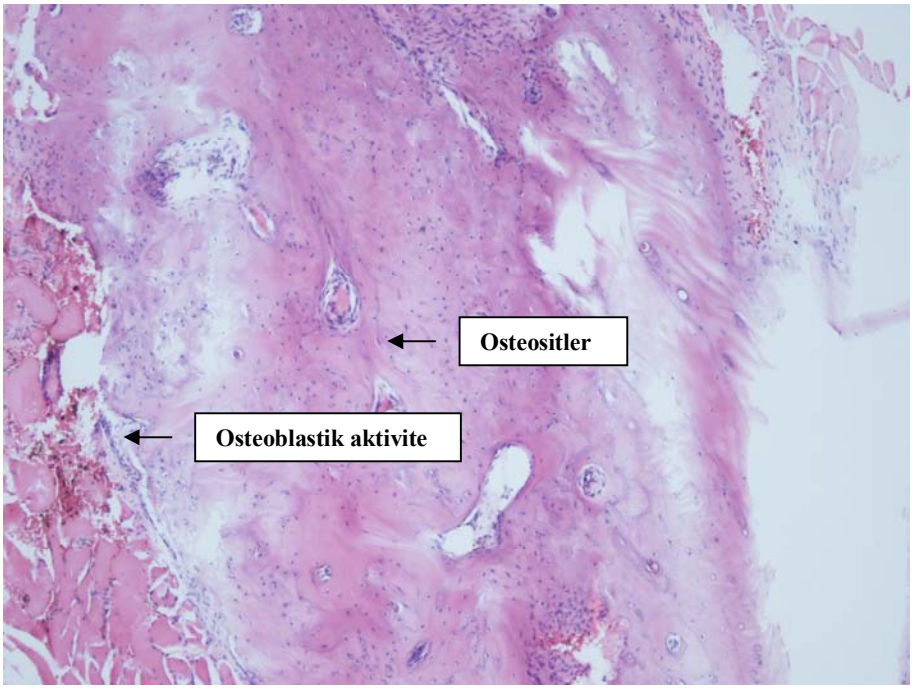
Orta düzeyde inflamatuvar cevap gözlendi. Kemik defektinin olduğu alan granulasyon dokusu ile örtülmüştü. Granülasyon dokusu, kırık kemik uçlarına yakın planda çok sayıda osteoblast benzeri hücre içeriyordu. Bu reaksiyonlar osteoid formasyonu ile beraberdi. Beş örneğin birisinde orta düzeyde fibrokondroblastik hiperplazi mevcuttu. Yeni kemik oluşumu (kallus) ve vasküler kanal formasyonu izlendi (Şekil 35,36).

Onuncu hafta deney grubu histolojik incelemede; 5 zigomanın hiçbirinde nekroza rastlanmadı, 5'inde inflamatuar yanıt, 5'inde granülasyon dokusu, 5'inde osteoblastik hücre artışı, 1'inde fibrokondroid hiperplazi, 4'ünde yeni kemik oluşumu (kallus), 5'inde vasküler kanal formasyonu gözlendi.

4.3.1.2. Kontrol grubu (sol zigoma) (n:5, zigoma)

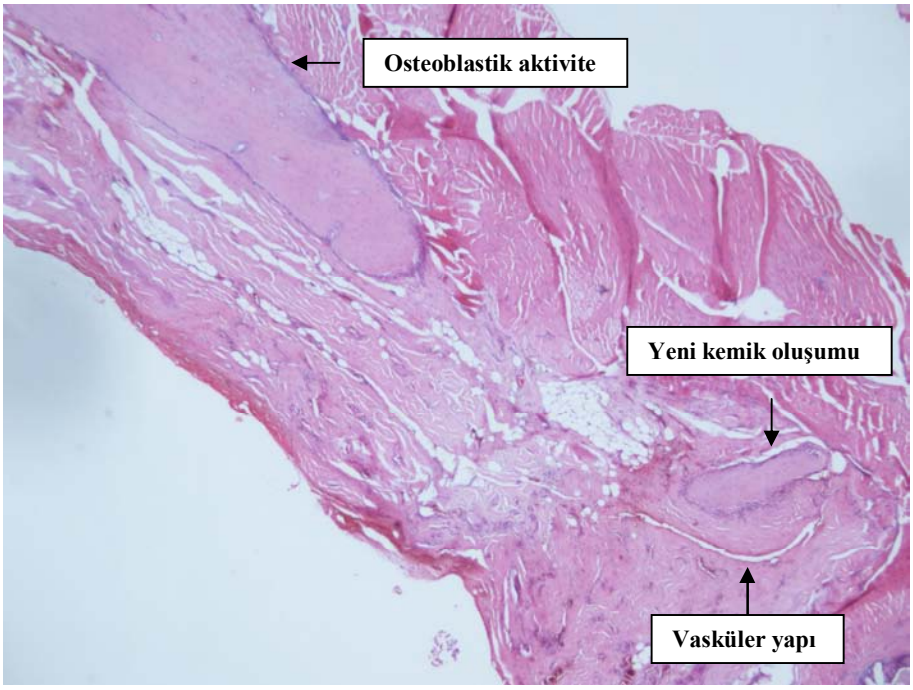
Az düzeyde inflamatuvar cevap gözlendi. Kemik defektinin olduğu alan minimal düzeyde granulasyon dokusu ile örtülmüştü. Örneklerde fibrokondroblastik hiperplazi izlenmedi. Orta düzeyde osteoblastik hücre artışı gözlendi. Kallus oluşumu, beş örneğin birinde mevcuttu. Ve orta düzeyde vaskularizasyon tesbit edildi (Şekil 37).

Onuncu hafta kontrol grubu histolojik incelemede; 5 zigomanın hiçbirinde nekroz ve fibrokondroid hiperplaziye rastlanmadı, 3'ünde inflamatuar yanıt, 5'inde granülasyon dokusu, 5'inde osteoblastik hücre artışı, 1'inde yeni kemik oluşumu (kallus), 5'inde vasküler kanal formasyonu gözlendi.



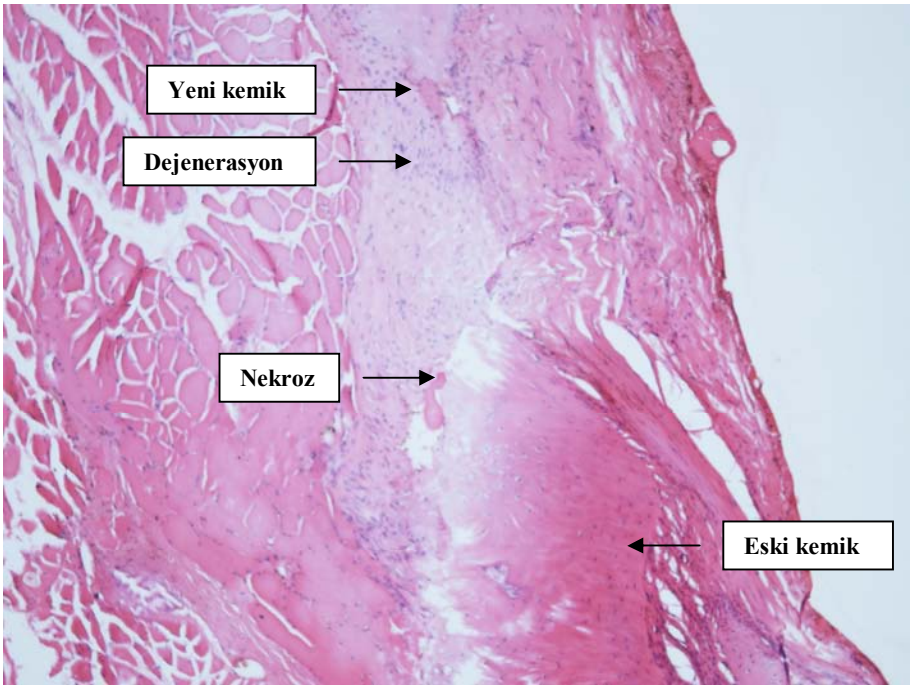
Şekil 35: Deney grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanan sağ zigoma): Operasyon sonrası 10. haftaya ait histolojik bulgular.

Çevresinde osteoblastları gözlenen osteositleri yerleşmiş vasküler yapıları oluşmuş matürasyon gösteren yeni kemik oluşumu gözleniyor. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X100).



Şekil 36: Deney grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanmış kök hücre uygulanan sağ zigoma): Operasyon sonrası 10. haftaya ait histolojik bulgular

Çevresinde bağ dokusu ve vasküler artış gösteren osteoblastik aktivitesi beligin erken evre yeni kemik oluşumu. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X100).



Şekil 37: Kontrol grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanmayan sol zigoma): Operasyon sonrası 10. haftaya ait histolojik bulgular.

Osteoblastik aktivitesi ve yeni kemik oluşumu çok hafif derecede olan örnekte fokal nekroz ve dejenerasyon gözleniyor. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X100).

4.3.2. Yirminci Hafta

Kallus oluşumunu, inflamasyon reaksiyonunun düzeyini, kemik oluşumunu gözlemek amacıyla yapılan yirminci hafta histolojik inceleme sonuçları aşağıda sunulmuştur.

4.3.2.1. **Deney grubu (sağ zigoma)** (n:13, zigoma)

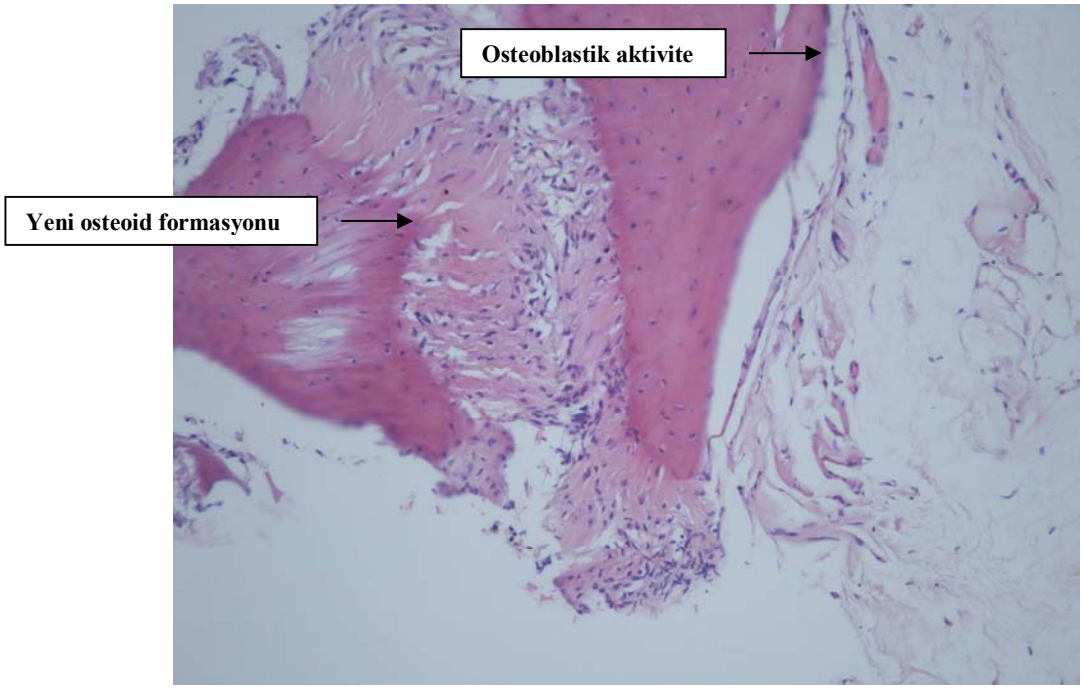
Vasküler, inflamatuvar ve fibroblastik cevap azalmıştı. Bu dönemde osteoblastik aktivite ve yeni kemik oluşumu (kallus) gözlendi. Onüç örneğin birinde fibrokondroid hiperplazi tesbit edildi. Onuncu haftada gözlenen yoğun vaskülarite artışı bu örneklerde azalmıştı (Şekil 38,39,40,41).

Yirminci hafta deney grubu histolojik incelemede; 13 zigomanın 1'inde nekroz, 6'sında inflamatuar yanıt, 11'inde granülasyon dokusu, 13'ünde osteoblastik hücre artışı, 1'inde fibrokondroid hiperplazi, 8'inde yeni kemik oluşumu (kallus), 12'inde vasküler kanal formasyonu gözlendi.

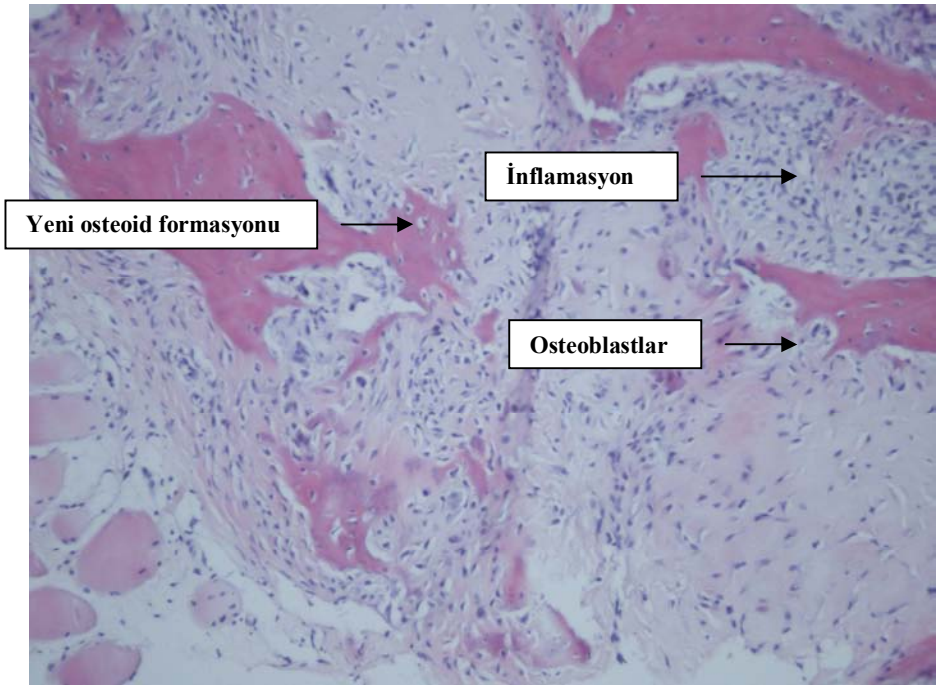
4.3.2.2. **Kontrol grubu (sol zigoma)** (n:13, zigoma)

Vasküler, inflamatuvar ve osteoblastik cevapta azalma gözlendi. Granulasyon dokusunda azalma izlendi. Onüç örneğin birinde fibrokondroid hiperplazi gözlendi. Örneklerin bazılarında zigoma arkı boyunca dejenere kemik uçları gözlendi. Bu örneklerde defekt genişliği artmıştı. Onüç örneğin sadece birinde yeni kemik oluşumu (kallus) gözlendi (Şekil 42,43,44,45).

Yirminci hafta kontrol grubu histolojik incelemede; 13 zigomanın 3'ünde nekroz, 12'sinde inflamatuar yanıt, 12'inde granülasyon dokusu, 13'ünde osteoblastik hücre artışı, 1'inde fibrokondroid hiperplazi, 1'inde yeni kemik oluşumu (kallus), 13'ünde vasküler kanal formasyonu gözlendi.

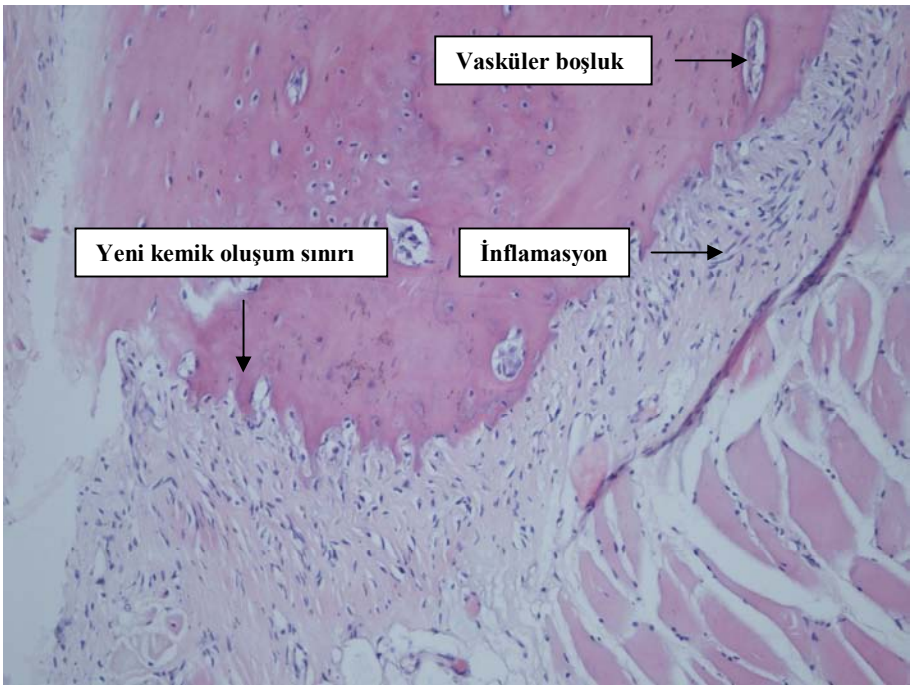


Şekil 38: Deney grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanan sağ zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular. Hafif derecede osteoblastik aktivite ve yeni osteoid formasyonu (yeni kemik oluşumu) gözleniyor. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).



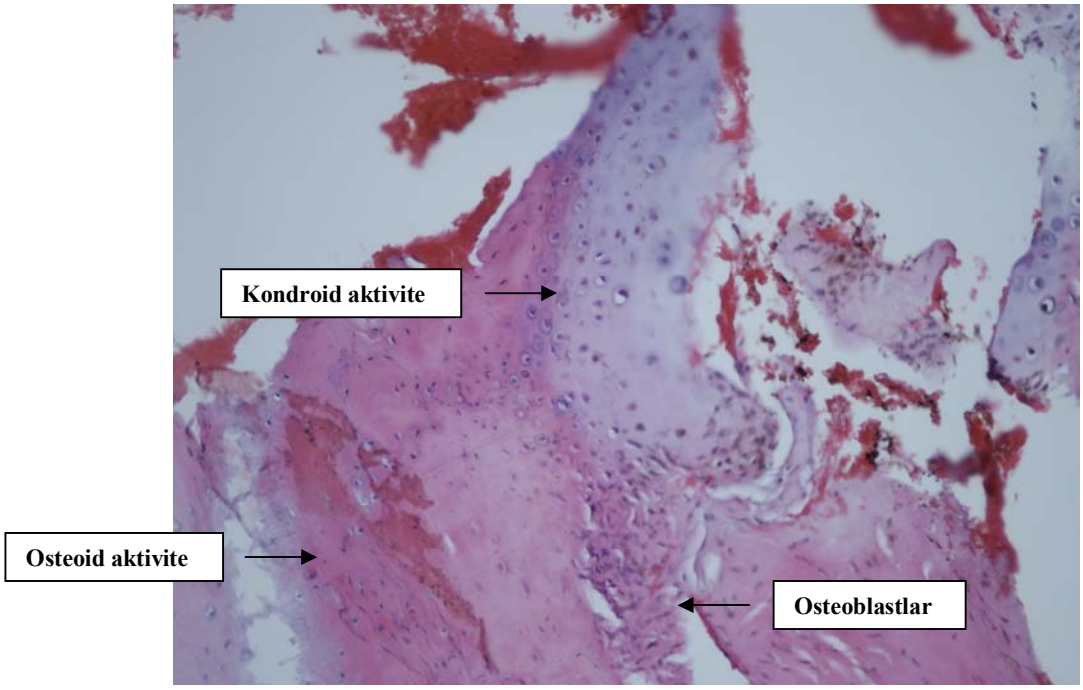
Şekil 39: Deney grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanan sağ zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular.

Aktif osteoid üretimi (yeni kemik oluşumu) gözleniyor (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).

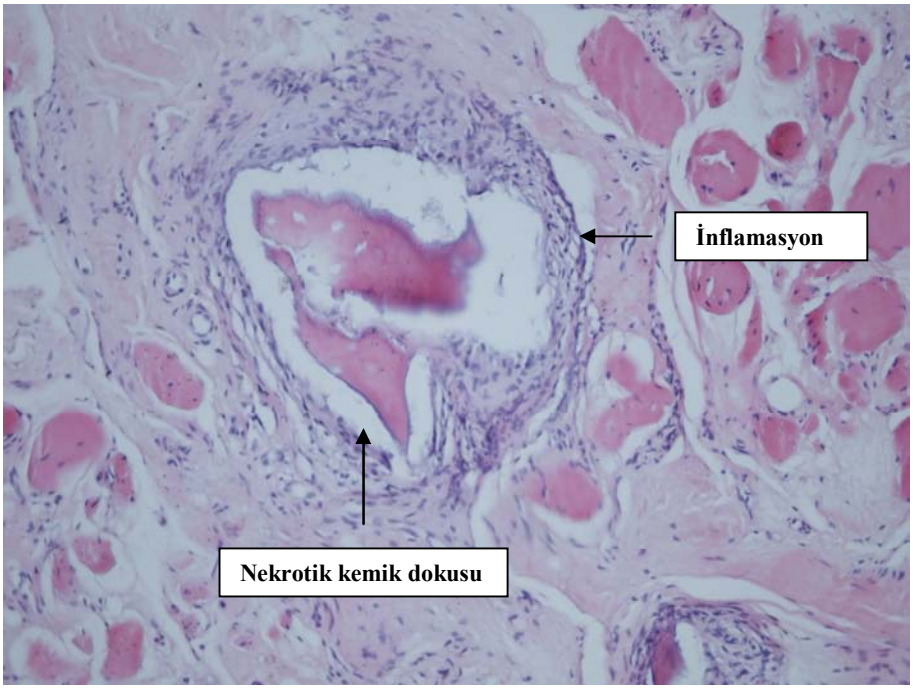


Şekil 40: Deney grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanan sağ zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular.

Üst tarafta vasküler boşlukları belirgin eski kemiğin ucunda yeni kemik oluşumu ve kemiği çevreleyen dokularda orta düzeyde inflamatuvar yanıt gözleniyor (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).



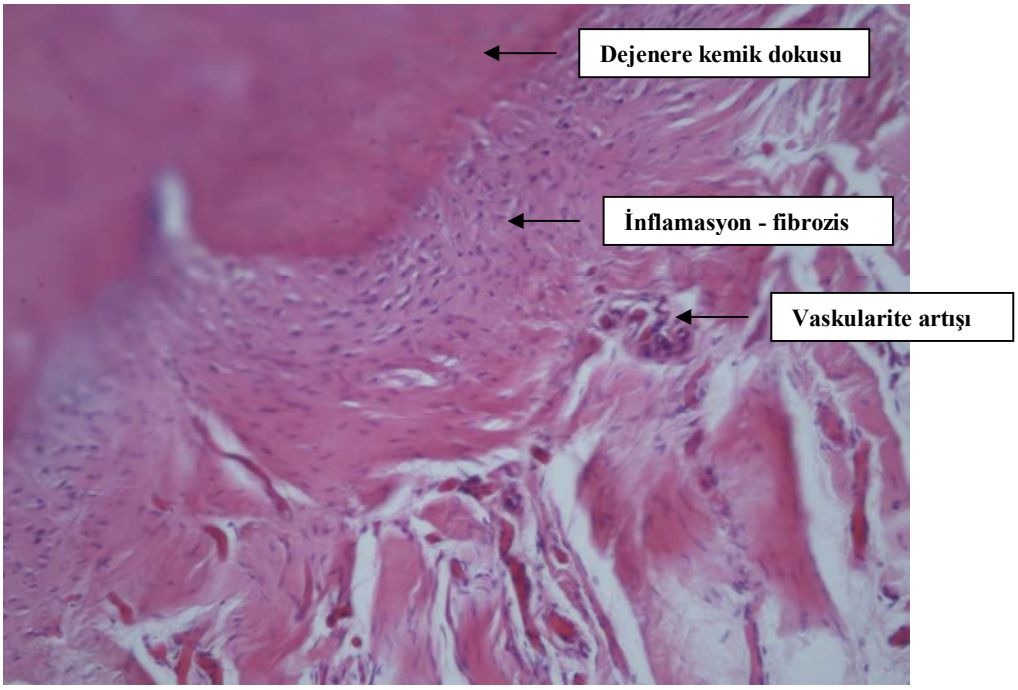
Şekil 41: Deney grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanan sağ zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular.
Bu örnekte fibrokondroid proliferasyon ve yeni kemik oluşumu mevcut. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).



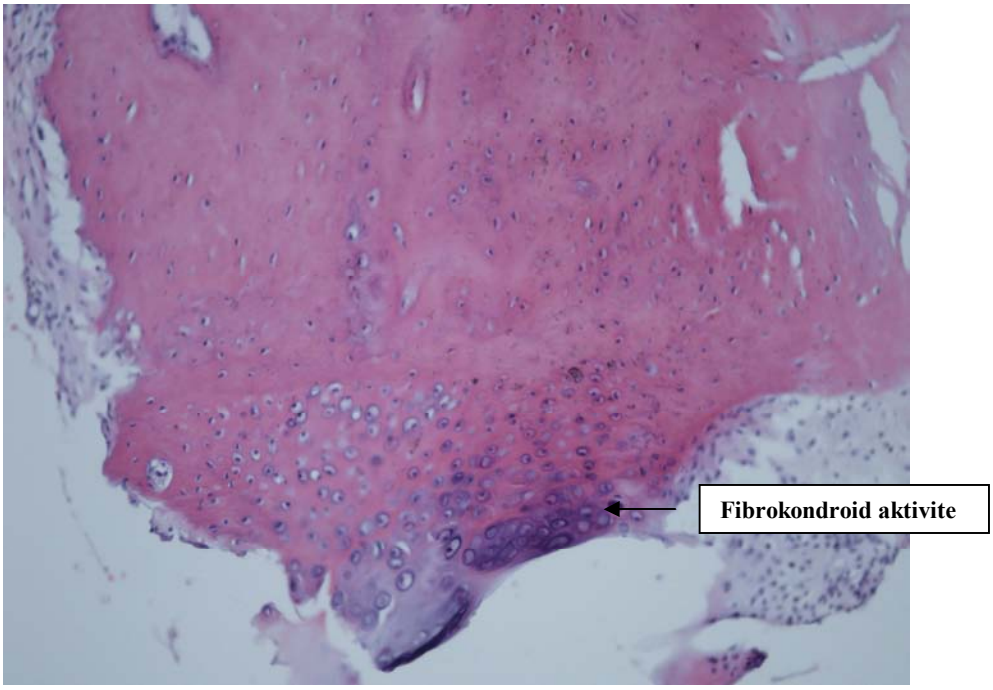
Şekil 42: Kontrol grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanmayan sol zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular.
Bu örnekte eski (nekrotik) kemiğe karşı gelişmiş iltihabi reaksiyon mevcut. Yeni kemik oluşumu gözlenmiyor. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).



Şekil 43: Kontrol grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanmayan sol zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular.
Bu örnekte vasküler kanal proliferasyonu belirgin olan ve yeni kemik oluşumu belirgin olmayan dejenere olmuş kemik dokular mevcut. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X100).

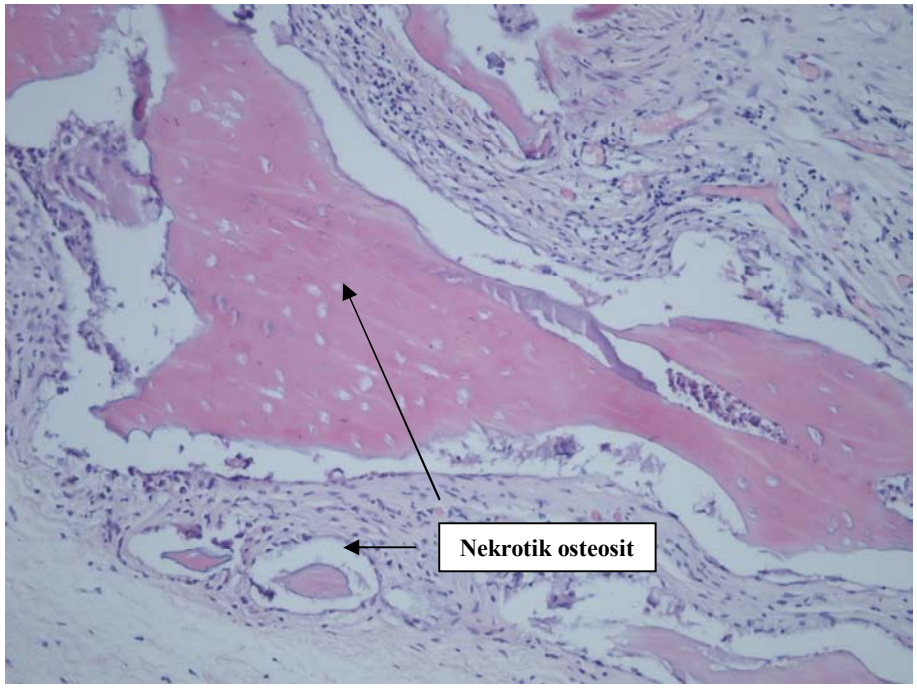


Şekil 44: Kontrol grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanmayan sol zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular.
Bu örnekte fibrozis, vaskülaritede artış ve inflamasyon gösteren yeni kemik oluşumunun olmadığı gözleniyor. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).



Şekil 45: Kontrol grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanmayan sol zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular.

Bu örnekte fibrokondroid proliferasyon mevcut. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).



Şekil 46: Kontrol grubu (Yağ doku kökenli kök hücre uygulanmayan sol zigoma): Operasyon sonrası 20. haftaya ait histolojik bulgular. Bu örnekte

osteositlerde nekroz ve çevresinde şiddetli inflamatuar reaksiyon mevcut. Yeni kemik oluşumu gözlenmiyor. (Hemotoksilen-Eosin boyama; X200).

5. TARTIŞMA

Tek bir hücreden (zigot) 100 farklı hücre tipinin oluşması diferansiyasyon kelimesinin tanımıdır. Embriyonda doğal bir süreç olan farklılaşmanın erişkinde gerek humoral faktörlerle uyararak, gerekse doku greftleri kullanarak oluşturulması kaybedilmiş olan dokuların veya organların yeniden oluşturulmasını sağlayabilecektir. Kemik oluşumunda önemli olduğu bilinen yağ doku kaynaklı kök hücrenin membranöz kemik indüksiyon kapasitelerini izlemek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

Thaller and Kawamoto 1990 yılında 10 hastanın revizyon amaçlı yapılan ikinci ameliyatlarında eski kırık hattından biopsi örnekleri almışlar ve iyileşmenin ossöz olduğunu göstermişlerdir (130). Bu tarihe kadar, yüz kırıklarında iyileşmenin fibröz iyileşme olduğu düşünülmüştür. Yüz kırıklarında fibröz iyileşme kemik çok ince olduğunda, defekt mesafesi geniş olduğunda, kırık uçlarının arasına yumuşak doku girdiğinde gözlenebilmektedir (130). Fakat çoğunlukla iyileşme kemik oluşumu ile gerçekleşmektedir. Bizim çalışmamızda, uygun koşullar mevcut olduğunda kemik defekti olan kırıklarda da iyileşmenin ossöz iyileşme olduğu gösterilerek bu bilgi doğrulanmıştır.

Endokondral kemiklerde gözlenen kıkırdak safha ile başlayıp ardından kemikleşmenin oluştuğu iyileşmenin aksine, membranöz kemik iyleşmesinde kıkırdak aşama izlenmez, görüşü klasik bir bilgi olarak kabul görmektedir. Bu görüşe göre membranöz kemik kırıklarında membran içindeki mezenkimal hücreler direkt olarak osteoblastlara dönüşürler (46). Rever ve arkadaşları 1991 yılunda bir tavşan modeli üzerinde yaptıkları çalışmada yüz kırıklarının iyileşmesinde gerçek ossöz birleşme olduğunu, ancak iyileşme sürecinde bazı örneklerde kıkırdak aşamasının gözlendiğini rapor etmişlerdir. Enkondral kırık iyileşmesine benzeyen kıkırdak aşamasını basit kırık modelinde ve kemik defektinin olduğu modelde ayrı ayrı göstermişlerdir. Her iki grupta da son aşama olarak lamellar kemik iyileşmesi meydana geldiği gözlenmiştir (46).

Bizim araştırmamızda da fibrokondroblastik aktivite hem deney hem kontrol grubundaki az sayıda örnekte izlendi. Ancak gözlenen kondral aktivitede enkondral iyileşme sürecinden farklı olarak kıkırdak oluşumu öncelikli bulunmamıştır. Yağ doku kökenli kök hücre konulmamış kritik boyuttaki kemik doku defekti olan grupta sınırlı osteogenez ve birkaç örnekte kondral aktivite gözlendi. Bazı örneklerde kırık uçlarının dejenerasyonu gözlendi.

Kritik boyutta kemik defekti oluşturulan YDKKH (Yağ doku kökenli kök hücre) uygulanmamış olan grupta zigomada kemik uçlarının kendi kendini rejenere etmesiyle, yani osteogenez ile az miktarda kemik oluşumu meydana gelmiştir. YDKKH uygulanan grupta ise bu oluşuma ek olarak, yağ doku kökenli mezenkimal hücrelerinin etkisiyle osteoindüksiyon tarzında kemik formasyonu izlenmiştir. Bu iki farklı mekanizmanın kemik oluşumuna katkısı kritik boyutta defekt oluşturulup YDKKH uygulanmayan grup sayesinde ayırt edilmiştir. 20. haftada YDKKH uygulanan ve uygulanmayan gruplardaki kemik oluşum miktarları arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p=0.033$). YDKKH uygulanmamış grupta az miktarda kemik oluşumu görülmesi ve bazı örneklerde kırık mesafesinde bizzat artış gözlenmesi nedeniyle, YDKKH nin yüz kırıklarının iyileşmesini pozitif yönde artırabileceği sonucuna varılmıştır. Burada temel kazanç, yeni oluşacak kemik miktarının fazla olmasını sağlamak ve kırık uçlarının nekroz olma riskini azaltmaktır.

Bunun yanısıra az miktarda da olsa YDKKH uygulanmış grupta izlenen kemik formasyonu tamir sürecinin sadece uygulama ile ilgili olmadığını aynı zamanda kemiğin de kendini az miktarda rejenere edebilme kapasitesinde olduğunu göstermiştir. Böylece, yüz kemiklerinde kısıtlı düzeyde rejenerasyon kapasitesinin olduğu belirlenmiştir.

Yağ dokusu, baskın hücre tipi yağ hücreleri (adiposit) olan bağ dokusunun özel bir tipi olup mezenkimal kökenlidir. Adipositler bağ dokusunda tek başına olabilecekleri gibi küçük gruplar halinde de bulunabilir. Yağ dokusu, zengin bir vasküler yatak ve sinir ağına sahip bir bağ dokusu ile tam olmayan lobüllere bölünmüştür. Adipositler, retiküler liflerden zengin ince ve ağ seklinde bir yapı ile desteklenerek birbirlerine bağlanırlar. Yağ dokusunda bulunan hücrelerin yaklaşık

üçte ikisi adipositlerdir. Diğer hücreler; çeşitli kan hücreleri, endotel hücreleri, perisitler, fibroblastlar ve çeşitli farklılaşma evrelerinde olan öncül hücrelerdir (136).

Yağ dokusu insanlarda ilk olarak embriyonal hayatın üçüncü ayından itibaren vücudun çesitli bölgelerinde (yanak, boyun, omuzlar, kalça, perirenal) görülmeye başlar. İlk olarak içinde yağ bulundurmayan yoğun mezenkimal hücre kümeleri oluşur ve bunlar organize damar ağıyla sarılır. Kapillerlerin çevresinde yoğun yağ içeren öncü yağ hücresi kümeleri olusur. Yağ dokusu gelişiminin son aşamasında yağ hücrelerinin boyutu artarken bunları çevreleyen septalar oluşur. Embriyogenez esnasında yağ dokusu oluşumu ile damar ağı oluşumunun sıkı bir ilişki içinde olduğu görülür. Yağ hücrelerinden salınan spesifik büyüme faktörlerinin anjiogenezisi yönlendirmesi önemli bir konudur (136). Büyüme faktörlerine ek olarak salınan 'monobutyrin' yağ dokuya spesifik bir anjiogenez faktörüdür (136,137).

Yağ dokusu adipositlerin içerdiği lipid damlacıklarına göre uniloküler (beyaz) ve multiloküler (kahverengi) yağ dokusu olarak sınıflandırılır. Beyaz adipositler sadece büyük bir yağ vakuolüne sahiptir. Yağ asitlerinin depolanması ve kullanılmasında rol alırlar. Kahverengi adipositler multilokülerdir ve hücre içinde bol miktarda mitokondri vardır. Uyarıldıklarında depolanmıs kimyasal enerjiyi ısıya dönüştürürler. Yağ dokusunun görevleri sunlardır; Enerji depolama, yağda eriyen vitaminleri depolama, fiziksel koruma, ısı üretimi, adipokin (adipositokin) salınımıdır. Adipokinler yağ dokudan salınan protein yapısındaki maddeler olup endokrin, parakrin ve otokrin etkilere neden olurlar (138). Fraksiyonlarına ayrılmış yağ dokusu alt katmanında (Stromal vasküler fraksiyon) içerisinde preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler bulunmaktadır (136). Stromal vasküler fraksiyon içerisindeki kök hücreler uygun ortamlarda çoğalabilmekte, farklılaşabilmektedir. Bu hücreler tedavi amaçlı doku yenilenmesinde büyük bir potansiyel olusturmaktadır. Yağ dokudan elde edilen kök hücreler, kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerle aynı işleve sahiptir. Yağ dokunun avantajı daha kolay bir yöntemle elde edilebilmesidir (139-140).

Stromal vasküler fraksiyonun, granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), damar endoteli büyüme faktörü (VEGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), bazik fibroblast büyüme faktörü (b-FGF), ve transforming growth faktör -ß (TGF- ß)

gibi anjiogenik ve antiapoptotik sitokinleri üretme potansiyeli vardır. Hipoksik ortamda stromal vasküler fraksiyondan VEGF salınımının belirgin derecede artmaktadır (141).

Anjiogenez, yani yeni damar oluşumu, yara iyileşmesinde önemli bir basamaktır. Dokuların islevlerini yerine getirebilmesi için kendilerine özgü damarlanma yapısına sahip olmaları gereklidir. Damar endoteli büyüme faktörü, endotel hücre büyümesinin güçlü bir uyaranıdır (142). Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan preadipositler adipojenik öncü hücre olmalarının yanı sıra mikrovasküler endotelyal hücrelerle parakrin etkileşim göstermektedir. Preadipositler tarafından salınan 'monobutyrin' bir anjiogenik faktör olup endotelyal hücre proliferasyonuna neden olmaktadır (137,142). Stromal vasküler fraksiyon içerisinde bulunan bir diğer hücre grubu fibroblastlardır. Fibroblastların ana metabolik fonksiyonları, kollajen, proteoglikan ve elastin sentezidir. Fibroblastlardan salınan keratinosit büyüme faktörü (KGF) epidermal hücre büyümesini uyarır, TGF-ß ise fibrozisi ve gerilim kuvvetini artırır, platelet kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) nötrofil, makrofaj, endotel hücrelerin çoğalmasını ve kemotaksisini uyarır (143).
Kök hücreler kendini yenileyebilen, uzun süre canlı kalabilen, özelleşmiş hücrelere dönüşebilen hücrelerdir .

Kök Hücre Tipleri

Totipotent Kök Hücre: Plasental yapılar dahil vücuttaki tüm hücrelere dönüşebilen ilk embriyonal hücrelerdir. Yeni bir canlı oluşturabilir.

Pluripotent Kök Hücre: Zigot oluşumunu takip eden 5. günden sonra oluşan ve plasental yapılar hariç her hücre türüne dönüşebilen hücrelerdir. Canlının her hücre tipini oluşturabilir ancak yeni bir canlı oluşturamazlar.
Multipotent Kök hücre: Belirli hücre türlerine dönüşebilen kök hücrelerdir. Örn: multipotent hemapoetik kök hücreler gerektiğinde eritrosit, lökosit veya trombositlere dönüşebilirler.

Yağ dokusundan elde edilen kök hücreler erişkin kök hücrelere örnektir ve mezenkimal kökenlidir. Erişkin kök hücreleri multipotent veya pluripotent kök hücre yapısında olabilir (144,139). "Erişkin kök hücresi" bir doku veya organdaki farklılaşmış hücreler arasında bulunan farklılaşmamış hücre olup, bu hücre kendini yenileyebilir ve içinde bulunduğu doku veya organın özelleşmiş hücre türlerine farklılaşabilir. Erişkin kök hücrelerinin yaşayan organizmadaki esas görevi bulundukları dokuyu tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır. Dokularda bulunan kök hücrelerden salınan anjiogenik, antiapopitotik ve mitojenik faktörler hasara uğramış dokuların rejenerasyonunu sağlar, çoğu dokuda gösterilmiş olan kök hücrelerin çoğalması ve farklılaşmasını artırır, inflamasyon ve immün reaksiyonları azaltırlar (145). Zuk P ve ark. 2002 yılında yaptıkları çalısmada "işlenmiş lipoaspiratın (PLA)" kök hücre içerip içermediğini ortaya koymak ve bu hücrelerin farklılaşma potansiyellerini değerlendirmek için bir dizi moleküler ve biyokimyasal tanımlama yaptılar. İşlenmiş lipoaspirat hücrelerinin kemik iliği kaynaklı kök hücrelerle aynı yüzey antijenik özellikleri gösterdikleri, uygun kimyasal uyaranlarla adipojenik, osteojenik, kondrojenik, myojenik ve nörojenik hücreler gibi birçok hücreye farklılaşma kapasitesine sahip olduklarını gösterdiler. Bu hücreleri "Yağ doku kaynaklı kök hücre (ADSC)" olarak adlandırdılar (144). Kern S ve ark. tarafından yapılan çalışmada kemik iliği kaynaklı kök hücreler, göbek kordonu kaynaklı kök hücreler ve yağ doku kaynaklı kök hücreler birbiri ile karşılaştırıldı. Her üç kaynaktan elde edilen kök hücrelerin aynı fibroblastoid morfolojiye sahip olduğu, aynı kolonileri oluşturdukları, aynı multipotansiyel farklılaşma yeteneğine sahip oldukları ve benzer yüzey proteinlerine sahip oldukları gösterildi. Osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşma kapasitesinin ADSC'lerde diğer iki gruba göre daha yüksek oranlarda gerçekleştiği görüldü (146). Kim WS ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda; ADSC'lerin fibroblastlardan kollajen sentezini uyararak dermis kalınlığını arttırdığı (147,148), güçlü bir antioksidan aktivite göstererek dermal fibroblastları oksidatif hasardan koruduğu (149), serbest radikallere bağlı oluşan deri hasarını önlediği ve farelerde olusturulan tam kat yanık yaralarının iyileşmesini belirgin derecede hızlandırdığı gösterildi (150). Park BS ve ark.'nın ADSC'lerin salgı fonksiyonlarını araştırmak için yaptıkları çalışmada ADSC'lerin platelet

kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), plasental büyüme faktörü (PlGF), b-FGF, KGF, TGF ß1 - ß2, HGF ve VEGF, kollajen ve fibronektin salgıladıkları gösterildi (151). Yağ doku kaynaklı kök hücrelerin yağ doku, kemik, kıkırdak, iskelet kası, kalp kası, nöral hücre, hemopoetik hücre, endotel hücresi, epitel hücre ve hepatosite farklılaşabildiği in-vivo ve in-vitro deneylerle gösterildi (144,152). Yağ doku kaynaklı kök hücreler anjiogenik ve antiapopitotik büyüme faktörleri salgılamakta ve bu salgıları hipoksik ortamda daha da fazla olmaktadır. Yağ doku kaynaklı kök hücreler aynı zamanda progenitör hücrelerin endotel hücrelerine farklılaşmasını arttırmaktadır (153). Damar endoteli büyüme faktörü iyileşmekte olan yarada damarlanmanın temel düzenleyicilerindendir (154). Lu F ve ark. tarafından yapılan çalışmada random patern deri fleplerine lokal olarak ADSC uygulandı ve kan akımında ve flep canlılığında belirgin artış olduğu gözlendi. Bu artışın hem ADSC'lerin direk olarak endotel hücrelere farklılaşmasına hem de indirek olarak salgıladıkları anjiogenik büyüme faktörlerine bağlı oluştuğu sonucuna varıldı (155). İskemik dokuların yeniden damarlanması ve fonsiyonlarının tekrar kazanılmasında mezenkimal kök hücrelerin tedavi edici potansiyelleri ile ilgili kanıtlar gün geçtikçe artmaktadır. Uysal CA ve ark. tarafından yapılan çalışmada ADSC'lerin iskemi-reperfüzyon hasarını önlediği gösterildi (156). Ebrahimian TG ve ark. tarafından yapılan çalışmada yaralara lokal olarak ADSC uygulandı. Yesil floresan protein ile işaretli ADSC'lerin dermal ve epidermal dokulara yerleştiği ve epidermal marker olan K5 ve K14 sentezlediği gösterildi (157). Rigotti ve ark. tarafından radyonekrozlu dokulara lipoaspirat uygulandığında dokuların yenilendiği ve semptomların düzeldiği gösterildi (158). Rejeneratif tıp, hasarlı dokuların yenilenmesinde vücudun kendi kök hücrelerinin ve büyüme faktörlerinin kullanılması esasına dayanan alternatif bir tedavi stratejisi oluşturmaktadır (144,147,151,153,157,159,160).

Çalışmamızda yağ doku kaynaklı kök hücreler seçilmiştir. Bu hücreler geleneksel olarak kemik iliğinden elde edilen kök hücrelere göre elde etme koşulları açısından daha avantajlıdır. Yanı sıra bu hücrelerin elde edilmesi yağ emme gibi plastik cerrahi alanında kullanılan bir yöntemle olmaktadır. YDKKH'lerin en az

(161) kemik iliği kaynaklı kök hücreler kadar değişik hücrelere farklılaşabildikleri gösterilmiştir.

Saflastırılmıs yağ doku kaynaklı kök hücrelerinin etkinliği heterojen hücre karışımından oluşan SVF (Stromal vasküler fraksiyon) ile karşılaştırıldığında in-vitro farklılaşma potansiyeli daha fazladır (160). Ancak SVF den ADSC izolasyonunda daha fazla teknik ekipmana ihtiyaç duyulmakta, daha uzun zaman gerektirmekte ve tedavi maliyetini yükseltmektedir. Fraktür, yanık gibi acil müdahale gerektiren yaralanmalarda taze elde edilen SVF kullanılması daha uygun olacaktır. Kişinin kendisinden elde edilen SVF'nun uygulanmasının dokunun yenilenmesine yardımcı olacağı, hasar görmüş ancak canlılığını koruyan hücreleri kurtaracağı, cerrahi tedavi gereksinimini ve dolayısıyla morbidite ve mortaliteyi azaltabileceği düşünülmektedir.

Kranial kemik defektlerinin kapanmasında 19. yüzyıldan günümüze kadar otojen greftler, sentetik, yarısentetik ve alloplastik materyaller kullanılmıştır (162). Kranial kemik defektinin iyileşmesi sırasında ölü boşluğu çevreleyen dokuların sağlıklı olması gerekmektedir. Kraniyumda periosteum ve özellikle dura bu olayda önemlidir (163).

Çalışmamızda 3BBT ile sağ ve sol zigomada; yani deney ve kontrol grubunda aynı kesitte veri elde edildiğinde, BT'nin yeni kemik rejenerasyonunu tespit etmedeki olası dezavantajlarının (163) her iki gruba eşit yansıması nedeniyle göz ardı edilebileceği düşünülmüştür.

Ayrıca yağ enjeksiyonunun kemik fragmanlar arasında yeni kemik oluşumunu negatif yönde etkileyebilecek bir barier oluşturma ihtimali çalışmanın başında temel endişelerimizden biriydi. Ancak çalışmanın sonunda yağ enjeksiyonu uygulanan grupta daha iyi kemik rejenerasyonu gözlenmesi ve bunun istatistiksel olarak anlamlı bulunmuş olması, bu endişemizin yersiz olduğunu gösterdiğini düşünüyoruz.

Bu çalışmada kritik büyüklükteki defekt alan ölçümünün değerlendirmesinde haftalara göre değişim incelendiğinde yapılan karşılaştırmalar sonucunda 10. haftada sağ (deney grubu) ve sol (kontrol grubu) zigomada meydana

gelen yeni kemik oluşum miktarları arasında istatistik olarak anlamlı bir fark bulunmamasına karşın (p=0.317), 20. haftada sağ (deney grubu) zigomada meydana gelen yeni kemik oluşum miktarları kontrol grubundan istatistik olarak anlamlı düzeyde daha fazla bulunmuştur (p=0.033).

10. haftada yapılan histolojik incelemede deney grubunda 5 örneğin 4'ünde yeni kemik oluşumu izlenirken; kontrol grubunda 5 örneğin sadece 1'inde yeni kemik oluşumu tespit edildi.

20. haftada yapılan histolojik incelemede deney grubunda 13 örneğin 8'inde yeni kemik oluşumu izlenirken; kontrol grubunda 13 örneğin sadece 1'inde yeni kemik oluşumu tespit edildi.

10. haftada yapılan histolojik incelemede deney grubunda kontrol grubuna göre; daha organize ve belirgin osteoblastik aktivite, daha belirgin osteoid formasyon (yeni kemik oluşumu) gözlendi. 20. haftada deney grubu kontrol grubuna göre nekrozun, dejenerasyonun daha az olduğu, organize ve belirgin osteoblastik aktivite, osteoid formasyonu (yeni kemik oluşumu), kemik matürasyonunun daha belirgin olduğu gözlendi.

Kemik defektlerinin kapatılması için bildirilen ana yöntemlerden; osteoindüksiyon, osteokondüksiyon, kemik greftleri kullanımı, distraksiyon osteogenezinden (135); biri olan osteoindüksiyon yönteminde ilerleyebilmek için öncelikle dokuların kendi aralarında mevcut olan doğal indüksiyon mekanizmalarının ortaya konması gerekecektir. Buradan elde edilen bilgiler ile invazif girişimler yapmaksızın kemik defektlerini onarmak veya kırık iyileşmesini hızlandırmak mümkün olacaktır. Bizim yaptığımız çalışmada yağ kökenli kök hücrelerin osteogenezi indüklemiş olduğu kanaatine ulaştık. Bu konunun üzerinde daha kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiğini düşünüyoruz.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmanın sonuçları özetlenecek olursa;

1- Yüz kırıklarında iyileşme ossöz iyileşmedir.
2- Yüz kemiklerinin iyileşmesinin sadece osteogenez ile olduğu belirtilen klasik bilginin aksine, iyileşme sürecinde osteogenez ve kondrogenez beraber izlenmektedir. Bu iyileşme biçimi kısmen enkondral iyileşmeye benzemektedir.
3- Yüz kemikleri az düzeyde rejenerasyon kapasitesine sahiptir.
4- Yağ doku kökenli kök hücreler, osteogenezi potansiyalize edebilir.
5- Yağ hücre hazırlığı aşamasındaki santrifüj işleminin (3500 devirde 4 dakika) uygulama sonrasındaki yağ dokusu canlılığı ile ilişkilendirilen az sayıda çalışmadan biri olduğunu düşünmekteyiz. Bu nedenle, bu çalışmanın bu alanda yapılacak ileri dönem çalışmalara referans teşkil edecek deneysel bir çalışma olarak yerini alacağı düşünülebilir.
6- Zigoma kritik defekt modeli üzerinde yapılmış adipoz kökenli kök hücrelerin kemik iyileşmesine katkısı ile ilgili litaratür araştırması bulunmamaktadır. Bu çalışma litaratüre katkı sağlayacaktır.
7- Çalışmanın sonucunda yağ doku kökenli kök hücre uygulanmış kemik uçlarında nekroz gelişme ve defektin genişleme olasılığı daha düşük olduğu bulunmuştur ($p=0.033$).
8- Doku indüksiyonunda alınacak mesafeler, greft kullanmadan doku ve organ üretebilmeyi sağlayabilecektir kanaatindeyiz.

7. KAYNAKLAR

1. Thaller, S. R., Kawamoto, H. K. A histologic evaluation of fracture repair in the midface. *Plast. Reconstr. Surg*. 85: 196, 1990.
2. Skowronski PP, An YH: Bone graft materials in orthopaedics. Musc Orthopaed J 6:58–66,2003;
3. Hollinger JO, Mark DE, Goco P, Quigley N, Desverreaux RW, Bach DE. A comparison of four particulate bone derivatives. Clin Orthop Relat Res. (267):255-263, 1991
4. Frame JW: A convenient animal model for testing bone substitute materials. J Oral Surg.38(3):176-180, 1980
5. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. Clin Orthop Relat Res. (205):299-308, 1986
6. Pryor ME, Susin C, Wikesjo UM: Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. J Clin Periodontol. 33(6):455-460, 2006
7. Arinzeh TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S: Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. J Bone Joint Surg Am. 85-A(10):1927-1935, 2003
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science. 284(5411):143-147, 1999
9. Siemionow Maria Z., Ozmen S: The Role of The Stem Cells in Plastic Surgery. Tissue Surgery Maria Z. Siemionow (ed.), Springer-Verlag London Limited 2006, page:143-157.
10. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG: Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications.Stem Cells. 19 (3):180-92, Review, 2001

11. Caplan AI: Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 9(5):641-650, 1991
12. Colter DC, Class R, DiGirolamo CM, Prockop DJ. Rapid expansion of recycling stem cells in cultures of plastic-adherent cells from human bone marrow. Proc Natl Acad Sci U S A. 28;97(7):3213-8. 2000.
13. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. Blood. 98:2396-2402, 2001
14. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R: Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. Exp Hematol. 30(1):42-48, 2002
15. Chohan R, Vij R, Adkins D, Blum W, Brown R, Tomasson M, Devine S, Graubert T, Goodnough LT, DiPersio JF, Khoury H: Long-term outcomes of allogeneic stem cell transplant recipients after calcineurin inhibitor-induced neurotoxicity. Br J Haematol. 123(1):110-113, 2003
16. Devine SM, Peter S, Martin BJ, Barry F, McIntosh KR: Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. Cancer J. 7 Suppl 2:S76-82, 2001
17. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM: Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. Injury. 36(1):203-206, 2005
18. Kraus KH, Kadiyala S, Wotton H, Kurth A, Shea M, Hannan M, Hayes WC, Kirker-Head CA, Bruder S: Critically sized osteo-periosteal femoral defects: a dog model.J Invest Surg. 12(2):115-124, 1999
19. Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A: Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. Indian J Med Sci. 55(6):326-336, 2001
20. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. J Bone Joint Surg Am. 80(12):1745-1757, 1998
21. Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K: Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by

coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. Wound Repair Regen. 12(2):252-259, 2004

22. Okazaki H, Kurokawa T, Nakamura K, Matsushita T et al. Stimulation of Bone Formation by Recombinant Fibroblast Growth Factor-2 in Callotasis Bone Lengthening of Rabbits. Calfic Tissue Int 1999;64:542-546
23. Orban, B. Orban's Oral Histology and Embriology, 7th ed., St. Louis, CV Mosby, sayfa 202, 1972.
24. Paten, B. M. Human Embriology, 3rd ed. New York, McGraw-Hill, sayfa 229, 1968.
25. Hamilton, W. J., Mossman, H. W. Human Embriology, 4th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, sayfa 527, 1972.

Ham, A. W. Histology, 7th ed. Philadelphia, J. B. Lippincott, sayfa 378, 1974.

26. Knize, D. M. The influence of periosteum and calcitonin on onlay bone graft survival. A roentgenographic study. *Plast. Reconstr. Surg*. 53: 190, 1974.
27. Thaller, S. R., Kim, J. C., Kawamoto, H. K. Calvarial bone graft donor site: A histological model in a rabbit model. *Ann. Plast. Surg*. 23: 390, 1989.
28. Biltz, R. M., Pellegrino, E. D. The chemical anatomy of bone. *J. Bone Joint Surg*. 56: 456, 1969.
29. Aronson, J., Good, B., Steward, C. Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenezis. *Clin. Orthop*. 250: 43, 1990.
30. Glowacki, J. Inflammation and bone formation. Bone formation and repair. C 28, Brighton C.T. ed, American Academy of Orthopaedic Surgeons, sayfa 395, 1994.
31. Wienmann, J. P., Sicher, H. Bone and Bones. St. Louis: Mosby, sayfa 306, 1985.
32. McLean, F., Urist, M. R. Bone: Fundamentals of the Physiology of Skeletal Tissue, 3rd ed. Chicago, University of Chicago Press, sayfa 205, 1968.
33. Dingman, R. O. and Harding, R. L. Treatment of malunion of fractures facial bones. *Plast. Reconstr. Surg*. 7: 505, 1951.
34. Kappel, D., Craft, P., Robinson, D. The significance of persistant radiolucency of mandibular fractures. *Plast. Reconstr. Surg*. 53: 38, 1974.

35. Tucker, P., Craft, P., Nitsch, S., Evaluation of membraneous bone healing. Presented at the 31st Plastic Surgery Research Council Meeting. Norfolk, Virginia. May 21, 1985.
36. Craft, P. D., Mani, M. M., Pazel, J. Experimental study of healing in fractures of membraneous bone. *Plast. Reconstr. Surg*. 78: 300, 1986.
37. Danis, R. Theroie et Pratique de L'Osteosyntheses, Paris, Libraries de L'Acedemie de medicine, 1949.
38. Allgöwer, M., Spiegel, P. G. Internal fixation of fractures: Evolution concepts. *Clin. Orthop*. 138: 26, 1979.
39. Perren, S. M. Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin. Orthop.* 138: 175,1979.
40. Schenk, R. K., Willenegger, H. Zum Histologischen Bild der Sogenannten Primarheilung der Knockhenkompacta nach Experimentellen Osteotomien am Hund. *Experientia.* 19: 593, 1963.
41. Holmström, T., Paavolainen, P., Statis, P. Effect of compression on fracture healing. Plate fixation study in rabbits. *Acta Orthop. Scand.* 57: 368, 1986.
42. Goodship, A. E., Kenwright, J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. JBJS. 67B: 650, 1985.
43. Kenwright, J., Goodship, A. E., Kelly D. J. Effect of controlled axial micromovement on healing of tibial fractures. *Lancet.* 2: 1185, 1986.
44. Rever, L. J., Manson, P. N., Randolph, M. A., Yaremchuk, M. J., Weiland, A., Siegel, J. H. The healing of facial bone fractures by the process of secondary union. *Plast. Reconstr. Surg*. 87: 451, 1991.
45. Einhorn, T. A. Current concept review. Enhancement fracture healing. *JBJS*. 77A: 940, 1995.
46. Nielsen, H. M., Bak, B., Jorgensen, P. H. Growth hormon promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop. Scand.* 62: 244, 1991
47. Macy, L. D., Kana, S. M., Jingushi, S. Defects of early fracture healing in experimental diabetes. *JBJS*. 71A: 722, 1989.
48. Urist, M. R., Silverman B. F., Büring K., Dubuc, F. L., Rosenberg, J. M. Bone induction principle. *Clin. Orthop.* 53: 243, 1967.

49. Reddi, A. H., Wientroub, S., Muthukumaran, N. Biologic principles of bone induction. *Orthopaedic Clinics of North America*. 18: 207, 1987.
50. Macewen, W. Observations concerning transplantation of bone. Illustrated by a case of inter human osseous transplantation. Whereby over two-thirds of the shaft of a humerus was restored. *Proc. Roy. So. London*. 32 : 232, 1881.
51. Konig, F. Der Knocherne Ersatz grosser Schadeldefekte. *Zentralbl. Chir*. 17: 467, 1890.
52. Muller, W. Zur Frage der temporaren Schadel an Stelle der Trepanation. *Zentralbl. Chir.* 17: 65, 1890.
53. Phillips, J. H., Rahn, B. A. Fixation effect on membraneous and endochondral onlay bone graft revascularization and bone deposition. *Plast. Reconstr. Surg.* 85: 891, 1990.
54. Peer, L. A. Transplantation of tissues. Vol.1. Baltimore, Williams & Wilkins, sayfa 181, 1995.
55. Boyne, P. J. Osseous healing after oblique osteotomy of the mandibular ramus. *J. Oral Surg*. 24: 125, 1966.
56. Sharm, S., Garg, N., Veliath, A. J. Percutaneous bone marrow grafting of osteotomies and bony defect in rabbits. *Acta Orthop. Scand*. 63: 166, 1992.
57. Constantz, B. R., Ison, I. C., Fulmer, M. T., Poser, R. D. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science.* 267: 1796, 1995.
58. Mustoe, T. A., Pierce, G. F., Thomason, A. Accelerated healing of incisional wounds induced by transformation growth factor beta. *Science.* 237: 1333, 1987.
59. Twasaki, M., Nakahara, H., Nakata, K., Nakase, T., Kımura, T., Ono, K., Japan, O. Regulation of proliferation and osteochondrogenic differentiation of periosteum-derived cells by transforming growth factor-β and basic fibroblast growth factor. *J. Bone Joint Surg*. 77: 543, 1995.
60. Joyce, M. E., Roberts, A. B., Sporn, M. B. Transforming growth factor beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *Cell Biol. Surg.* 110: 2195 1990

61. Johnson, E. E., Urist, M., Finerman, G. A. M. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions. A preliminary report. *Clin. Orthop.* 230: 257, 1988.
62. Johnson, E. E., Urist, M., Finerman, G. A. M. Distal metaphysial tibial nonunion. Deformity and bone loss treated by open reduction, internal fixation and human bone morphogenetic protein. *Clin. Orthop.* 250: 234, 1990.
63. Xiaobo, H., Lunlong, Y., Chuanzin, L. Experimental and clinical investigations of human insoluble bone matrix gelatin. A report of 24 cases. *Clin. Orthop.* 293: 360, 1993.
64. Takagi, K.Urist, M. R. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.* 196: 100, 1982.
65. Muthukumaran, N., Ma, S., and Reddi, A. H. Dose-dependence of and threshold for optimal bone induction by collagenous bone matrix and osteogenin enriched fraction. *Collagen Rel. Res*. 8: 433, 1998.
66. Thaller, S. R., Hoyt, J., Tesluk, H., Holmes, R. Effect of insulın-like growth factor-1 on zygomatic arch bone regeneration: A preliminary histological and histometric study. *Ann. Plast. Surg*. 31: 421, 1993.
67. Takagi K, Urist MR: The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. Ann Surg. 196(1):100-109, 1982
68. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M: Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. Int J Oral Maxillofac Surg. 30(1):58-62, 2001
69. Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE: Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. J Cell Biochem. 64(2):278-294, 1997
70. Devine SM: Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? J Cell Biochem Suppl. 38:73-79, 2002
71. Wickham MQ, Erickson GR, Gimble JM, Vail TP, Guilak F: Multipotent stromal cells derived from the infrapatellar fat pad of the knee. Clin Orthop Relat Res. (412):196-212, 2003

72. Van Damme A, Vanden Driessche T, Collen D, Chuah MK: Bone marrow stromal cells as targets for gene therapy. Curr Gene Ther. 2(2):195-209, 2002
73. Connolly JF: Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. Clin Orthop Relat Res. (313):8-18, 1995
74. Abedin M, Tintut Y, Demer LL: Mesenchymal stem cells and the artery wall. Circ Res. 95(7):671-676, Review, 2004
75. Fickert S, Fiedler J, Brenner RE: Identification of subpopulations with characteristics of mesenchymal progenitor cells from human osteoarthritic cartilage using triple staining for cell surface markers. Arthritis Res Ther. 6(5):R422-432, 2004
76. Davy DT: Biomechanical issues in bone transplantation. Orthop Clin North Am. 30(4):553-63, 1999
77. Virchow R: Cellular pathology. London: John Churchill, 1863.
78. Erices A, Conget P, Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. Br J Haematol. 109(1):235-242, 2000
79. Metheny-Barlow LJ, Tian S, Hayes AJ, Li LY: Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. Microvasc Res. 68(3):221-230, 2004
80. Otto WR, Rao J: Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. Cell Prolif. 37(1):97-110, 2004
81. Song L, Tuan RS: Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. FASEB J. 18(9):980-982, 2004
82. Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D, Jorgensen C: Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. Blood. 102(10):3837-3844, 2003
83. Majumdar MK, Thiede MA, Mosca JD, Moorman M, Gerson SL: Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. J Cell Physiol. 176(1):57-66, 1998
84. Simmons PJ, Torok-Storb B: Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. Blood. 78(1):55-62, 1991

85. Simmons PJ, Masinovsky B, Longenecker BM, Berenson R, Torok-Storb B, Gallatin WM: Vascular cell adhesion molecule-1 expressed by bone marrow stromal cells mediates the binding of hematopoietic progenitor cells. Blood. 80(2):388-395, 1992
86. Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F: Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. Blood. 105(7):2821-2827, 2005
87. Jiang XX, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N: Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. Blood. 105(10):4120-4126, 2005
88. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Gotherstrom C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O: Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. Lancet. 363(9419):1439-1441, 2004
89. Pountos I, Giannoudis PV: Biology of mesenchymal stem cells. Injury. 36 Suppl 3:S8- S12, 2005
90. Edwards JT, Diegmann MH, Scarborough NL: Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. Clin Orthop Relat Res. (357):219-228, 1998
91. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Gordon PL, Neel M, Sussman M, Orchard P, Marx JC, Pyeritz RE, Brenner MK: Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. Nat Med. 5(3):309-313, 1999
92. Koc ON, Day J, Nieder M, Gerson SL, Lazarus HM, Krivit W: Allogeneic mesenchymal stem cell infusion for treatment of metachromatic leukodystrophy (MLD) and Hurler syndrome (MPS-IH). Bone Marrow Transplant. 30(4):215-222, 2002
93. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. J Embryol Exp Morphol. 16(3):381-390, 1966

94. Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A: Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. Indian J Med Sci. 55(6):326-336, 2001
95. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S: The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. J Bone Joint Surg Am. 80(7):985-96, 1998
96. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R: Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in criticalsize defects of sheep long bones. J Biomed Mater Res. 49(3):328-337, 2000
97. Borden M, Attawia M, Khan Y, El-Amin SF, Laurencin CT: Tissue-engineered bone formation in vivo using a novel sintered polymeric microsphere matrix. J Bone Joint Surg Br. 86(8):1200-1208, 2004
98. Takahashi Y, Yamamoto M, Tabata Y: Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in biodegradable sponges composed of gelatin and beta-tricalcium phosphate. Biomaterials. 26(17):3587-3596, 2005
99. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME: Longterm healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. Clin Orthop Relat Res. (318):222-230, 1995
100. Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Giardino R, Rocca M, Corsi A, Benvenuti A, Bianco P, Quarto R, Martin I, Muraglia A, Cancedda R: Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. Calcif Tissue Int. 64(1):83-90, 1999
101. Muschler GF, Matsukura Y, Nitto H, Boehm CA, Valdevit AD, Kambic HE, Davros WJ, Easley KA, Powell KA: Selective retention of bone marrow-derived cells to enhance spinal fusion. Clin Orthop Relat Res. (432):242-251, 2005
102. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE: Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. Bone. 21(3):225-35, 1997

103. Devine SM, Hoffman R, Verma A, Shah R, Bradlow BA, Stock W, Maynard V, Jessop E, Peace D, Huml M, Thomason D, Chen YH, van Besien K: Allogeneic blood cell transplantation following reduced-intensity conditioning is effective therapy for older patients with myelofibrosis with myeloid metaplasia. Blood. 99(6):2255-2258, 2002**.**

104. Haynesworth SE, Baber MA, Caplan AI: Cell surface antigens on human marrow derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. Bone. 13(1):69-80, 1992

105. Brodke D, Pedrozo HA, Kapur TA, Attawia M, Kraus KH, Holy CE, Kadiyala S, Bruder SP: Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effectively as autograft. J Orthop Res. 24(5):857-866, 2006

106. Chang SC, Wei FC, Chuang H, Chen YR, Chen JK, Lee KC, Chen PK, Tai CL, Lou J: Ex vivo gene therapy in autologous critical-size craniofacial bone regeneration. Plast Reconstr Surg. 112(7):1841-1850, 2003

107. Meisel R, Zibert A, Laryea M, Gobel U, Daubener W, Dilloo D: Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. Blood. 103(12):4619-4621, 2004

108. Zuk, PA. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. *Mol Biol Cell.* 2010;21**(11)**:1783-7.

109. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng.* 2001 Apr;7**(2)**:211-28.

110. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, Alfonso ZC, Fraser JK, Benhaim P, Hedrick MH. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002 Dec;13**(12)**:4279-95.

111. Brown SA, Levi B, Lequeux C, Wong VW, Mojallal A, Longaker MT. Basic science review on adipose tissue for clinicians. *Plast Reconstr Surg.* 2010;126**(6)**:1936-46.

112. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, Eto H, Kato H, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy:

efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg.* 2008;34**(9)**:1178-85.

113. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Hirohi T, Harii K. Cell-assisted lipotransfer for cosmetic breast augmentation: supportive use of adipose-derived stem/stromal cells. *Aesthetic Plast Surg.* 2008;32**(1)**:48-55.

114. Semenza, GL. Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: mechanisms of blood vessel formation and remodeling. *J Cell Biochem.* 2007;102**(4)**:840-7.

115. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997;275**(5302)**:964-7.

116. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121**(1)**:50-8.

117. Li H, Zan T, Li Y, Weng R, Yang M, Du Z, Zhong S, Li Q. Tohoku. Transplantation of adipose-derived stem cells promotes formation of prefabricated flap in a rat model . *J Exp Med.* 2010;222**(2)**:131-40.

118. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, Guo S. Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2008;121**(1)**:5969.

119. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adiposederived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. *Plast Reconstr Surg.* 2009;124**(3)**:804-15.

120. Uysal CA, Ogawa R, Lu F, Hyakusoku H, Mizuno H. Effect of mesenchymal stem cells on skin graft to flap prefabrication: an experimental study. *Ann Plast Surg.* 2010;65**(2)**:237-44.

121. Simman R, Craft C, MMcKinney B. Improved survival of ischemic random skin flaps through the use of bone marrow nonhematopoietic stem cells and angiogenic growth factors. *Ann Plast Surg.* 2005;54**(5)**:546-52.

122. Nakagami H, Maeda K, Morishita R, Iguchi S, Nishikawa T, Takami Y, Kikuchi Y, Saito Y, Tamai K, Ogihara T, Kaneda Y. A. Novel autologous

cell therapy in ischemic limb disease through growth factor secretion by cultured adipose tissuederived stromal cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25**(12)**:2542-7.

123. Yu LH, Kim MH, Park TH, Cha KS, Kim YD, Quan ML, Rho MS, Seo SY, Jung JS. Improvement of cardiac function and remodeling by transplanting adipose tissuederived stromal cells into a mouse model of acute myocardial infarction. *Int J Cardiol.* 2010;139**(2)**:166-72.

124. Yaşar Z., Bozkurt M., Kapı E., Fırat U.,Sıçan modelinde otojen yağ grefti canlılığına, santrifüj işleminin etkilerinin araştırılması, Turk Plast Surg 2010;18(3)

125. Jacenko, O., San Antonio, T. D., Tuan, R. S. Chondrogenic potential of chick embryonic calvaria: II. Matrix calcium may repress cartilage differentiation. *Dev. Dyn.* 202: 27, 1995.

126. Grimson, K. S. Healing of fractures of the mandible and zygoma. *J. Am. Dent. Assoc*. 24: 1458, 1937.

127. Yamamoto N, Akamatsu H, Hasegawa S et all. Isolation of multipotent stem cells from mouse adipose tissue. J Dermatol Sci. 2007;48(1):43-52.

128. Hall, B. K., Miyake, T. The membraneous skeleton: The role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat. Embryol*. 186: 107, 1992.

129. Mossaz, C. F., Kokich, V. G. Redevelopment of calvaria following partial craniectomy in growing rabbits: The effect of altering dural continuity. *Acta Anat. Basel.* 109. 321, 1981

130. Reid, C. A., McCarthy, J. G., Kolber, A. B. A study of regeneration in parietal bone defects in rabbits. *Plast. Reconstr. Surg.* 67: 591, 1981

131. Hobar, P. C., Schreiber, J. S., McCarthy, J. G., Thomas, P. A. The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plast. Reconstr. Surg*. 92: 405, 1993.

132. Küçükkaya, M. Distraksiyon osteogenezi ve klinik uygulamalarımız. Uzmanlık Tezi. Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi. İstanbul, 1997.

133. Ailhaud G, Grimaldi P, Négrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. Annu Rev Nutr. 1992;12:207-33.

134. Wilkison WO, Choy L, Spiegelman BM. Biosynthetic regulation of monobutyrin, an adipocyte-secreted lipid with angiogenic activity. J Biol Chem. 1991;266(25):16886-91.

135. Frühbeck G, Gómez-Ambrosi J, Muruzábal FJ, Burrell MA. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2001;280(6):827-47.

136. Boquest AC, Shahdadfar A, Frønsdal K et all. Isolation and transcription profiling of purified uncultured human stromal stem cells: alteration of gene expression after in vitro cell culture. Mol Biol Cell. 2005;16(3):1131-41.

137. De Francesco F, Tirino V, Desiderio V et all. Human CD34/CD90 ASCs are capable of growing as sphere clusters, producing high levels of VEGF and forming capillaries. PLoS One. 2009;4(8):6537.

138. Rigotti G, Marchi A, Galiè M et all. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adiposederived adult stem cells. Plast Reconstr Surg. 2007;119(5):1409-22.

139. Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM. Vascular endothelial growth factor. Regulation by cell differentiation and activated second Messenger pathways. J Biol Chem. 1992;267(23):16317-22.

140. Lorenz PH, Longaker MT. Wound healing: Repair biology and wound and scar treatment. In: Mathes SJ(edt). Plastic Surgery (2nd ed). Saunders Elsevıer, California, 2006,Vol.1, p. 212

141. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et all. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. Mol Biol Cell. 2002;13(12):4279-95.

142. Karaöz E. , Ovalı E. Kök Hücreler (1 ed), Derya Kitapevi, 2004, sf.64

143. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells. 2006;24(5):1294-301.

144. Kim WS, Park BS, Sung JH, et all. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci. 2007;48(1):15-24.

145. Kim WS, Park BS, Park SH, Kim HK, Sung JH. Antiwrinkle effect of adipose-derived stem cell: activation of dermal fibroblast by secretory factors. J Dermatol Sci. 2009;53(2):96-102.

146. Kim WS, Park BS, Kim HK,et all. Evidence supporting antioxidant action of adipose-derived stem cells: protection of human dermal fibroblasts from oxidative stress. J Dermatol Sci. 2008;49(2):133-42.

147. Kim WS, Park BS, Sung JH. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. Arch Dermatol Res. 2009;301(5):329-36.

148. Park BS, Jang KA, Sung JH, Park JS, Kwon YH, Kim KJ, Kim WS. Adipose-derived stem cells and their secretory factors as a promising therapy for skin aging.Dermatol Surg. 2008;34(10):1323-6.

149. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, Ripoll C. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods. 2008;45(2):115-20.

150. Rubina K, Kalinina N, Efimenko A, et all. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors,and enhancing vessel maturation. Tissue Eng art A. 2009;15(8):2039-50.

151. Wilgus TA, Matthies AM, Radek KA. Novel function for vascular endothelial growth factor receptor-1 on epidermal keratinocytes. Am J Pathol. 2005;167(5):1257-66.

152. Lu F, Mizuno H, Uysal CA, Cai X, Ogawa R, Hyakusoku H. Improved viability of random pattern skin flaps through the use of adipose-derived stem cells. Plast Reconstr Surg. 2008;121(1):50-8.

153. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The effect of adipose-derived stem cells on ischemia-reperfusion injury: immunohistochemical and ultrastructural evaluation. Plast Reconstr Surg. 2009;124(3):804-15.

154. Ebrahimian TG, Pouzoulet F, Squiban C, et all. Cell therapy based on adipose tissue-derived stromal cells promotes physiological and pathological wound healing. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(4):503-10.

155. Rigotti G, Marchi A, Galiè M et all. Clinical treatment of radiotherapy tissue damage by lipoaspirate transplant: a healing process mediated by adiposederived adult stem cells. Plast Reconstr Surg. 2007;119(5):1409-22.

156. González MA, Gonzalez-Rey E, Rico L, Büscher D, Delgado M. Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adiposederived mesenchymal stem cells. Arthritis Rheum. 2009;60(4):1006-19.

157. Faustini M, Bucco M, Chlapanidas T et all. Nonexpanded mesenchymal stemcells for regenerative medicine: yield in stromal vascular fraction from adipose tissues. Tissue Eng Part C Methods. 2010;16(6):1515-21.

158. Carramenha e Costa MA, Carriquiry C, Vasconez LO, Grotting JC, Herrera RH, Windle BH. An anatomic study of the venous drainage of the transverse rectus abdominis musculocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg.* 1987;79**(2)**:208-17.

159. Bostrom R, Mikos A: Tissue engineering of bone. In: Atala A, Mooney DJ, Vacanti JP, etal (eds). Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds, vol 1. Boston: Birkhauser,:215–234, 1997

160. Ozerdem OR, Anlatici R, Bahar T, Kayaselcuk F, Barutcu O, Tuncer I, Sen O: Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. J Craniofac Surg. 14(3):371-9; discussion 380-382, 2003

161. Hobar PC, Schreiber JS, McCarthy JG, Thomas PA: The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. Plast Reconstr Surg. 92(3):405-410, 1993

162. Basterzi Y: Sıçan kraniyal kemik defektlerinde insan amniyon sıvısının kemik iyileşmesi üzerine etkisi, Uzmanlık tezi, Ankara-2003, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D. S: 15

163. Ozcelik D, Huthut I, Kuran I, Bankaoglu M, Orhan Z, Mayda AS: Comparison of accuracy of three-dimensional spiral computed tomography, standard radiography, and direct measurements in evaluating facial fracture healing in a rat model. Ann Plast Surg. 53(5):473-480, 2004