

T.C
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ A.D.

SIÇAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRE (sMKH)
UYGULAMASININ KRANİYAL KEMİK
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ

DR. SEBAHATTİN KANDAL

TEZ DANIŞMANI
YRD. DOÇ. DR. SELAHATTİN ÖZMEN

ANKARA-2006

ÖNSÖZ

Uzun ve zahmetli asistanlığım süresince benimle yakından ilgilenen ve daima yanımda olduğumu hissettiğim tez danışmanın Sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin Özmen'e; bilgi ve becerilerini her zaman büyük bir istekle paylaşan çok değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Osman Latifoğlu'na, Sayın Prof. Dr. M. Cemalettin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Kenan Atabay'a, Sayın Prof. Dr. Seyhan Çenetoglu'na, Sayın Doç. Dr. Reha Yavuzer'e, Sayın Doç. Dr. Sühan Ayhan'a ve Sayın Öğr. Gör. Dr. Serhan Tuncer'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Şafak Uygur'a, kök hücre elde edilmesinde büyük özveri ile çalışan Sayın Uzman İrem Akar Soycan ve Sayın Prof. Dr. Münici Yağcı'ya; radyolojik incelemeleri yapan Sayın Arş. Gör. Dr. Nuray Voyvoda ve Sayın Prof. Dr. Mehmet Araç'a; başta Dr. Yücel Demir ve Dr. Tolga Eryılmaz olmak üzere desteklerini her zaman hissettiğim araştırma görevlisi tüm arkadaşlarıma; ayrıca tezimin Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nda yapılmasına olanak sağlayan G.Ü.T.F. Deney Hayvanları Laboratuvarı ve Cerrahi Komisyonu üyelerine ve çalışmam boyunca her konuda yardımcı olan Sayın Vet. Dr. Şeyda Diker'e ve özveriyle çalışan tüm teknisyenlere teşekkür ederim.

Dr. Sebahattin KANDAL

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	4
III. GEREÇ VE YÖNTEM	43
IV. BULGULAR	61
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
VI. ÖZET	82
VII. İNGİLİZCE ÖZET	83
VIII. KAYNAKLAR.....	84

GİRİŞ

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.⁹⁴ Tüm bu seçeneklerin rezorbsiyon, enfeksiyon, doku reaksiyonu ve verici alan morbiditesi gibi dezavantajları vardır.⁴⁵ Kemik defektlerinin sekonder iyileşme ile kapanması arzu edilen ilk seçenektir ancak belirli büyüklüğün üzerindeki defektler kendiliğinden kapanamazlar.³⁷ Örnek olarak sıçanlarda kraniyal kemikler için bu büyüklük 6-8 mm çapındaki kemik defekti olarak bilinir.^{89,85} Sekonder iyileşmenin beklenmediği bu 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.^{5,82,90}

Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas gibi farklı mezenkimal dokulara ‘in vitro’ veya ‘in vivo’ olarak dönüşebilen multipotent, hematopoetik olmayan hücrelerdir.¹¹ Bunlar kemik iliği hücrelerinin yaklaşık %0,01 ile %0,001’ini oluşturur.¹⁹ Cam ve plastiğe yapıştıkları için hematopoetik kök hücrelerden kolaylıkla ayrılabilirler.²⁵ Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ, kas, deri gibi dokularda bulunurlar.¹⁸

İn vitro çalışmalarda MKH’ler bir takım faktörler ile muamele edilerek bu hücrelerin kemoatraksiyonlarının artırılması, dokuya özel mitotik genişlemelerinin sağlanması, belirli bir hücre grubuna doğru yönlendirilmeleri araştırılmıştır.¹⁷ Bir çok araştırma insan ve hayvan MKH’leri immün rejeksiyon yapan antijenler içermediği ve rejeksiyona sebep olmadığını bildirmektedir.^{7,23} Bu hipotezi destekleyen deneysel çalışmalarda da allojen MKH

transplantasyonunun otojen transplantasyonlar kadar başarılı olduğu göstermiştir.²⁸ Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen keratinositlerin veya dermal fibroblastların yara iyileşmesinde, kondrositlerin kırıldak iyileşmesinde, miyositlerin miyokard iyileşmesinde, retinal pigment epitel hücrelerinin yaşa bağlı maküler dejenerasyonda ve ‘Shwann’ hücrelerinin santral sinir sistemi’nin demiyelinizan hastalıklarının tedavisinde kullanımı araştırılmıştır.^{19, 82, 108}

Mezenkimal kök hücreler, bir matriks yardımı ile implant haline getirilip, hayvan modellerinde kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.^{5,19,40,58,93} Özellikle uzun kemiklerin kendiliğinden kapananmayan defektlerindeki kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini inceleyen araştırmalar vardır.^{5,19,58} Mezenkimal kök hücrelerin kraniyal kemikler gibi yassı kemikler üzerindeki etkinliğini inceleyen çok az çalışma vardır.⁴

Kemik defektlerinin onarımında kullanılan kemik materyalleri osteoindüktif veya osteokondüktif olabilir.⁹⁴ Bu amaçla kullanılan materyallerden birisi de demineralize kemik matriksi (DKM)’dir. Demineralize kemik matriksi osteoindüktif yapıda olup kemiğin asitle demineralizasyonu sonrası kemik iliği elemanlarından temizlenip antijenik özelliği yokedilmiştir.⁸⁸ Asıl etki mekanizmaları ‘kemik morfojenik protein (KMP)’ ler vasıtası ile olmaktadır. Kemik morfojenik proteinler ‘transforming growth factor- β (TGF- β)’ ailesinin bir alt grubu olup; küçük, hidrofobik, ısı dayanıklı proteinlerdir. Demineralize kemik matriksi içinde esas olarak kemik morfojenik protein 2’den 16’ya kadar olan proteinler bulunur.⁹ Demineralize kemik matriksinin osteindüktif potansiyeli in vivo hayvan modeli kullanılarak bakılabilir. İnsan kaynaklı DKM immünolojik reaksiyonlar göz önünde bulundurularak immün yetmezlikli hayvanlarda test edilmelidir. Bununla beraber bazı deneysel çalışmalarda insan

kaynaklı DKM immün yetmezlikli olmayan hayvanlarda kullanılmış ve etkinliği gösterilmiştir.⁷⁹

Bu çalışmanın amacı sıçanların kritik kraniyal kemik defektlerinin iyileşmesinde sıçan mezenkimal kök-hücre (sMKH) ve insan kaynaklı demineralize kemik matriksi (DKM) uygulamasının etkisini araştırmaktır.

GENEL BİLGİLER

1. KEMİK DOKUSU

Kemik, ekstrasellüler matriksi kalsifiye olan özel bir bağ dokusudur. Vücudun en sert yapısı olmasına rağmen kendi içerisinde dışarıdan gelen kuvvetlerle şekillenebilecek kadar dinamik bir dokudur. Üzerine gelen basınç rezorbsiyona neden olurken, gerilim kuvveti yeni kemik oluşumuna yol açar.⁶³ Kemik dokusu vücuttaki organları destekleyen ve koruyan bir yapı oluşturmanın yanında, üzerine yapışan kaslar sayesinde hareketlerin oluşturulmasında önemli bir yere sahiptir. Vücut kalsiyum depolarının % 99'unu içerisinde saklamakla kalmaz, içerdiği kemik iliği sayesinde hematopoetik bir organ gibi davranır.⁵⁴

Kemik dokusu eklem içi sinovyal yüzeyleri hariç periosteum denen tabaka ile sarılıdır. Periosteum kendi içerisinde dışta yoğun fibröz bir bağ dokusu ve içte osteoprogenitör hücreleri içeren hücresel bir tabakadan oluşmuştur.⁶³ Kemiklerin ortasındaki boşluk tek tabaka osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlardan oluşan endosteum tabakası ile örtülüdür.^{6,56,59}

Kemik dokusu ekstrasellüler kalsifiye matriks içerisindeki hücrelerden meydana gelir. Kalsifiye matriks esas olarak tip I kollajenden meydana gelen lifsi maddeler ve kondrotin sülfat ve keratan sülfat yan bağları içeren proteoglikanlardan zengin bir yapı içerir. Bunların yanında osteonektin, osteokalsin ve osteopontin gibi glikoproteinler ve kemik sialoproteinlerini de içerir.^{6,56}

1-1. Kemik Matriksi

İnorganik ve organik olarak ikiye ayrılır.

İnorganik matriks

Kemik kuru ağırlığının %65'ini oluşturur. Kalsiyum ve fosfor yanında bikarbonat, sitrat, magnezyum, sodyum ve potasyum içerir. Kalsiyum ve fosfor esas olarak 'hidroksiapatit kristalleri' şeklinde bulunur. 40 nm uzunluk, 25 nm genişlik ve 1,5-3 nm kalınlıktaki hidroksiapatit kristalleri kollajen boşlukları arasında depolanırken, yüzey iyonları su (H₂O) ile birleşir ve iyon alışverişini gerçekleştirir.⁵⁴ Kemik dokusunun sertliği kollajen doku ile hidroksiapatit kristalleri arasındaki etkileşime bağlıdır. Eğer kemik dekalsifiye edilirse orjinal şekli korumakla beraber kolay bükülebilir hale gelir.⁶³

Organik matriks

Kemik kuru ağırlığının %35'ini oluşturur. Organik komponentin %90'ını tip I kollajen yapar ve 67 nm aralıklarla yerleşmiş, 50-70 nm çapında çapraz bağlı liflerden oluşur. Bunun yanında kondrotin sülfat ve keratan sülfat gibi glikozaminoglikanları (GAG) içerir. Kemikteki glikoproteinler hidroksiapatite bağlanan osteokalsin, osteoblast ve osteoklastların üzerindeki integrinler ve hidroksiapatite bağlanan osteopontinlerdir. Vitamin D bu glikoproteinlerin sentezini artırır. Kemik sialoproteini ise osteoblast ve osteoklastların üzerindeki integrinlere bağlanarak bu hücrelerin kemik matriksine tutunmasını sağlar.^{54,63} Eğer organik komponent uzaklaştırılırsa orijinal şekli korumakla beraber kemik çok kolay kırılabilir bir hale gelir.⁶³

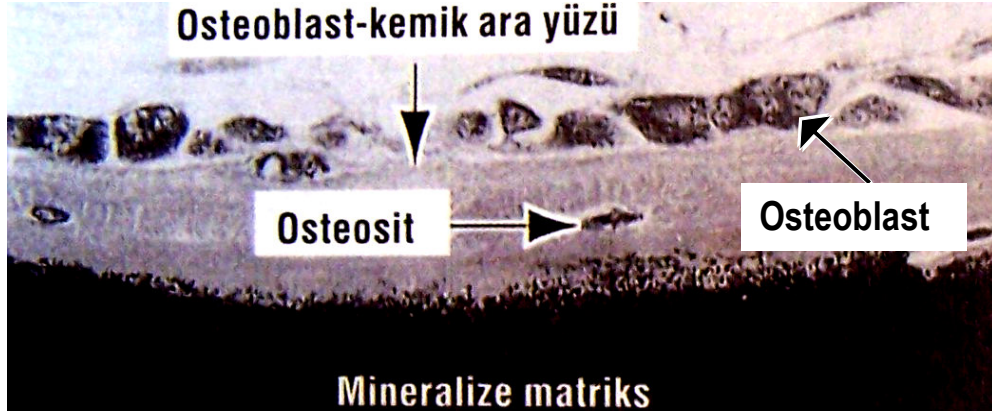
1-2. Kemik Hücreleri

Osteoprogenitör hücreler

Periosteumun iç tarafında, haversian kanallarında ve endosteumda bulunurlar. Embriyonik mezenşimden köken alan bu hücreler mitoz ile bölünebilmekte ve osteoblastlara farklılaşabilmektedirler. Düşük oksijen konsantrasyonlarında kondrojenik hücrelere dönebilmektedirler. İğsi şekilli ve soluk boyanan oval çekirdekleri vardır. Bu hücreler kemik büyümesinde aktif rol oynarlar.⁶³

Osteoblastlar

Osteoprogenitör hücrelerden köken alan bu hücreler tip I kollajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegrin gibi organik matriks komponentlerinin sentezinden sorumludurlar. Bunların yanında, kemik rejenerasyonunda önemli rol aldıkları düşünülen, kemik morfojenik protein (KMP), ‘transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), ‘insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), ‘insülin benzeri büyüme faktörü-II (IGF-II), interlökin-I, ‘trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), gibi sinyal proteinlerini salgılar. Kübik ya da alçak prizmatik yapıdaki bu hücrelerin iri çekirdekleri olup sitoplazmaları bazofiliktir (**Şekil 1**).^{56,63}



Şekil 1: 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. başlık, sayfa 120, 2006).

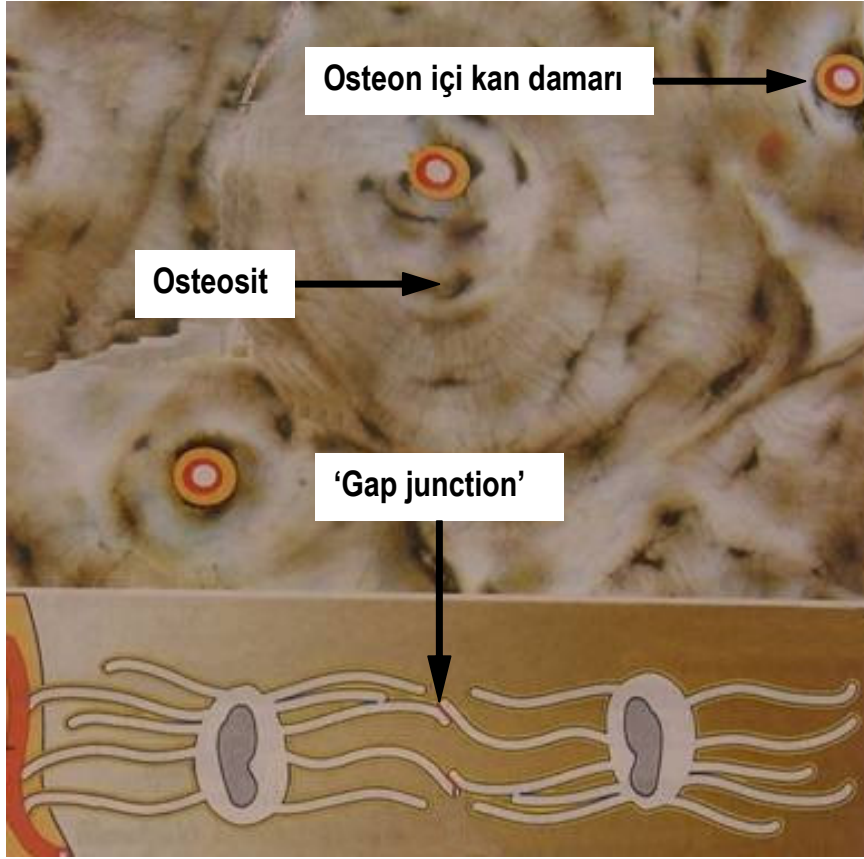
Osteoblastlar kısa uzantılarla komşu osteoblastlara, ayrıca uzun uzantıları sayesinde ise osteositlerle tutunurlar. Bu tutunmalar ‘gap junction’lar aracılığı ile olur ve osteositlerle aralarındaki ‘gap junction’ miktarı osteoblastlarla olduğundan daha fazladır.⁶ Osteoblastın etrafı, salgıladığı ekstraselüler matriks ile çevrilince ‘laküna’ adı verilen boşlukta osteosit halini alır. Ekstraselüler matriks kalsifiye olsa da laküna etrafında ‘osteoid’ adı verilen kalsifiye olmamış doku ile kalsifiye matriksten ayrılırlar. Kemik yüzeyindeki osteoblastlar osteoprogenitör hücrelere benzese de bölünme özellikleri yoktur. Osteoblastların hücre membranında integrinler ve paratiroid hormon reseptörleri vardır.⁵⁶ Paratiroid hormon bu reseptöre bağlanınca osteoprotegrin ligandı (OPGL) ve osteokalsin stimüle edici faktör salgılanır.

Böylece aktive edilen osteoklastlar kemik rezorbsiyonunu gerçekleştirir. Ayrıca osteoblastlar, osteoidi parçalayan enzimi salgılayarak osteoklastın organik matriks ile kontağını sağlarlar.

Osteositler

Kalsifiye kemik matriksi içerisindeki lakünalar içinde oturan ve osteoblastlardan farklılaşan matür kemik hücreleridir. Her mm^3 kemik parçasında 20.000-30.000 osteosit bulunur.⁶³ Lakünalardan ışınal tarzda dağılan tünel benzeri kanalikül yapıları içerisinde osteositin sitoplazmik uzantıları vardır. Bu uzantılar yardımı ile komşu osteosit hücresi ile iyon ve küçük molekül alışverişine imkan sağlayan ‘gap junction’ lar oluştururlar (**Şekil 2**).

Kanalikül içinde ayrıca osteositi besleyen ekstraselüler sıvı vardır. Çekirdekleri yassılaşmış ve az miktarda golgi cisimciği içerirler. İnaktif gibi görünseler de kemik bütünlüğünden sorumlu maddeleri salgırlar. Siklik adenzin fosfat (cAMP), osteokalsin ve insülin benzeri büyüme faktörü salgılayarak kemik tansiyonuna cevap veren kemiğin mekanik transdüksiyonundan sorumludurlar. Bu maddelerin salınması ile büyüme ve gelişme sırasında ‘pre-osteoblastların’ yeni kemik oluşumundaki yönlendirilmeleri yanında kemik kuvvetlerinin kemik şekli üzerindeki etkileri sağlanır. Bu olay sonunda erkek iskeletindeki kasların yapışan yerleri kadın iskeletine göre daha belirgindir. Osteosit periplazmalemması ile laküna duvarı arasındaki ‘periosteositik boşlukta’ ekstrasellüler sıvı bulunur. Ortalama bir insandaki periosteositik boşluktaki ekstrasellüler sıvı 1,3 litre ve yüzey alanı ise 5000 m^2 kadardır. 1,3 litredeki 20 gr’dan fazla değişebilen kalsiyum iyonu yeterli kan kalsiyum seviyesini sağlar.^{56,63}

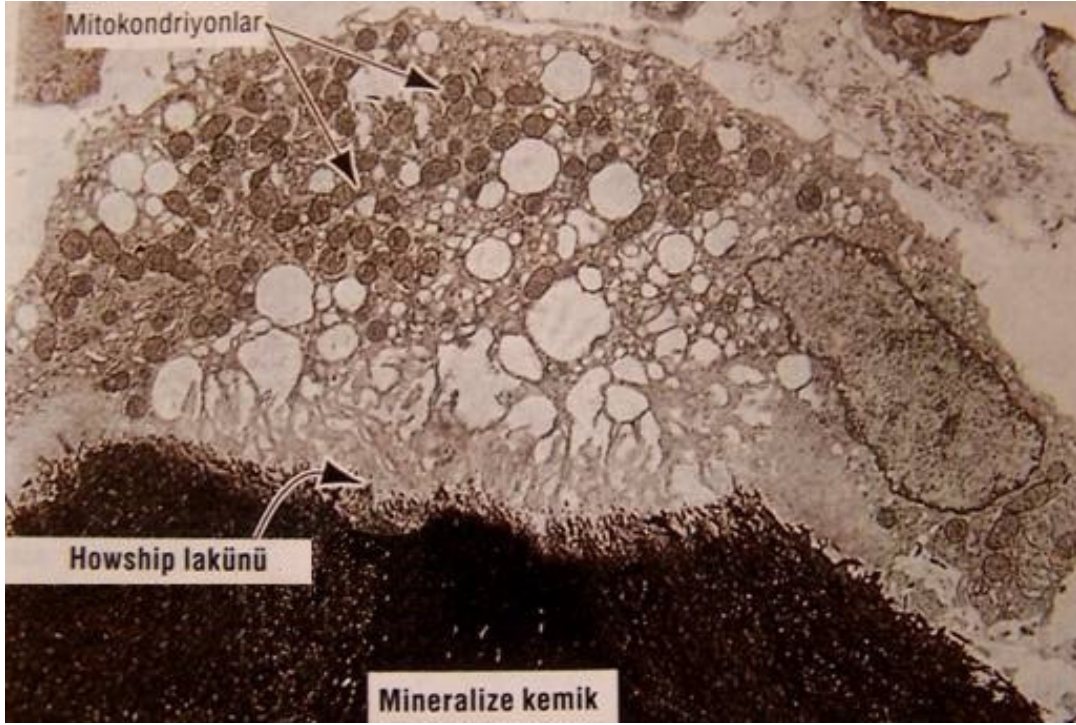


Şekil 2: Havers kanalı içindeki bir kan damarı osteositlere besin sağlar. Besinler havers kanalından kanalın uzağına yerleşen osteositlere doğru bir dizi hücre uzantısı vasıtasıyla taşınır. Osteosit uzantılarının temas ettikleri uçlarda 'gap junction'lar mevcuttur (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 120, 2006).

Osteoklastlar

Çok çekirdekli hücreler olup kemik iliği granülosit-makrofaj öncül hücrelerinden köken alan ve kemik rezorbsiyonundan sorumlu olan hücrelerdir. Osteoklast-stimüle edici faktör, koloni stimüle edici faktör-1, osteoprotegrin ve kalsitonin reseptörleri içerirler. Kemik rezorbsiyonundan sonra apoptozise uğrarlar. 150 µm çapında, 50 kadar

çekirdekli, hareketli, asidofilik sitoplazmaları vardır. Granülosit-makrofaj öncül hücreleri koloni-stimüle edici faktör yardımı ile mitoz yolu ile çoğalır. Kemik varlığında bu osteoklast öncül hücreler birleşir ve çok çekirdekli osteoklastı yaparlar. Diğer bir faktör olan osteoprotegrin bu hücrelerin osteoklastlara dönüşümünü ve osteoklastların kemik rezorbsiyonunu baskılar. Osteoklastlar 'Howship lakünası' denen sığ çukurcuklarda otururlar. Bu lakünalar kemik rezorbsiyonunun olduğu bölgelerdir (**Şekil 3**). Hücre içindeki karbonik anhidraz enzimi CO_2 ve H_2O 'dan karbonik asit (H_2CO_3) oluşturur. Karbonik asit hücre içerisinde proton (H^+) ve bikarbonat (HCO_3^-) iyonuna dönüşür. Bikarbonat iyonu Na^+ iyonu yardımı ile plazmalemmayı geçip kılcal damarlara girer. Laküna üstüne oturan girintili-çıkıntılı plazmalemmadaki proton pompası H^+ iyonunu subosteoklastik bölgeye pompalar. Bu bölgedeki ortam asit hale gelir ve çözünen mineraller osteoklast sitoplazması içerisine girerek oradan çevre kılcal damarlara geçerler. Lizozomal hidrolaz, kollajenaz ve jelatinaz gibi metalloproteinazlar osteoklastlar tarafından salgılanılarak dekalsifiye kemiğin organik kısmının rezorbsiyonundan sorumludurlar. Yıkım ürünleri osteoklastlar tarafından endositoz yolu ile alınıp aminoasit, monosakkarit ve disakkaritlere dönüştürülerek çevre kılcal damarlara verilirler. Paratiroidhormon ve kalsitonin hormonları osteoklastların kemik rezorbsiyonunu düzenlerler.^{56, 63}



Şekil 3: Osteoklastın yapısı: Osteoklastlar çok çekirdekli ve bol mitokondri içerirler. Laküne bakan kenar aktif kıvrımlı bir yapı gösterir (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 124, 2006).

1-3. Kemiğin Yapısı

Kemikler anatomik şekillerine göre 5'e ayrılırlar.

a-Uzun kemikler: İki başı arasında shaft bölümü içerirler (Örnek: tibia).

b-Kısa kemikler: Uzunluğundan kısa veya aynı genişliğe sahiptirler (Örnek: el bileği karpal kemikleri).

c-Yassı kemikler: Yassı, ince, plaka tarzı yapıları vardır (Örnek: kafatası kemikleri).

d-İrregüler kemikler: İrregüler şekilleri vardır (Örnek: sfenoid ve etmoid).

e-Sesamoid kemikler: Tendonlar içinde veya arasında oluşan kas mekanik kuvvetine yardımcı olan kemiklerdir (Örnek: patella).

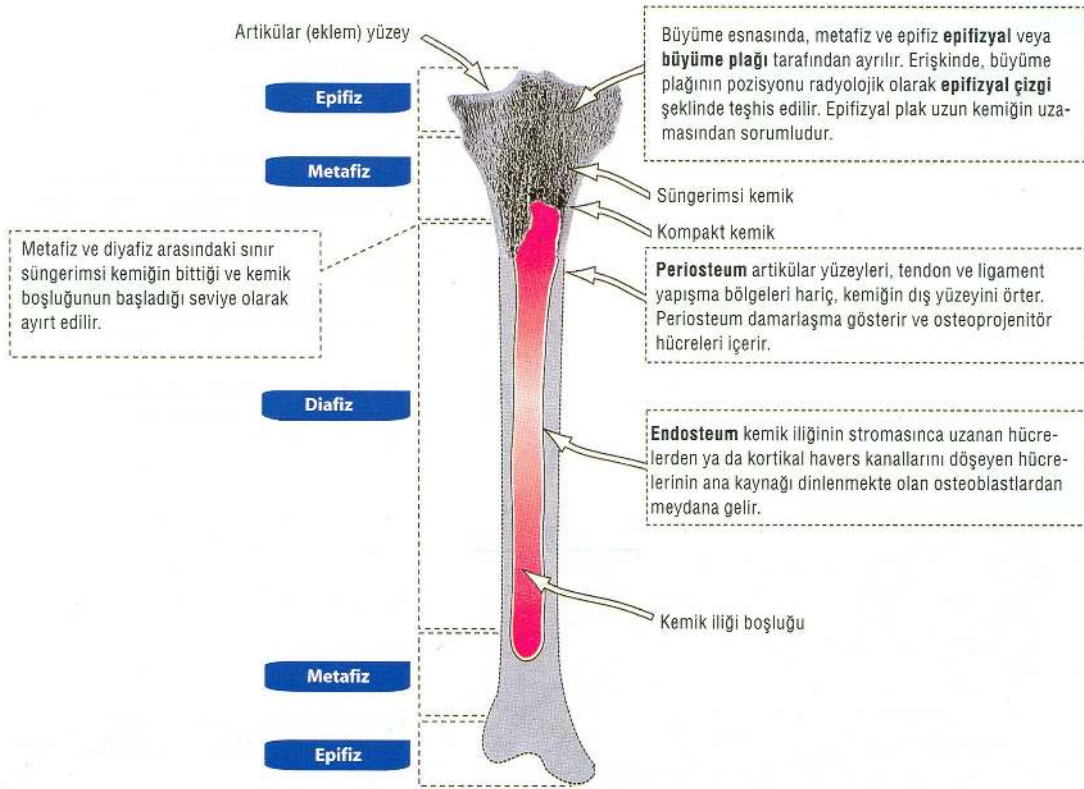
1-3a. Kemiğin Kaba Yapısı

Uzun kemiğin shaftına diyafiz denir. Eklem yüzeylerine ise epifiz denir. Büyüyen bir insanda epifiz ile diyafiz arasında kıkırdak yapıda epifizyal plak vardır. Epifizyal plak ile diyafiz arasındaki geçiş yeri metafizdir. Metafiz bölgesinde spongioz kemik kolumnaları olur ve kemik büyümesi sırasında uzamadan sorumludurlar. Diyafiz bölgesi, kasların ve tendonların yapışma bölgesi hariç periosteum ile sarılıdır (**Şekil 4**). Sesamoid kemikler ve eklem yüzlerinde de periosteum yoktur. Periosteum yoğun, kalsifiye olmayan, düzensiz bağ dokusu olup ‘Sharpey lifleri’ ile kemiğe tutunur.⁶³

Kafatası yassı kemikleri uzun kemiklerden farklı bir şekildedir. İç ve dış yüzeyler iç ve dış tabula denilen yoğun kompakt kemik ve aralarındaki ‘diploe’ denilen kanselöz kemikten oluşmuştur. Dış tabulanın üstü periosteum, iç tabulanın içi duramater ile örtülüdür.⁶³

Tibia kemiğini longitudinal olarak incelersek iki tip kemik yapısı dikkat çeker. Çok yoğun dış taraftaki ‘kompakt kemik, içerisinde ise kemik iliğini içeren ‘kanselöz veya spongiöz kemik’.

Kanselöz kemiğe yakından bakacak olursak kemik trabeküllerinden oluştuğu görülür. Haversian sistem içermezler. İçerisindeki kemik iliği ise, kan hücrelerini oluşturan kırmızı kemik iliği ve çoğunluğu yağdan oluşan sarı kemik iliği olarak ikiye ayrılır (**Şekil 5**).

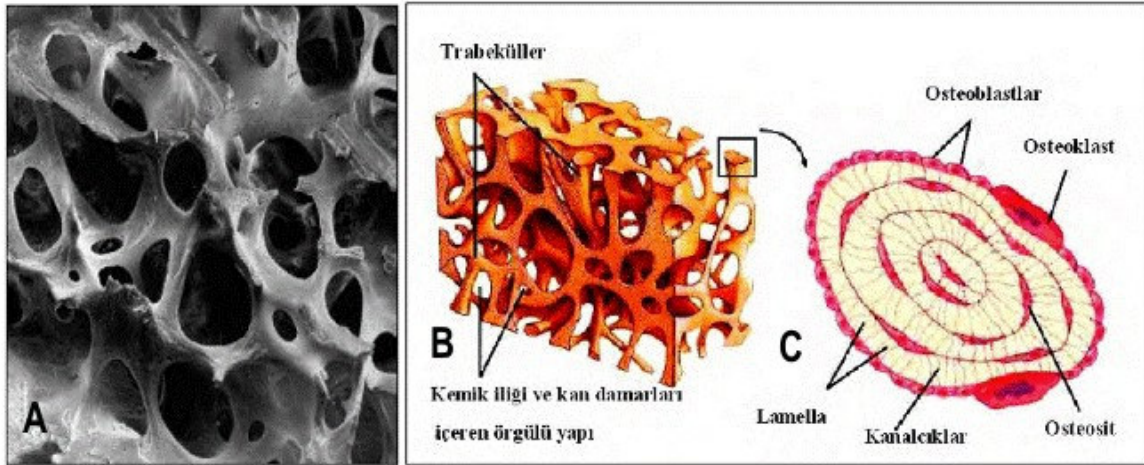


Şekil 4: Uzun kemiğin bölümlerinin tibia kemiği üzerinde şematik gösterimi (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 118, 2006).

1-3b. Kemiğin Mikroskopik Yapısı

Mikroskopik olarak kemik primer (matür, lameller) ve sekonder (immatür) olarak ikiye ayrılır. Sekonder kemik fetal gelişim sırasında ve kemik iyileşmesi sırasında oluşan kemiktir. Yeterli osteosit ve düzensiz kollajen yapıları, matür kemik oluşumu ile düzenli kollajen yapıları haline gelir. İmmatür kemiğin mineral komponenti matür kemikten daha azdır. Matür kemik 3-7 μm kalınlıktaki paralel, konsantrik lamellerden oluşur. Osteositler lameller içerisinde belirli aralıklarla yerleşmiştir. Osteositler arasındaki kanaliküller sayesinde

aralarında besin, hormon, iyon alışverişi yaparlar. Lameller kemik içindeki kollajen yapıları lameller yapıya paralel uzanır.⁶³



Şekil 5: Kancellöz kemiğin morfolojik yapısı (A) Kancellöz kemiğin gevşek trabeküler yapısının görünümü. (B) Kancellöz kemiğin trabeküler yapısının ve kemik iliği ile kan damarları içeren örgülü yapının şematik görünümü. (C) Kancellöz kemik haversian sistem içermez.

Kompakt Kemiğin Lameller Yapısı

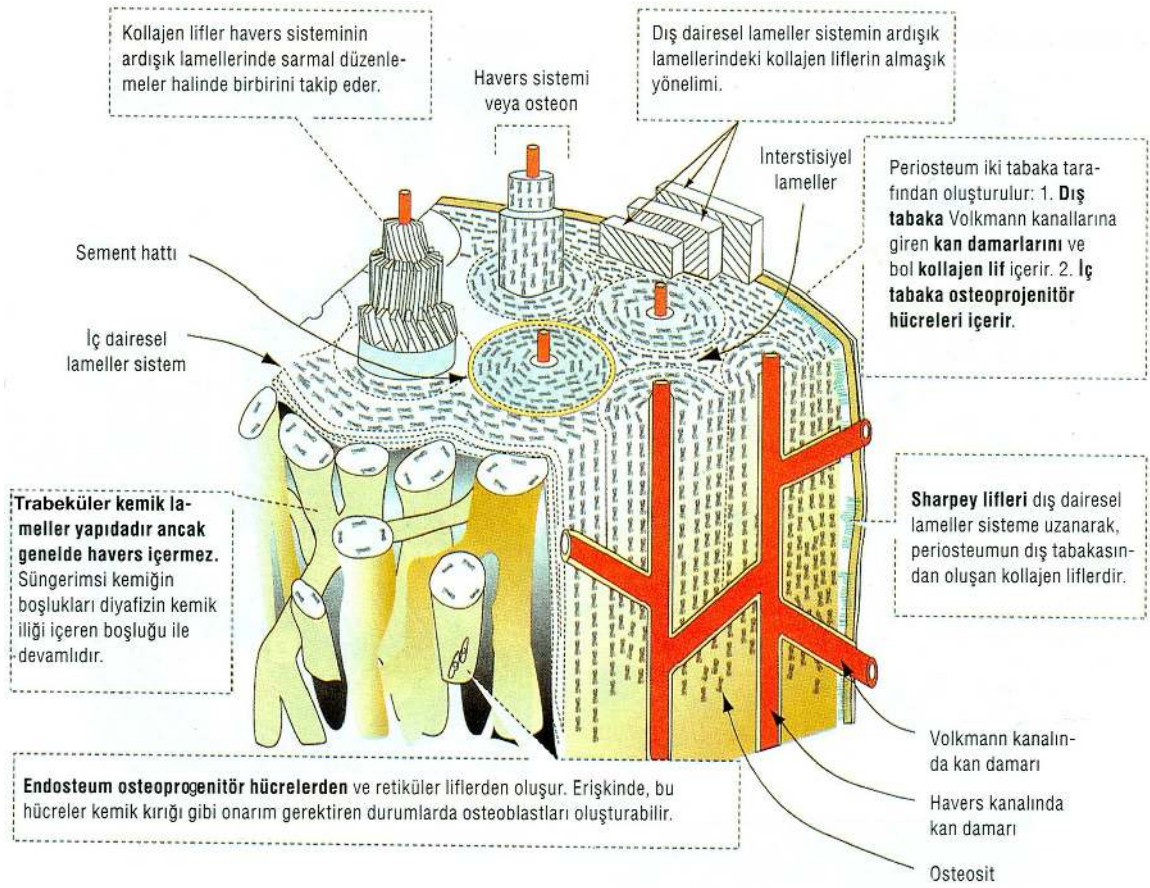
Kompakt kemik 'lamel' adı verilen ince katmanlardan oluşur. Bu lameller özellikle uzun kemiklerin diyafiz kısımlarında bulunurlar. Kendi içerisinde dış sirküferensiyel lameller, iç sirküferensiyel lameller, osteon (haversian kanal sistemi) ve intersisyal lameller diye kısımları vardır.⁶³

İç ve dış sirkumferensiyel lameller

Dış sirkumferensiyel lameller periosteum altında bulunur ve periosteumu kemiğe bağlayan Sharpey liflerini içerir. İç sirkumferensiyel lameller ise dış lameller kadar yoğun olmayan, kemik iliğini saran ve kemik iliğindeki kanselöz kemiğin trabeküllerinin tutunduğu bir yapı oluşturur.⁶³

Haversian kanal sistemi (osteon) ve interstisyel lameller

Haversian kanal sistemi, ortada vasküler bir boşluk etrafında (haversian kanal) silindirik 4-20 arasındaki lamellerden oluşan bir yapıdır. Her osteon kalsifiye kollajen yapıdan oluşan bir yapı ile sarılıdır. Haversian kanalların duvarı osteoprogenitör hücre ve osteoblastlarla çevrilidir. Osteonların haversian kanalları birbirlerine ‘Walkmann kanalları’ ile bağlıdır. Walkmann kanalları haversian kanallarına oblique veya dik yerleşimlidirler. Haversian kanallarının çapı 20-100 µm arasında değişir. Osteon etrafındaki lamel yapıları arttıkça haversian kanal çapı azalır ve osteon duvar kalınlığı artar. Kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında osteoklastlar osteonları rezorbe ederken osteoblastlar yenilerini yaparlar. Osteonların kalıntıları yeni yapılan osteonlar etrafındaki düzensiz interstisyel lameller yapıyı oluşturur (**Şekil 6**).⁶³



Şekil 6: Kortikal kemiğin morfolojik yapısı. Havers ve Volkmann kanallarının kemik yapısı içerisindeki yerleşimleri (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof Dr. Ramazan Demir ,4. başlık, sayfa119, 2006).

1-4. Kemik Oluşumu

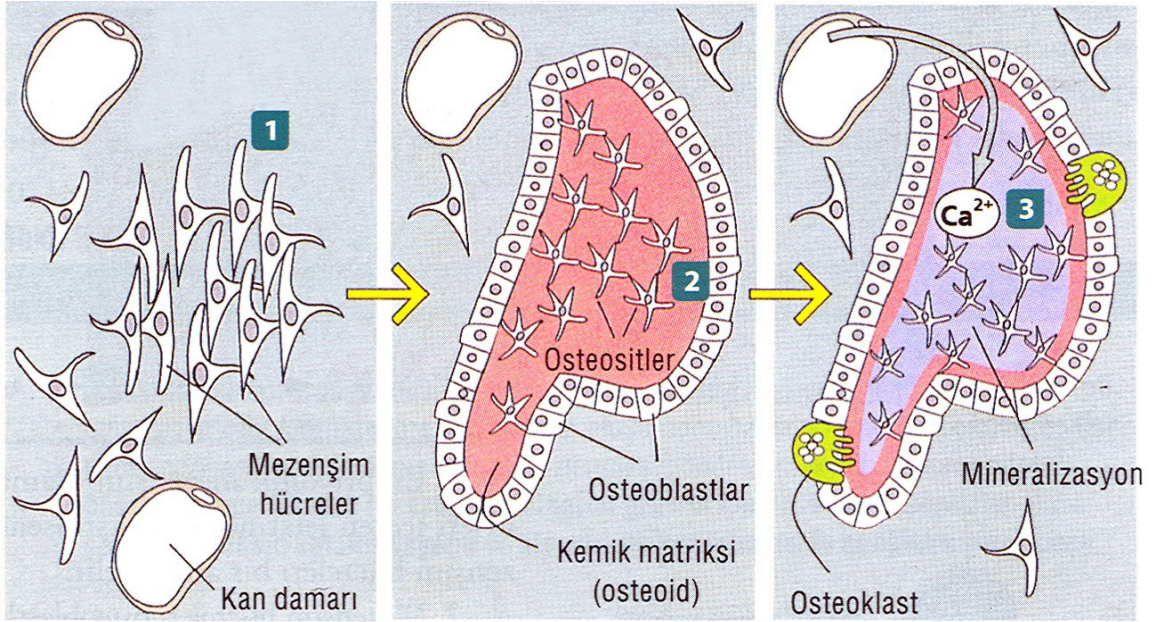
Kemikler embriyonik gelişimde iki farklı yolla oluşurlar.

-İntramembranöz kemikleşme

-Enkondral kemikleşme

I- İntramembranöz Kemik Oluşumu

Mezenkimal dokular içerisindeki kemik oluşumudur. Çoğu yassı kemik bu yolla iyileşir. Organizmada kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın ‘processus coronoideus ve simfizisi’ dışındaki bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşarak kemik matriksi oluştururlar (**Şekil 7**). Oluşturdukları trabeküler kemik yapıları primer kemikleşme merkezi olarak adlandırılır. Trabeküllerin kollajen yapıları birbirine paralel yapıda değildir. Kalsifikasyon ve osteoid oluşumunu takiben osteoblastlar osteosit haline gelir. Mezenkimal hücrelerin mitotik çoğalması ile osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlar oluşarak yeni kemik oluşumu devam eder. Kanselöz yapı içerisindeki trabeküler yapı yeterli olunca içlerindeki interstisyel vasküler bağ dokusu kemik iliği haline gelir. Oluşan bir çok kemikleşme merkezi birleşerek oksipital kemik gibi yapıları yaparlar. Fontaneller birleşmemiş kemikleşme merkezleridir. Kalsifiye olmayan mezenkimal hücreler periosteum ve endosteuma döner. Periosteumun iç tabakası ve duranın periosteal tabakası kompakt kemiğe dönerek iç ve dış tabakayı yaparlar.⁶³



Şekil 7: 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 taşınır, 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. başlık, sayfa 131, 2006).

II- Enkondral Kemik İyileşmesi

Kemik oluşumu için kıkırdak çatının varlığı gereklidir. Uzun ve kısa kemikler bu yolla kemikleşir. İki aşamada oluşur:

I- Hiyalin kıkırdak bir çatının oluşması

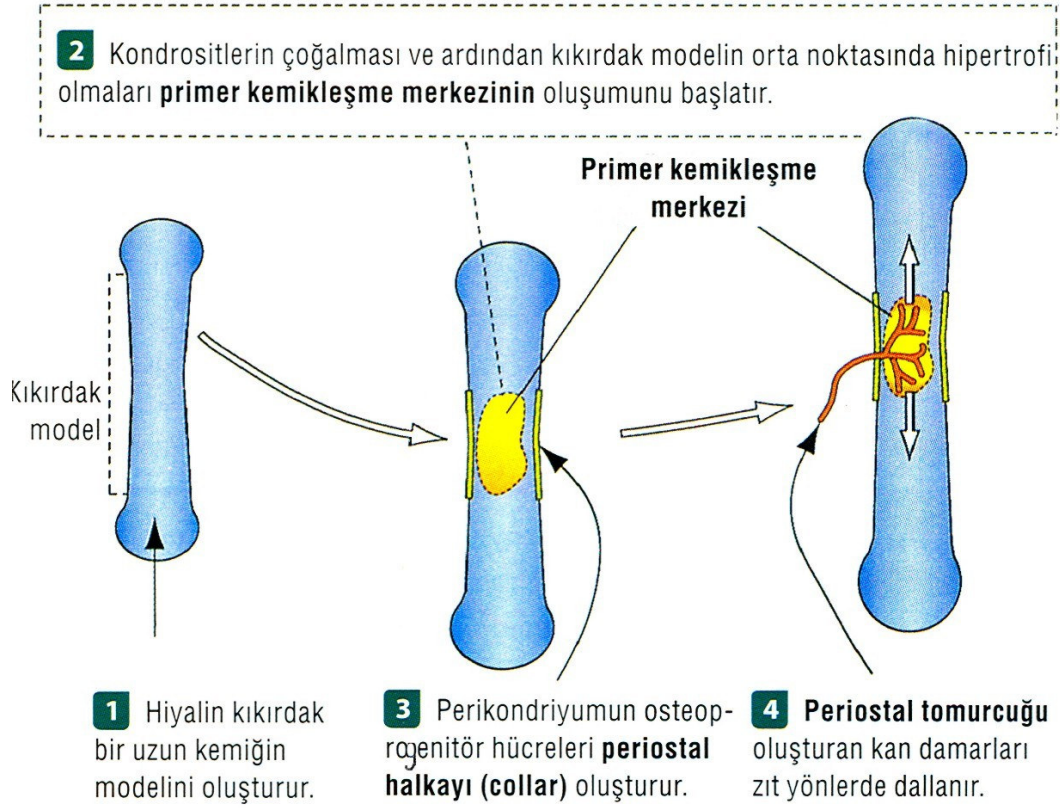
II- Kıkırdak yapının büyümesi ve kemik çatı için bir model olması, rezorbsiyonu ve yeni kemik oluşumu

Birincil kemikleşme merkezinin oluşumu

- a) Kemik oluşacak yerde hiyalin kıkırdak bir model oluşur. Kıkırdak model içindeki kondrositler hipertrofiye uğrar, sitoplazmalarında glikojen depolarlar ve vakuolize bir hale gelirler. Kondrositler hipertrofi sonucu kalsifiye hale gelirler.
- b) Diyafiz kıkırdağındaki perikondrium damarlanır. Kıkırdak hücreleri osteoprogenitör hücrelere döner, perikondrium periosta döner.
- c) Yeni osteoblastlar kemik matriksi salgırlar ve intramembranöz kemikleşme yolu ile subperiostal “kemik manşet” yapısını kıkırdak yüzey üzerinde oluştururlar. Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesine engel olur. Oluşan iskemi, kondrositlerde önce hipertrofiye, ardından diyafizin orta kısmından başlayarak tahrip olup, ölmelerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur ve ilerdeki kemik iliği kavitesi yaparlar.
- d) Kemik yapı araları osteoklastlar sayesinde periostal delikler açar ve bu delikler osteoprogenitör hücreler, hematopoetik hücreler ve kan damarları ile kıkırdak modele

gerekli besin ve oksijeni sağlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfor iyonları, alkalen fosfataz aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar (**Şekil 8**).

- e) Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşarak kalsifiye kıkırdak yüzeyinde kemik matriksi oluştururlar. Kemik matriksi kalsifiye kıkırdak/kalsifiye kemik kompleksi haline gelir.
- f) Subperiostal kemik kalınlaştıkça osteoklastlar kalsifiye kıkırdak/kalsifiye kemik kompleksini rezorbe ederler ve kemik iliği böylece genişler. Bu işlem ilerledikçe epifizyal plaklar dışındaki kıkırdaklar kemikleşmiş olur.

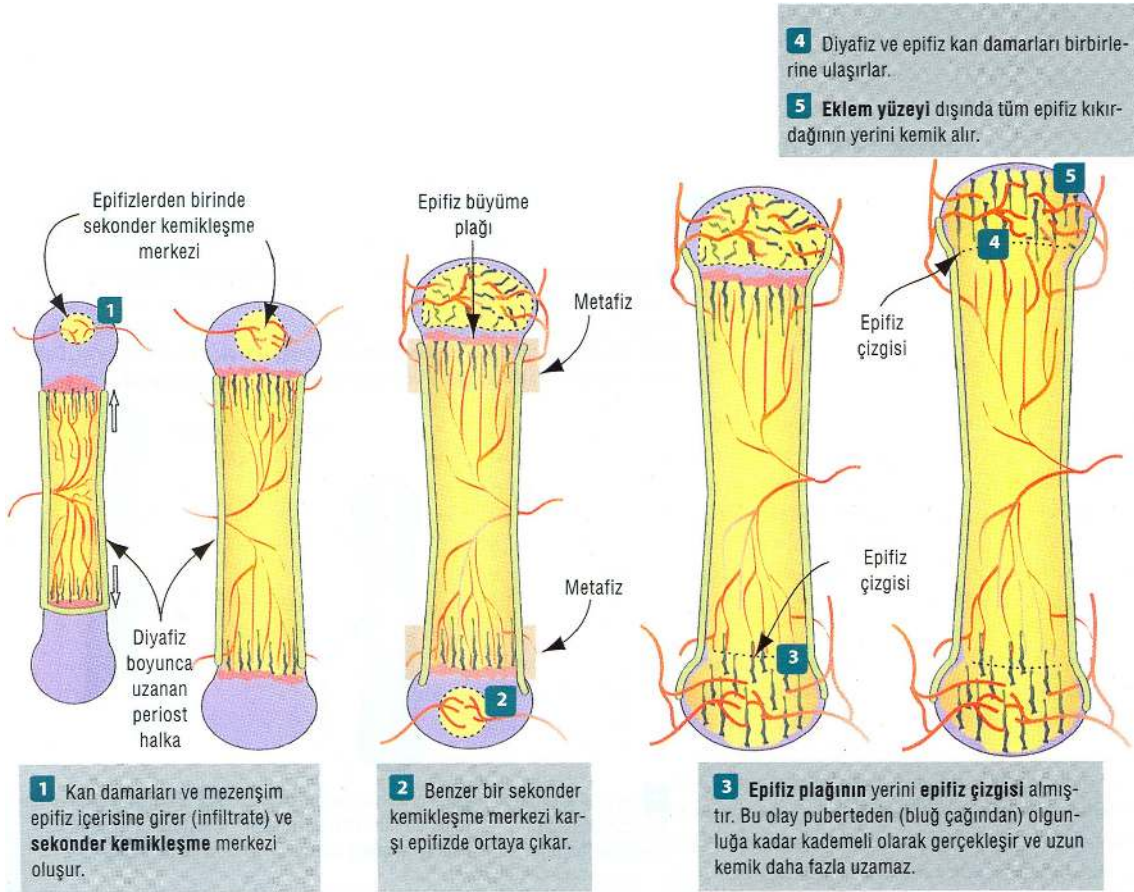


Şekil 8: Enkondral kemikleşme–birincil kemikleşme merkezinin oluşumu (1) Hiyalin kıkırdak kemik model oluşumu. (2) Primer kemikleşme merkezinin oluşumu. (3) Periosteal halkanın oluşumu (4) Periosteal tomurcuk ile kan damarlarının oluşumu (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 133, 2006).

İkincil Kemikleşme Merkezinin Oluşumu

Yeni oluşan kemiklerin epifiz kısımlarındaki kemikleşme de diyafizlerdeki kemik kabuk oluşumu dışında aynıdır (Şekil 9). Osteoprogenitör hücreler epifiz kıkırdağını yaparlar ve osteoblastlara dönüşürler ve kıkırdak yapının matriksini sentezlerler. Yeterli miktarda epifiz oluşumu sonrası eklem yüzeyi dışındaki bölgeler kemikleşir. Eklem yüzeyleri kıkırdak

özelliğini yaşam boyu korur. Epifiz plağındaki kemikleşme ise kemik uzamasından sorumludur.⁶³



Şekil 9: Enkondral kemikleşme - ikincil kemikleşme merkezinin oluşumu. (1) Kan damarları ve mezenşim epifiz içerisine girer. (2) Benzer bir kemikleşme merkezi karşı epifizde ortaya çıkar. (3) Epifiz plağının yerini epifiz çizgisi almıştır. (4) Diyafiz ve epifiz kan damarları birbirlerine ulaşırlar. (5) Eklem yüzeyi dışında tüm epifiz kırıkdağının yerini kemik alır (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa134, 2006).

1-5. Kemik Uzaması

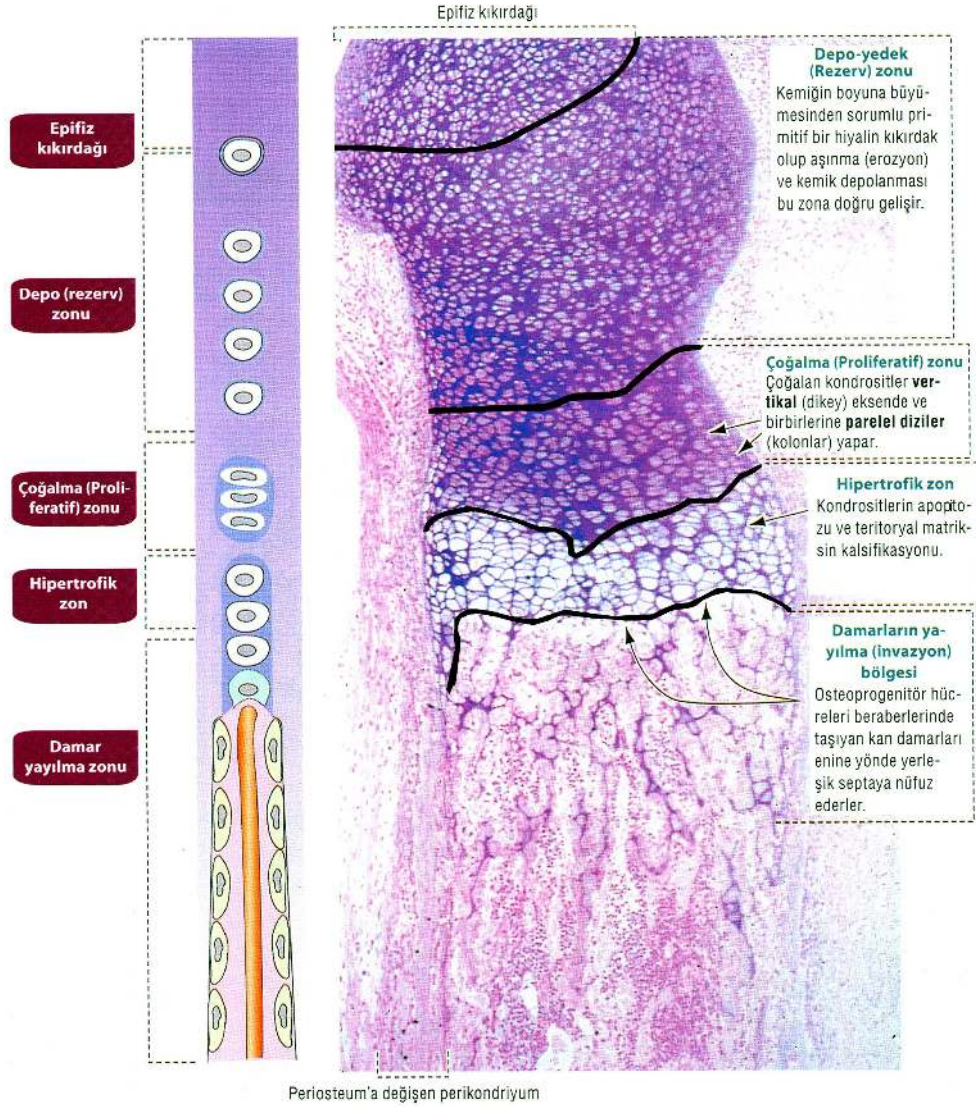
Epifiz plağındaki kondrositler çoğalıp enkondral kemikleşme yolu ile uzama sağlarlar. Çoğalma epifiz tarafında olurken, kemikleşme diyafiz tarafında gerçekleşir. Epifiz plağı epifiz tarafından aşağıya doğru beş zondan oluşur.

- a) **Kıkırdak depo tabakası:** Matriksteki kondrositler mitotik olarak aktiftir.
- b) **Çoğalma zonu:** Kemik büyüme yönüne paralel hücre kolonları oluştururlar.
- c) **Maturasyon ve hipertrofi zonu:** Kondrositler matür hale gelerek glikojen depolarlar.
- d) **Kalsifikasyon zonu:** Hipertrofiye kondrositler ölür ve kıkırdak matriks kalsifiye hale gelir
- e) **Kemikleşme zonu:** Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara dönerek kalsifiye kıkırdak matriks ile kalsifiye kıkırdak / kalsifiye kemik kompleksini yapar (**Şekil 10**).

Çoğalma zonundaki mitotik aktivite hızı kemikleşme zonundaki rezorpsiyon hızına eşit olduğu sürece kemik büyümeye devam eder. Çoğalma zonundaki mitotik aktivite azaldıkça kemik uzaması yavaşlar ve yok olunca da durur.

1-6. Kemik Genişlemesi

Kemik genişlemesi apozisyonel büyüme ile olur. Periosteumun alt tabakasındaki osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşarak subperiostal kemik yüzeyinde kemik matriksini yaparlar. Bu işlem kemik büyüme periyodu sırasında olurken aynı zamanda iç tarafta dengeli bir şekilde kemik rezorpsiyonu olmalıdır.⁶³



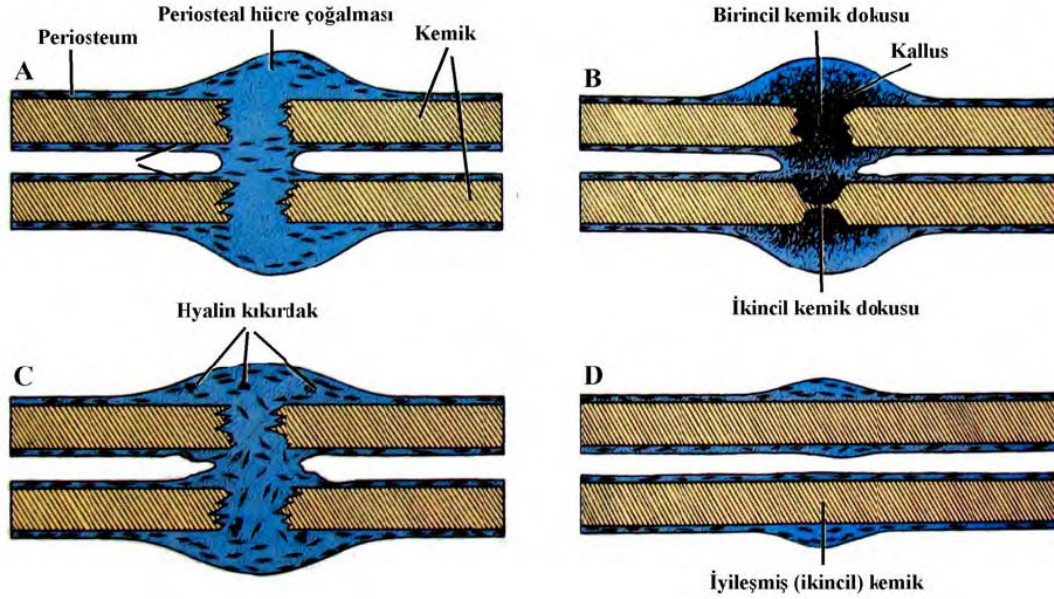
Şekil:10: Epifiz plağındaki büyüme zonu. (1) Depo zonu: Kemiğin boyuna büyümesinden sorumlu primitif bir hiyalin kıkırdak olup aşınma ve kemik depolanması bu zona doğru gelişir. (2) Çoğalma zonu: Çoğalan kondrositler vertikal ekseninde ve birbirlerine paralel diziler yaparlar. (3) Hipertrofik zon: Kondrositlerin apoptozisi ve teritoryal matriksin kalsifikasyonu. (4) Damarların yayılma bölgesi: Osteoprogenitör hücreleri beraberinde taşıyan kan damarları enine yönde yerleşik septaya nüfuz ederler (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 135, 2006).

1-7. Kemik İyileşmesi

Kemik iyileşmesi hem enkondral kemikleşme hem de intramembranöz kemikleşme yolu ile olur.^{6, 63} Kemik kırığı, kemik matriksinin harabiyetine, hücre ölümüne, periosteum ve endosteumun yırtılmasına ve kemik uçlarının yer değiştirmesine neden olur. Kırık yerindeki damarlardan sızan kan, yaralanma yerinde kan pıhtısına yol açar. Belirli bir süre sonra kan akımı durur ve hasarlı bölgeden geriye, anastamoz damarlarına doğru yeni bir kan akımı başlar. Bunun sonucu hasar her iki tarafta genişler çünkü bir çok haversian sistemine kan gitmez. Lakünalar içindeki osteositler lizise uğrar. Kırık bölgesindeki kan pıhtısı içine çevre dokudaki küçük kılcal damarlar girerek granülasyon dokusunu oluştururlar. Aynı işlem kemik iliğindeki kan pıhtısında da olurken endosteum ve kemik iliğindeki çok yöne farklılaşan hücreler osteoprogenitör hücrelere farklılaşarak 1 hafta içinde iç kallusu yaparlar. Yaralanmadan 48 saat sonra periosteum altındaki ve endosteumdaki osteoprogenitör hücrelerin mitotik aktivitesi artar. Periosteum altında çoğalan osteoprogenitör hücrelerin kemiğe en yakın kısımları osteoblastlara dönüşerek kemik manşet yapmaya başlarlar. Kılcal damarların büyümesi osteoprogenitör hücre çoğalmasından daha yavaş olduğu için ortada kalan prolifer olmuş osteoprogenitör hücreler azalmış oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücreler ve kondroblastlara dönüşerek kemik mantonun dış tabakasında kıkırdak yaparlar. Çoğalmış osteoprogenitör hücrelerin periosteuma yakın kısımlarındaki hücreler komşuluğundaki fibröz periosteumdaki kılcal damarlar sayesinde osteoprogenitör hücrelere dönüşürler. Sonuç olarak prolifer olmuş osteoprogenitör hücreler üç zona ayrılmış olur:

1. İç kemikleşmiş tabaka
2. Ara kıkırdak tabaka
3. Çoğalmış osteojenik hücre dış tabakası

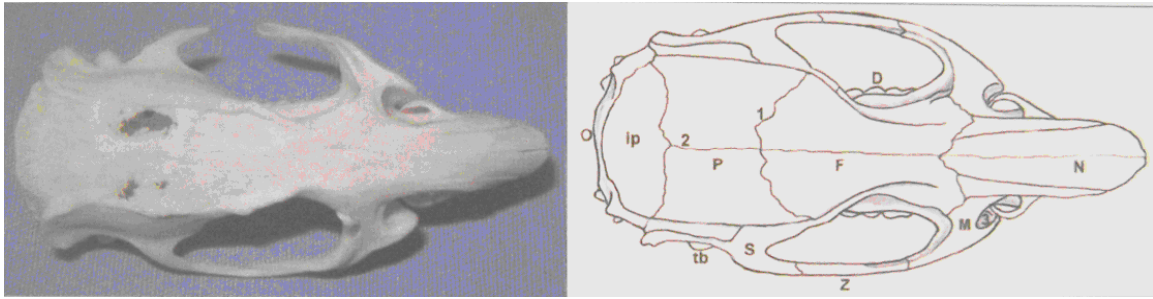
Her iki uçta oluşan bu manto tabakası her iki uçta birleşerek dış kallusu oluşturur. Ortadaki kırıkta enkondral kemikleşme yolu ile, bunun etrafındaki tabakalar ise intramembranöz kemikleşme yoluyla kemikleşerek dış kemik manto büyür. Kırık uçları kanselöz kemik ile birleştikten sonra, primer kemik yapısının sekonder kemik yapısı ile değiştirilmesiyle yeniden şekillendirilme sağlanır. Kemiğe binen stres yükü yönünde yeniden şekillenme devam eder. Aksiyal yüklenme ile güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümü gerçekleşir (**Şekil 11**). Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü negatif elektrikle yüklendiğinden, osteoklastik aktivitenin egemen olduğu konveks yüzde geri emilim, osteoblastik aktivitenin hakim olduğu konkav yüzde ise yeni kemik yapımı olmaktadır. Yani ‘kırığın konkav tarafında kemikleşme, konveks tarafında geri emilim’ olur.



Şekil 11: Kortikal kemiklerde kemik iyileşme 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 prolifer 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 değiştirilmesiyle yeniden şekillendirilme sağlanır (Junqueira L. C. ve Carneiro J. Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter eight, page: 144 , 2003).

2. SIÇAN KAFATASI ANATOMİSİ

Labaratuvar sıçanı tipik bir omurgalıdır. İskelet sistemi ‘aksiyal’ ve ‘appendiküler’ bölümlere ayrılır. Aksiyal iskelet, kafatası, omurga, sternum ve kaburgaları, appendiküler iskelet ise pektoral kavşak, üst ekstremité, pelvis ve alt ekstremitéyi 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.



Şekil 12: Sıçan kafatasının yukarıdan görünümü **D:** Molar dişler **F:** Frontal kemik **M:** Maksillanın zigomatik çıkıntısı **N:** Nazal kemik **O:** Oksipital kemik **P:** Paryetal kemik **S:** Skuamoz kemik **İP:** İnterparyetal kemik **tb:** Timanik bulla **1:** Koronal suture **2:** Sagittal suture **3:** İnfraorbital fissür (Bayramiçli Mehmet: Deneysel mikrocerrahi. 1. baskı. Argos iletişim, İstanbul 2005, S:123).

3. KRİTİK BÜYÜKLÜKTE KEMİK DEFECTİ

Schmitz and Hollinger 1986 yılında ‘kritik büyüklükteki kemik defekti’ni tanımlamışlardır.⁸⁹ 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.³⁷ Bu defektler kemik iyileşme modellerinde kullanılırlar. Sıçanlarda kabul edilen kritik

büyüklükteki kraniyal kemik defekti 8 mm çapındaki bir dairesel tam kat kemik defektidir.^{89,97} Sıçanlarda kritik büyüklükteki kraniyal kemik defektinin primer fibröz kallus dokusu ile dolduğu ancak üç aylık periyotta minimal bir kemikleşmenin olduğu tespit edilmiştir.^{33,89,97} Fakat bazı diğer çalışmalarda kritik büyüklükteki kemik defekti 6 mm olarak tanımlanmıştır.^{84,85}

4. MEZENKİMAL KÖK HÜCRELER

Kök hücre biyolojisi ve klinikte kullanılabilirlikleri üzerindeki çalışmalar hızla artmaktadır. Kök hücreler bazı özelliklerinden dolayı diğer hücrelerden farklıdır. 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 taşıırken 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.^{17, 29, 82, 106} 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.¹⁰²

Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği aspirasyonundaki çekirdekli hücre popülasyonunun % 0,0001'inden daha azını oluştururlar.¹⁹ Kemik iliği aspirasyon materyali yoğunluk farkı oluşturan ‘ficoll pague’ veya ‘percoll’ gibi ajanlarla muamele edildiğinde $1,5 \times 10^6$ 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.⁸² Orijinleri periost tabakası veya kemik iliği olabildiği gibi kas, yağ ve sinovyal dokuda da az sayıda bulunurlar.¹⁰⁸

Mezenkimal kök hücrelerin sayısı ve aktivitesi metafiz bölgeleri ve kalın vasküler periostta daha çoktur ve bu bölgelerdeki iyileşme daha iyidir.¹⁷ Kemik iliği aspirasyon materyalinin %0,01'inden daha azı oranında bulunur.²⁶ Son zamanlarda MKH'in kemik iliğinden başka eklem kıkırdakları, sinovya ve periosteum gibi iskeletsel yapılarda bulunduğu tespit edilmiştir. Bazı çalışmalarda diz eklem yağ yastıkçıkları da dahil olmak üzere yağ dokuları ve hatta arter duvarı da MKH izolasyonunda kullanılmıştır.^{1,36,106} Bu gözlemler Virchow'un 1863 yılında damar duvarlarındaki ektopik kıkırdak ve kemik oluşumunu

açıklayabilir.¹⁰¹ Ayrıca MKH göbek bağı ve fetal dolaşım gibi iskelet dışı yapılardan da daha az oranda izole edilebilmiştir.^{18, 35}

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.⁷¹ Bu hücrelerin hareketlenmesi ve farklılaşması kemotaksis ve integrin gibi transmembran proteinlerin ekstrasellüler matriks ile etkileşmesi ile gerçekleşir.⁷⁶

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.⁹⁵

Mezenkimal kök hücrelerin izolasyon teknikleri daha çok onların yapışma özelliği kullanılarak geliştirilmiştir.¹⁹ Yoğunluk farkına göre santifrjü 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.¹⁹

4-1. Mezenkimal Kök Hücrelerin İmmünofenotiplendirilmesi

Mezenkimal kök hücrelerin henüz spesifik bir immünofenotip belirteçleri yoktur. Hematopoetik öncül hücreler gibi CD31, CD34, CD45, CD117 veya CD133 hücre yüzey belirteçlerini eksprese etmezler.⁶⁷ 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.^{91,92} Bugün için en çok kabul edilen immünofenotip profili CD105 (SH2) ve CD73 (SH3 ve SH4) ekspresyonudur.⁸²

4-2. 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 İnterferon-C üretseler dahi çoğalamamaktadırlar.³⁹ Mezenkimal kök hücrelerin oluşturduğu T-hücre çoğalmasının baskılanması kalıcı olmaktadır.³²

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 triptofandan oluşumunu katalize eder. Bu madde otoantijen ve fetal allojenlerin T-hücre cevabını güçlü şekilde baskılar. T-hücre aktivasyonuna bağlı inflamatuvar sitokinlerin stimule ettiği MKH’in ‘Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)’ oluşturduğu tespit edilmiştir.⁷⁰ Mezenkimal kök hücreler immün cevapta rol oynayan B-hücreleri ve dendritik hücreleri de etkiler.^{39,51} Mezenkimal kök hücreler dentritik hücrelerin monositlerden farklılaşmasını engellemenin yanında IL-10 üreterek daha toleransı güçlü bir fenotip oluştururlar.⁵¹

Bağışıklık sistemini baskılama özelliklerinden dolayı tedavi edici olarak kullanılabilecekleri düşünülmüştür. İlk gözlemlerde MKH’lerin maymunlarda in vivo olarak ‘MHC-mismatched’ deri greftlerinin yaşayabilirliğini arttırdığı görülmüştür.⁷ Klinik olarak allojen kemik iliği transplantasyonu yapılan bir hastada gelişen ‘graft-versus-host’ hastalığı allojenik MKH infüzyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir.⁶²

4-3. 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.⁸³ 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.⁶²

Horwitz ve ark. ‘osteogenesis imperfecta’lı 3 çocuğa verilen MKH’lerin tedavi edici etkisini göstermişlerdir.⁴⁷ Ayrıca metakromatik lökodistrofi ve Hurler sendromunda da allojenik MKH’lerinin terapötik etkileri gösterilmiştir.⁵⁷

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.

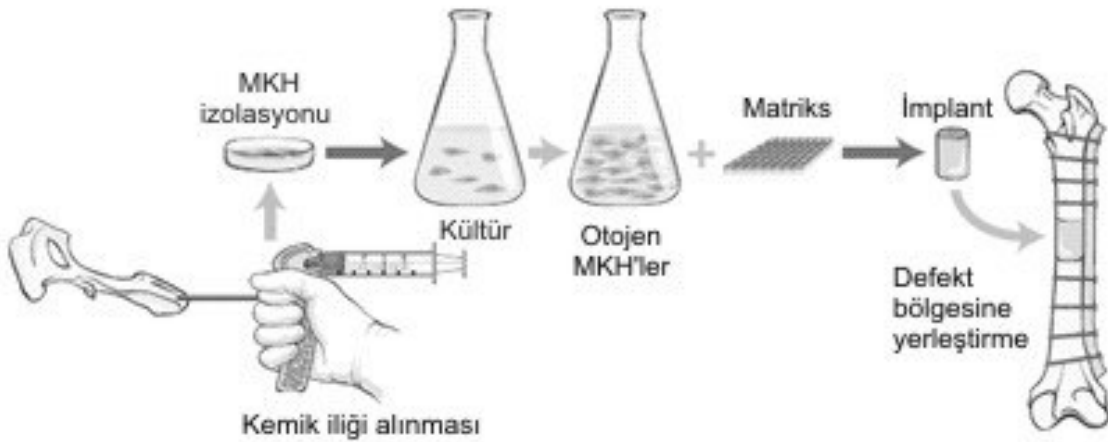
4-3.Kemik Rejenerasyonunda MKH Bazlı Stratejiler

Friedenstein, Piatetzky-Shapiro ve Petrakova’nın MKH’lerin yeni kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını belirten yayınlarından sonra,³⁸ MKH’lerin yeni kemik oluşumu ve kemik iyileşmesindeki yeri gösterilmiştir. Bir çok çalışmada MKH’lerin deneysel olarak oluşturulan büyük kemik defektlerinin onarımındaki etkinliği gösterilmiştir.⁸³ Son zamanlarda açık cerrahi gerektirmeyen, enjekte edilebilen taşıyıcılar içine konan MKH’lerin etkinliği araştırılmıştır. Goel ve arkadaşları tibia ‘non-union’ olan hastaların perkutan kemik iliği greftlemesi ile kemik iyileşmeleri sağlamıştır.⁴⁰ Tekniklerinin basit, az girişimsel ve düşük komplikasyon oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Siwach ve arkadaşları, gecikmiş, ‘non-union’ kırık veya bacak uzatma yapılan ancak ‘malunion’ olan 72 hastanın 69’unda hastaların perkutan otojen kemik iliği greftlemesi ile iyileşme göstermişlerdir.⁹³

Geniş kemik defektlerinde MKH emdirilmiş taşıyıcılar ile tedaviler araştırılmıştır. Bu teknikte geniş kemik defektlerinin iyileşmesi sağlanmakla beraber birtakım büyüme faktörleri eklenmesi ile etkinin arttığı tespit edilmiştir.^{16,60} Borden ve ark. çalışmalarında, polimerik mikrosfer matrisi ile kombine edilen kemik morfojenik protein-7’nin MKH’lerin osteojenik

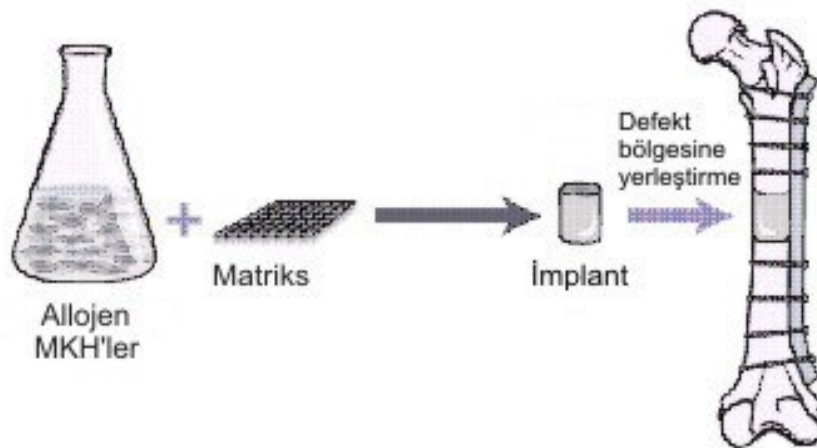
aktivitesini arttırdığını tavşanda göstermişlerdir.¹² Yoshitake ve ark. biyolojik olarak yıkılabilen ve β -trikalsiyum sitrat emdirilmiş jelatin porları içine emdirilmiş sıçan MKH'lerinin osteojenik yönde farklılaştığını göstermişlerdir.⁹⁸

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.¹⁶ Köpekte spinal füzyon modelleri, koyunda ve köpekte femur ve tibia da büyük segmental kemik defekt modelleri bu bağlamda kullanılmıştır.^{58,59,68,74} Özellikle köpekte yapılan femur defekt modelinde poröz hidroksiapatit/ β -trikalsiyum (Zimmer, Warsaw, IN), seramik silindirik taşıyıcı ile kullanılan otojen MKH'lerin iyileşmenin özellikle 12. haftasında en yüksek miktarda kemikleşmeyi sağladığı görülmüştür (Şekil 13).⁵⁸



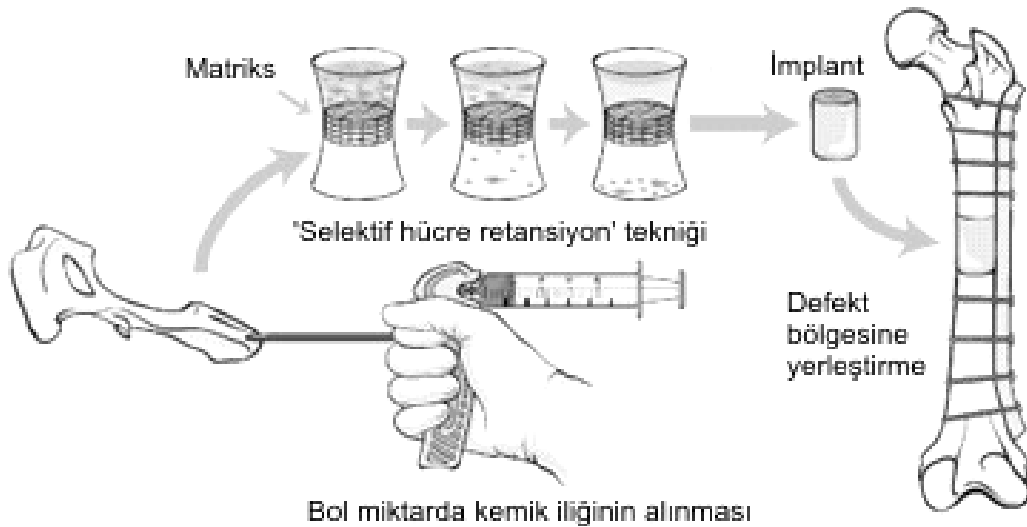
Şekil 13: Kemik iliği organizmadan alınır. Mezenkimal kök hücreler izole edilerek hücre kültüründe çoğaltılır. Osteokondüktif bir matriks ile kombine edilerek kemik defekti bölgesine yerleştirilir.

İkinci strateji olarak MKH hematopoetik hücre yüzey belirteçleri içermediğinden immün sistemi uyarmaz, bundan dolayı bunların allojen olarak çoğaltılıp kullanılabilir hücre kültürleri veya bankaları elde edilebilir.^{7,15,23,27,28,29,30,42} Mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesinde allojen olarak kullanımı köpeğin femurundaki kritik büyüklükteki kemik defektinde araştırılmıştır. Poröz hidroksiapatit/ β -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.⁵ Ayrıca yeni kemikleşmenin endokondral 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 (Şekil 14).



Şekil 14: Allojen MKH'ler uygun bir matriks yardımı ile kemik defekti bölgesine yerleştirilmektedir. İmmünolojik bir reaksiyona yol açmamaktadırlar.

Üçüncü strateji, büyük kemik iliği aspiratlarının (selektif hücre retansiyonu) konsantre edilerek hücre kültürü yapılmaksızın otolog olarak eş zamanlı intraoperatif olarak verilmesidir.¹⁴ 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 (**Şekil 15**).



Şekil 15: 'Selektif hücre retansiyonu' tekniği ile kemik greft materyali oluşturulması. Mezenkimal kök hücrelerin yapışma özellikleri kullanılarak büyük miktarda kemik iliği aspirasyonları ile elde edilen MKH'in sayısı az olsa da osteoindüktif ve osteokondüktif materyallerle birleştirilip uygun kemik greft materyalleri elde edilebilir.

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 beraber verilmesi ile kraniyal kemik iyileşmesini hızlandırdıklarını göstermişlerdir.⁴ Chang ve ark. yaptıkları çalışmada insan kemik morfojenik protein-2 genini adenovirüsler yardımı ile kültürde ekspanse ettikleri domuz MKH'lere transfer etmişlerdir. Daha sonra bu MKH'leri tip I kollajen polimer taşıyıcı ile, domuzların kritik kraniyal kemik defeklerindeki iyileşme üzerine etkilerine baktıklarında, iyileşmeyi istatistiksel olarak anlamlı şekilde olumlu etkilediğini göstermişlerdir.²⁰

Kemik rejenerasyonunda MKH bazlı deneysel ve klinik çalışmalar **Tablo I**'de özetlenmiştir.

Tablo I: Mezenkimal kök hücrelerin terapötik kullanımı destekleyen deneysel ve klinik yayınlar

Defekt tipi	MKH kaynağı	Model	Sonuç	Referans No
Tibial nonunion	Kemik iliği	İnsan	Perkütan kemik iliği greftlemesinde çoğu hastada iyileşme	40
Nonunion, gecikmiş iyileşme	Kemik iliği	İnsan	Perkütan kemik iliği greftlemesinde 72 hastanın 68'inde iyileşme	93
Nonunion	Kemik iliği	İnsan	Perkütan kemik iliği greftlemesinde 60 hastanın 53'ünde iyileşme	43
Femoral defekt	İnsan yağ dokusu	Rat	8 haftada iyileşme	81
Kraniyal kemik defekti	İnsan kemik iliği	Rat	İyileşmede hızlanma	4
Segmental kemik defekti	Kemik iliği	Tavşan	KMP-7* ve kemik iliği yüklü poröz matrikste en iyi sonuç	12
Segmental kemik defekti	Kemik iliği	İnsan	6 ayda iyileşme	86
Kemik defekti	Kemik iliği	Tavşan	Artmış osteogenezis	64
Osteokondral defekt	Kemik iliği	Rat	Hiyalin kırık ve subkondral kemik oluşumu	75
Eklem kırık ve defekti	Otolog kondrositler	Domuz	Hiyalin kırık ve oluşumu	22
Tam kat osteokondral defekt	Kemik iliği	Tavşan	Tam iyileşme	49
Epifiz defekti	Kemik iliği	Tavşan	Epifiz defektinde iyileşme	3
Tam kat kırık ve defekti	Kemik iliği	Tavşan	Kollajen jel ve MKH onarımı artırır	107
Osteoartrit ve menisküs yaralanması	Kemik iliği	Keçi	Eklem harabiyetinde durma ve menisküs dokusunun rejenerasyonu	72
Spinal füzyon	Kemik iliği	Köpek	Greft yaşayabilirliğinde artma	73
Spinal füzyon	Kemik iliği	Tavşan	MKH yüklü poröz MKH'lerle daha iyi sonuç	24

*Kemik morfojenik protein-7

5. DEMİNERALİZE KEMİK MATRİKSİ (DKM) [DEMINERALIZED BONE MATRIX (DBM)]

İnsan kuru kortikal kemik ağırlığının %25'i kalsiyumdan oluşur. Kemik 0.5 veya 0.6 NHCl solusyonu ile demineralize edilerek organik matriks elde edilebilir.⁴⁵ Bu yapının büyük çoğunluğunu tip I kollajen yapar. Bunun yanında kollajen olmayan proteinler de içerir. Demineralize kemik matriksinin %93'ünü kollajen oluşturur. Diğer proteinler kemik morfojenik proteinler, insülin-benzeri büyüme faktörü, platelet kaynaklı büyüme faktörü, fibroblast büyüme faktörü ve benzerleri olup DKM'nin yalnızca %5'ini oluştururlar. Kalan %2'lik kısım ise rezüdüel mineralize matrikstir. Amerikan Doku Bankası kuruluşu demineralize kemiği %8'den az rezidüel kalsiyum içeren yapı olarak tanımlamıştır.⁴⁶ Demineralize kemik matriksi osteoindüktif olmasının yanında yapısındaki kollajen sayesinde osteokondüktif bir özelliği de vardır.³¹ Asit demineralizasyon kemiğin demineralize edilmesinin yanında viral inaktivasyona da yol açıp demineralize edilmemiş kemiğe göre daha az hastalık transferine yol açar.⁹⁶ Demineralizasyon işlemi kan elemanlarını da etkin bir şekilde ortamdan uzaklaştırdığından demineralize edilmemiş kemiğe göre daha az immünojeniktir.^{31,94}

Demineralize kemik matriksinin osteoindüktif özelliği ilk defa Urist tarafından bildirilmiştir.¹⁰⁰ Demineralize kemik matriksinin de novo kemik yapıcı özelliğinden 'kemik morfojenik proteinler (KMP)' sorumludur.^{21,65} Kemik morfojenik proteinler küçük, hidrofobik, ısı-dayanımlı küçük molekül ağırlıklı glikoproteinler olup 'transforming growth factor-beta (TGF- β)' ailesinin alt gruplarıdır. Demineralize kemik matriksi içerisinde 2'den 16'ya kadar olan KMP'ler bulunur.^{50,88,104} Kemik morfojenik protein-1, prokollajen c-proteinaz isimli bir enzimdir ve olgun kollajenin proteolizinden sorumlu olup osteindüktif bir özelliği yoktur.²¹

Kemik morfojenik proteinler kemiğin organik matriksinde çok küçük miktarlarda bulunurlar (kemik organik matriksinin yaklaşık %0,1 ağırlığını oluştururlar).^{55,65}

Kemik morfojenik proteinler, mezenkimal kök hücrelerin ortama kemoatraksiyonunu arttırarak kemik yapıcı hücreler yönünde farklılaşmalarını sağlarlar. Mezenkimal kök hücreler kondrositlere farklılaşarak kıkırdak bir iskelet sağlayıp enkondral kemikleşme yolu ile iyileşme sağlarlar.^{65,87,88} Kemik morfojenik protein 2, 4 ve 7'nin kemik oluşumundaki etkisi bilinmekle beraber özellikle MKH'lerin terminal osteoblastik ön hücrelere dönüşümünde KMP 2, 6 ve 9 rol oynamaktadırlar.^{9,21}

'Lipofiy'e DKM uzun süredir doku bankalarında bulunmasına rağmen ameliyat sırasında kullanılmadan önce su, SF ve kan gibi maddelerle rekonstrüksiyonu gerekmektedir. 1990'lardan sonra DKM'nin gliserin, kollajen, hiyalüronik asit ve diğer taşıyıcılar (gliserol, poloksamer, jelatin, kalsiyum sülfat, lesitin) ile kullanılması bazı uygulamalarda kullanımını kolaylaştırmıştır.^{61,69} Taşıyıcı sıvağ biyouyumlu olup, toksik olmamalıdır. Aynı zamanda kemikleşme sürecini de etkilememelidir. Hiçbir sıvağ bu özellikleri taşımamakla beraber; geniş deneysel ve klinik uygulamalar da; DKM'nin 'lipofiy'e' pudra, puti, blok ve diğer formlarının kabul edilebilir bir riskle osteoindüktif olarak kullanılabileceği gösterilmiştir.^{61,66,69} Grafton® (Osteotech)'un içindeki sıvağ gliseroldür. Suda çözünürlüğü yüksek olmasına rağmen yüksek dozlarda sıçanlarda kullanıldığında toksik etki göstermektedir.¹⁰³ Dynagraft/Orthoblast® (Iso Tis)'ın taşıyıcısı poloksamer olup su taşıyan polimer jeldir ve ısı ile beraber daha katı hale gelir. Jelatin ise denatüre edilmiş parçalanmış kollajen olup suyla birleşince jel haline gelir.⁹⁴ Osteofil® (RTI) taşıyıcısı domuz kaynaklı jelatin olup dondurularak saklanır ve kullanılmadan önce ısıtılması veya hidrate edilmesi gerekir. Accell® (Iso Tis Orthobiologics) taşıyıcısı jelatin olup oda ısısında saklanır. Bugün sekiz farklı

firmanın altı farklı taşıyıcı ile kullanıma sunduğu yirmibeşe yakın ticari ürünü toz, çip, granül, puti veya jel formlarında bulmak mümkündür

Demineralize kemik matriksinin osteoindüktif potansiyeli in vivo veya in vitro olarak ölçülebilir. İn vivo hayvan modelinde kullanılarak yeni kemik oluşumu bakılabilir. İnsan kaynaklı DKM immünolojik reaksiyonlar göz önünde bulundurularak immün yetmezlikli hayvanlarda test edilmelidir. Bununla beraber bazı deneysel çalışmalarda insan kaynaklı DKM immün yetmezlikli olmayan hayvanlarda kullanılmış ve etkinliği araştırılmıştır.⁷⁹ Genel kabul görmüş modeller atimik fare veya sıçandır.^{34,109} Osteokondüktif etkisini ortadan kaldırmak amacı ile DKM derialtı veya kas içi yerleştirilmiş ve intramüsküler yerleştirmede daha çok kemikleşme görülmüştür.¹⁰⁹ İn vivo osteoindüktif testlerin avantajı klinik durumu en iyi taklit etmesi, dezavantajı ise zaman problemi ve pahalı olmasıdır. İn vitro testlerde belirli hücre grupları DKM ile muamele edilerek mitojenik ve morfolojik biyoaktivite çalışmaları ile etki araştırılabilir. Buna bir örnek ‘Saos insan osteosarkom hücrelerindeki’ mitojenik aktivitenin araştırılmasıdır.² Diğer tip in-vitro çalışmalarda belirli hücre grupları DKM ile muamele edilerek belirli bir morfolojik cevap bakılabilir. C2C12 fare miyoblastı veya sıçan çizgili kas miyoblastı DKM ile muamele edilerek kemik yapı için spesifik olan alkalen fosfataz ve osteokalsin ekspresyonu incelenmiştir.^{53,105} İn vitro metotlar nispeten hızlı ve ucuzdur ancak direkt kemikleşmeyi gösterememeleri dezavantajlarıdır.

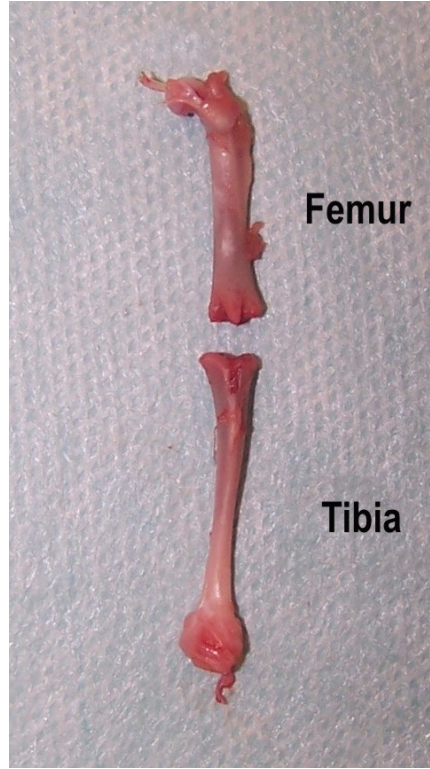
GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın 12.06.2006 tarih ve B.30.2.GÜN.0.EU.00.00/62-8316 sayılı izni ile, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 200-350 gram arasında değişen, 50 adet Wistar tipi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar tek olarak uygun kafeslerde, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

Araştırma iki aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada mezenkimal kök hücreler allojenik olarak elde edildi; ikinci aşamada elde edilen kök hücreler sıçan kraniyum kemik defektlerinde kullanıldı.

1. SIÇAN MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİN (sMKH) ELDE EDİLMESİ

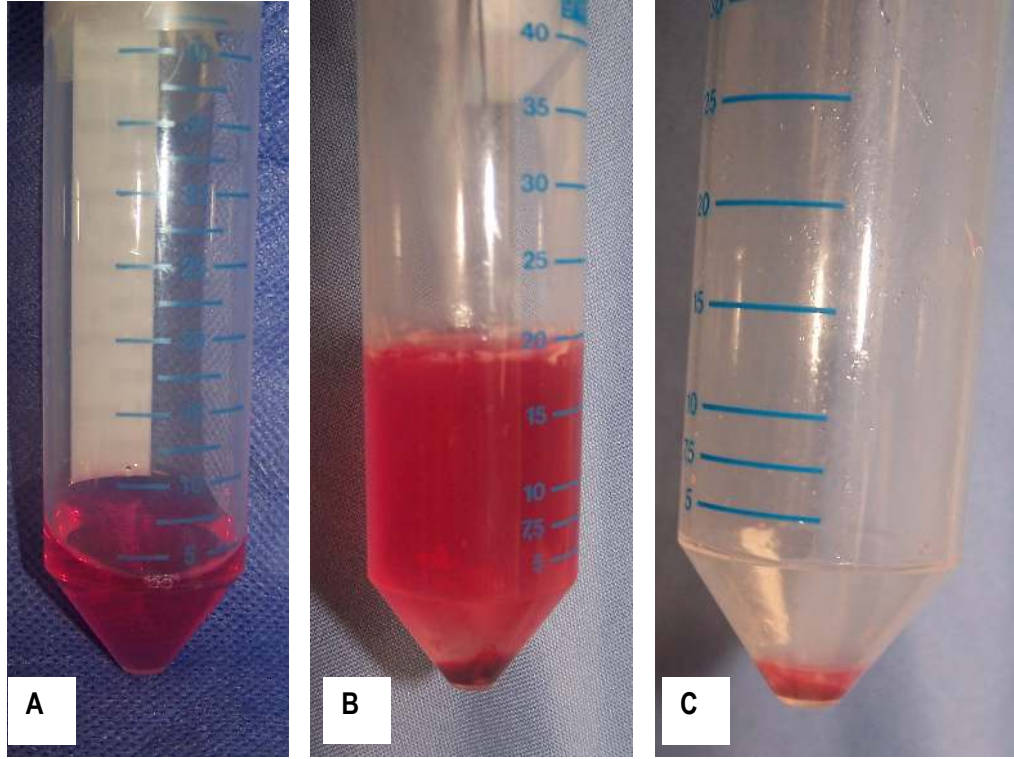
Çalışmanın ilk basamağında ağırlıkları 200-250 gr arasında değişen 10 adet, 5 haftalık erkek wistar türü sıçan, mezenkimal kök hücre (sMKH) elde etmek için kullanıldı. Denekler Ketamin-HCl (Alfamine[®]) (50 mg/kg i.m) + Xylazine (Rompun[®]) (5 mg/kg i.m) anestezisi ile uyutuldu. Deneklerin femur ve tibia bölgeleri tıraş edilerek %10'luk 'povidon iodine' solusyonu ile antisepsi sağlandı. Uyluk ve bacak ön yüzünde longitudinal bir deri-kas insizyonu yapılarak femur ve tibia kemikleri ortaya çıkartılıp etrafındaki dokular eksize edildi (**Şekil 16**). İşlem sonunda deneklere 2 cc intrakardiyak Lidokain HCL (Jetokain simplex[®]) enjeksiyonu yapılarak ötenazi sağlandı.



Şekil 16: Sıçanlardan elde edilen femur ve tibia kemikleri.

Kemik İliği Mononükleer Hücrelerinin İzolasyonu

1. Kemiklerin metafiz kısımlarından osteotomi yapılarak kemik iliği parçaları 'Dulbeccos-minimum essential medium' (DMEM) solusyonu (**Şekil 17-A**) ile flaşlanarak 50 ml'lik konik tüpler içindeki içine kondu.
2. Kemik iliğini içeren DMEM, volümünün 1:3'ü kadar 'Ficoll pague' içeren 50 ml'lik konik tüpler içerisine steril pipetle açılı ve nazik bir şekilde ilave edildi.
3. Ficoll ve kemik iliği aspiratı arasındaki sınırın karışmamış-pürüzsüz olduğu görüldü.
4. Ficoll ve kemik iliğini içeren tüpler oda ısısında 400G'de 30 dakika süreyle santifrüj edildi.
5. Santifrüj sonrası en üstte plazma, ortada mononükleer hücreler, altta ficoll ve en altta eritrosit ve granülösitler kümeleşti (**Şekil 17-B**).



Şekil 17: (A) ‘Dulbeccos-minimum essential medium’ (DMEM). (B) Santifrütü sonrası en üstte plazma, ortada mononükleer hücreler, altta ‘ficoll pague’ ve en altta eritrosit ve granülösitlerin kümeleşmesi. (C) Ficoll’un uzaklaştırılmasından sonra elde edilen hücre peleti.

6. Steril pipet ile mononükleer hücreler toplandı.

7. ‘Ficoll pague’ kültüre edilen hücreler için toksik olabileceğinden toplanan hücreler 5 katı volümde serum eklenmemiş DMEM ile iki kez yıkanarak ‘ficoll pague’ nin uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlemten sonra elde edilen hücre peleti mezenkimal kök hücre elde etmek amacı ile kullanıldı (**Şekil 17-C**).

Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

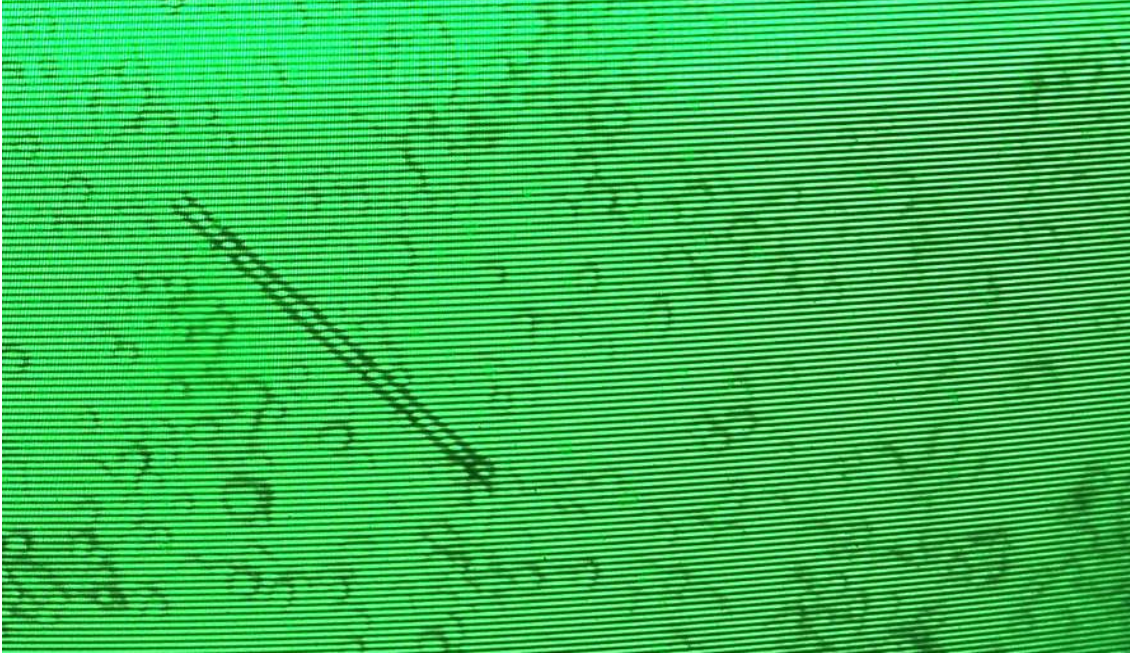
8. Çeker ocak içinde bu hücre peleti üzerine 10 ml 'komplet medium' (%30 'fetal bovine serum'(FBS) ve %1 antibiyotik içeren DMEM) eklenerek 25 ml'lik flask içinde (**Şekil 18**) %5 CO₂ içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona alındı.



Şekil 18: 10 ml 'komplet medium' (%30 'fetal bovine serum'(FBS) ve %1 antibiyotik içeren DMEM) içeren 25 ml'lik flask

9. İnkübasyonun 48. saatinde tüm 'komplet medium' aspire edilerek yapışmayan hücreler ortamdan uzaklaştırıldı ve taze 10 ml 'komplet medium' eklendi.
10. İlk 48 saatten sonraki her üç günde bir flask içindeki içerik tamamen dışarı atılarak yeni 10 ml 'komplet medium' eklendi.
11. İnkübasyonun 7. günü flask inverted mikroskopta incelemeye alınarak fibroblast karakterli kolonilerin var olup olmadığı kontrol edildi.

12. 14. gün ‘inverted’ mikroskopta incelenen hücrelerin hemen tüm flaskın zeminin kaplayarak flaskın zemin görüntüsünü konfluent hale getirdiği saptandı (**Şekil 19**) ve flaskın tüm medium içeriği ortamdaki uzaklaştırıldı.



Şekil 19: Flaska yapışan mezenkimal kök hücrelerin ‘inverted’ mikroskopta görünümü

13. Flasktaki yapışan hücrelerin ayrılmasını sağlamak için tripsinizasyon işlemine geçildi.

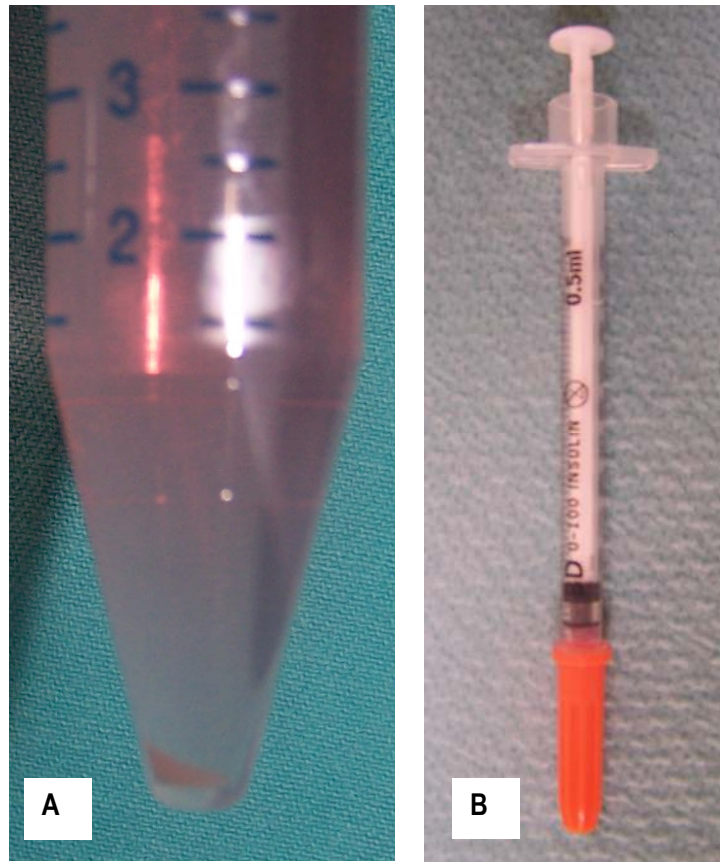
Tripsinizasyon

14. Flasklardaki yapışan hücre tabakası ‘phosphate-buffer-saline’(PBS) ile iki kez yıkandı.

15. %0,25’lik tripsin 5 ml ilave edildi. 37°C’de 10 dakika süreyle inkübe edildi.

16. Bu aşamada yapışan hücreler ayrıldı ancak hala kalabilecek hücre kümeleri olasılığı nedeniyle pipetle karıştırılarak kalan hücre kümelerinin de kolaylıkla ayrılması sağlandı.

17. Hücrelerin tam olarak ayrıldığından emin olmak için flask 'inverted' mikroskopta kontrol edildi.
18. Daha sonra tripsini inaktive etmek için 'FBS' ilave edildi.
19. Elde edilen hücre süspansiyonu 800G'de 10 dakika süreyle santifrütü edildi (**Şekil 20-A**) ve 'komplet medium' ile iki kez yıkandı.

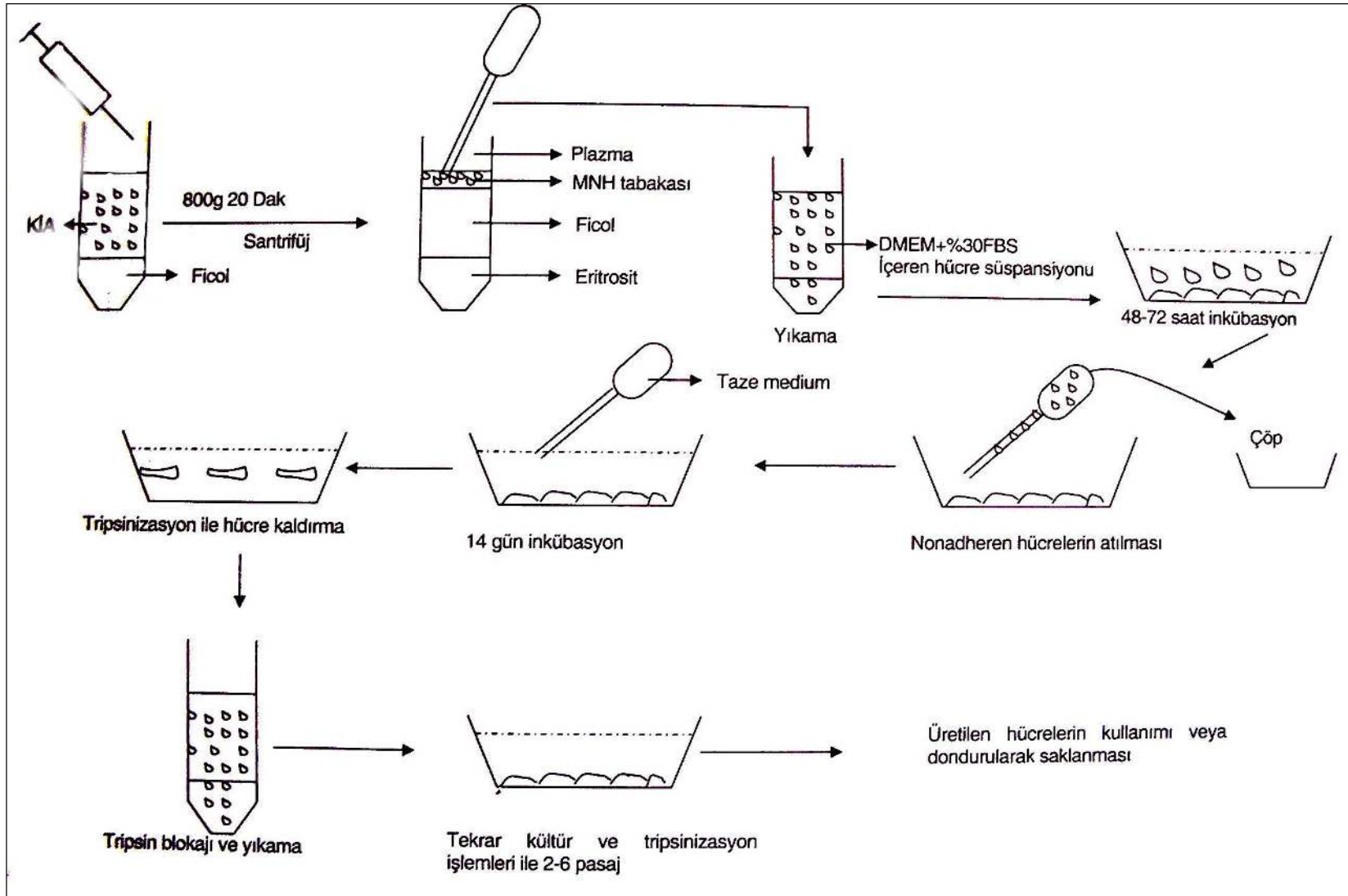


Şekil 20: (A) Hücre süspansiyonunun 800G'de 10 dakika süreyle santifrütü sonrası görünümü
(B) Mezenkimal kök hücreler 10 μ l DMEM içinde $0,5 \times 10^6/\mu$ l konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 ml'lik insülin iğnelerine konulup kullanıma hazır hale getirildi.

Mezenkimal Kök Hücrelerin Pasajı

20. Daha sonra elde edilen hücre peleti 25 ml'lik flasklarda 10 ml 'komplet medium' içinde tekrar kültüre edildi (1.pasaj).
21. Birinci pasajdan sonra her dört günde bir, madde 14,15,16,17,18,19,20'de tanımlanan şekilde pasaj işlemleri 2 kez daha tekrarlandı.
22. Üçüncü pasajın dördüncü günü tripsinizasyon işleminde tanımlandığı gibi hücreler tripsinizasyon ile flasktan alınıp yıkandıktan sonra 10µl DMEM içinde $0,5 \times 10^6$ /µl konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 ml'lik insülin iğnelerine konularak kullanıma hazır hale getirildi (**Şekil 20-B**).

Şekil 21'de MKH'lerin elde edilmesi şematik olarak özetlenmiştir. Elde edilen bu sMKH'ler çalışmanın ikinci aşamasında kullanıldı.



Şekil 21: Mezenkimal kök hücrelerin elde edilmesi

2. CERRAHİ TEKNİK

Çalışmanın ikinci aşamasında 40 adet wistar tipi erkek sıçan kullanıldı. Denekler Ketamin-HCl (Alfamine®) (50 mg/kg i.m) + Xylazine (Rompun®) (5 mg/kg i.m) anestezisi ile uyutuldu. Deneklerde kafa derisi enseden alına kadar tıraş edilerek %10'luk 'povidon iodine' solusyonu ile antisepsi sonrası orta hat longitudinal bir deri insizyonu (**Şekil 22-A**) yapılarak frontal kemik ortaya çıkartıldı. İnce periost elevatörü ile periost flepleri kaldırılarak (**Şekil 22-B**) özel olarak tasarlanmış 'trephan tur ucu' (**Şekil 23-A**) ile orta hatta 0,7 cm çapında dairesel tam kat kemik defekti oluşturuldu. İşlem sırasında dura korundu (**Şekil 23-B**). İşlem sonunda periost oluşturulan defekt üzerine tekrar örtülerek 6/0 Vicryl® ile dikildi(**Şekil 24-A**).

Denekler 4 gruba ayrıldı:

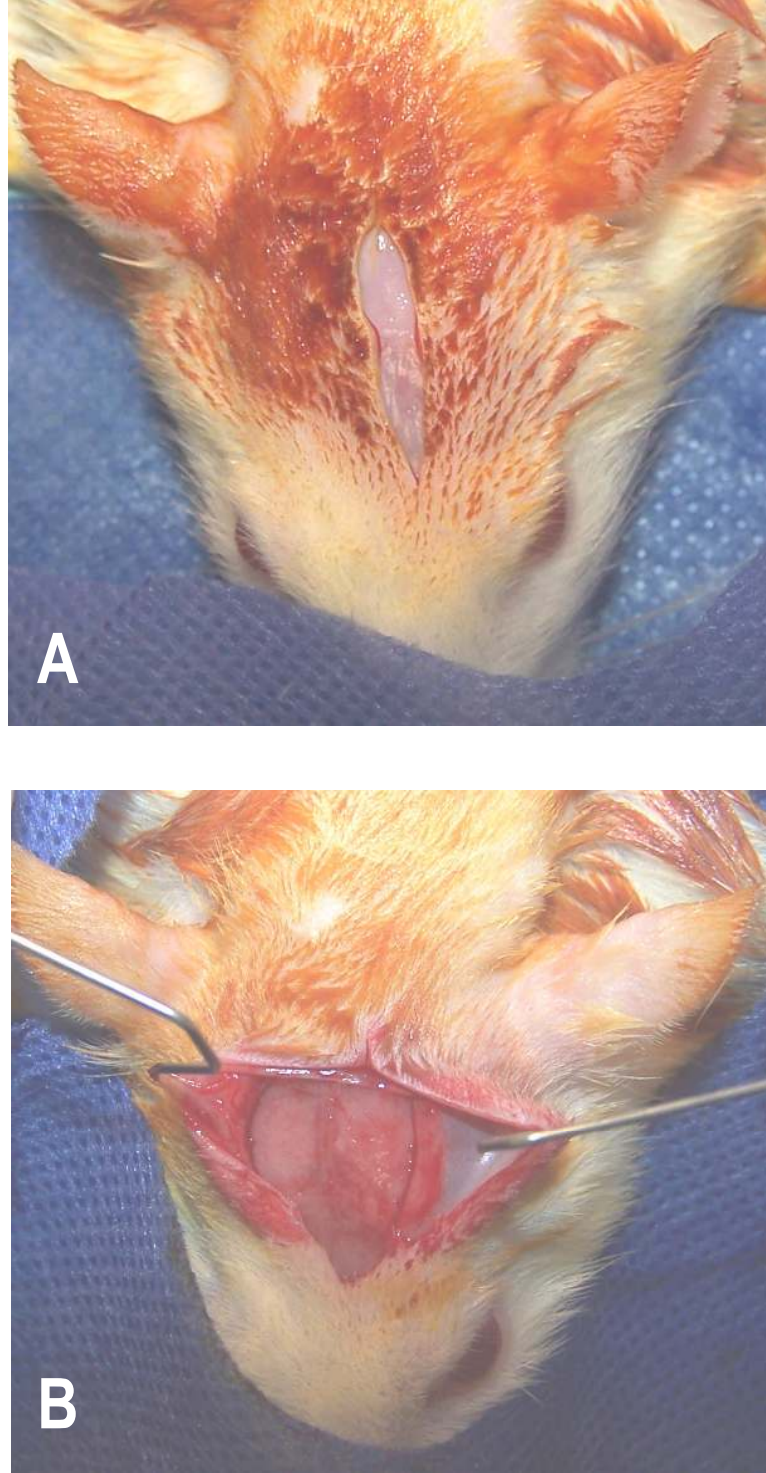
Grup I (Operatif kontrol grubu – 10 adet): Oluşturulan tam kat kemik defektlerine ek bir işlem yapılmadı. İşlem sonunda periost, oluşturulan defekt üzerine örtülerek 6/0 Vicryl® ile dikildi. Deri insizyonu 5/0 ipek ile kapatıldı.

Grup II (Deney Grubu I – 10 adet): Oluşturulan tam kat kemik defektleri çapı kadar demineralize kemik matriksi (DKM) 'Grafton® (Osteotech)' ile dolduruldu. İşlem sonunda periost, oluşturulan defekt üzerine örtülerek 6/0 Vicryl® ile dikildi. Deri insizyonu 5/0 ipek ile kapatıldı.

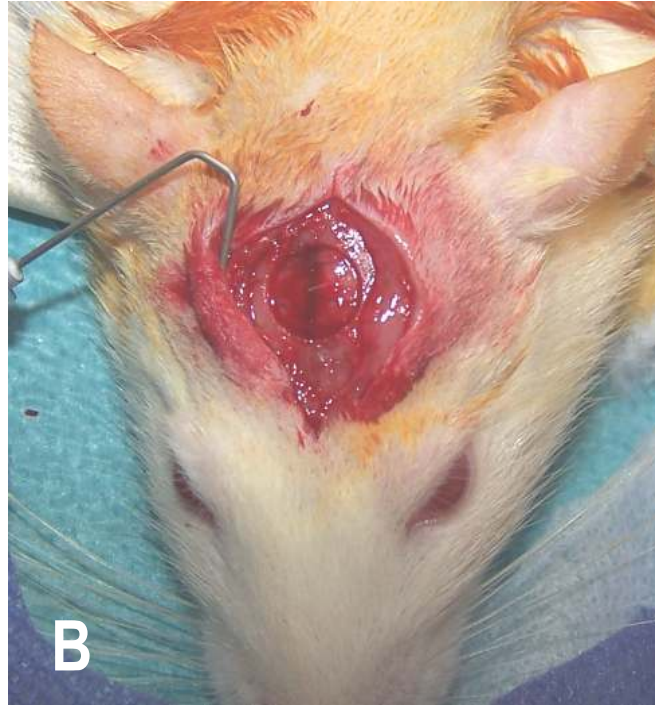
Grup III (Deney Grubu III – 10 adet): Oluşturulan tam kat kemik defektleri sonrası periost, oluşturulan defekt üzerine örtülerek 6/0 Vicryl® ile dikildi. Allojen sMKH'ler 10µl DMEM içinde $0,5 \times 10^6$ /µl konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 ml'lik insülin enjektörü yardımı ile iğne ucu periosttan geçerek defekt alanına verildi (**Şekil 24-B**). Deri insizyonu 5/0 ipek ile kapatıldı.

Grup IV (Deney Grubu III – 10 adet): Oluşturulan tam kat kemik defekt çapı kadar demineralize kemik matriksi (DKM) ‘Grafton (Osteotech)’ ile dolduruldu. Periost, oluşturulan defekt üzerine örtüldü. Allojen sMKH’ler 10l DMEM içinde $0,5 \times 10^6/\mu\text{l}$ konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 ml’lik insülin enjektörü yardımı ile iğne ucu periosttan geçerek defekt alanına verildi (**şekil 24-B**). Deri insizyonu 5/0 ipek ile kapatıldı.

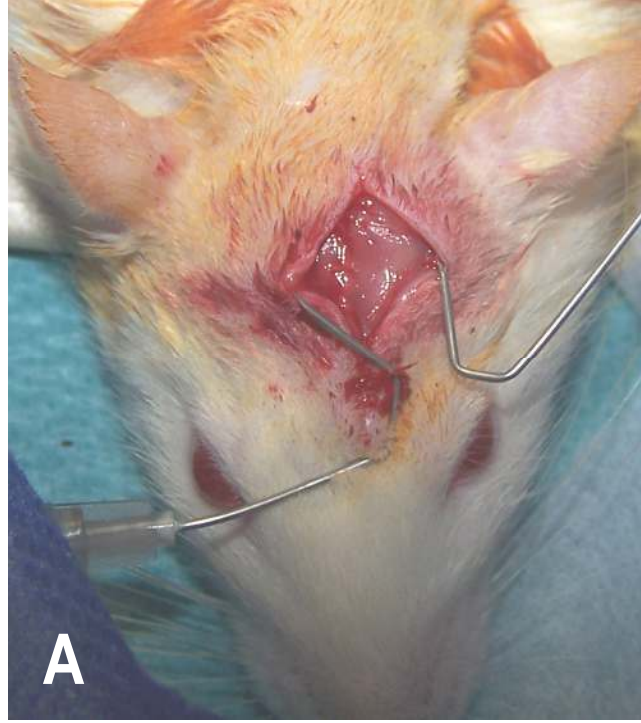
Deneyin 3. ayında, her gruptaki sıçanlar ketamin-HCl (50 mg/kg-IM) anestezisi ile uyutulup, 2 cc intrakardiyak Lidokain HCL (Jetokain simplex[®]) enjeksiyonu yapılarak tenazi sağlandı.



Şekil 22: (A) Kraniyumda orta hat longitudinal deri insizyonu (B) Periostu kaldırılmış frontoparyetal kemik



Şekil 23: (A) 7 mm çaplı ‘Trephan’ tur ucu (B) ‘Trephan’ tur ucu kullanılarak oluşturulan 7 mm çaplı kraniyal kemik defekti. İşlem sırasında dura korundu

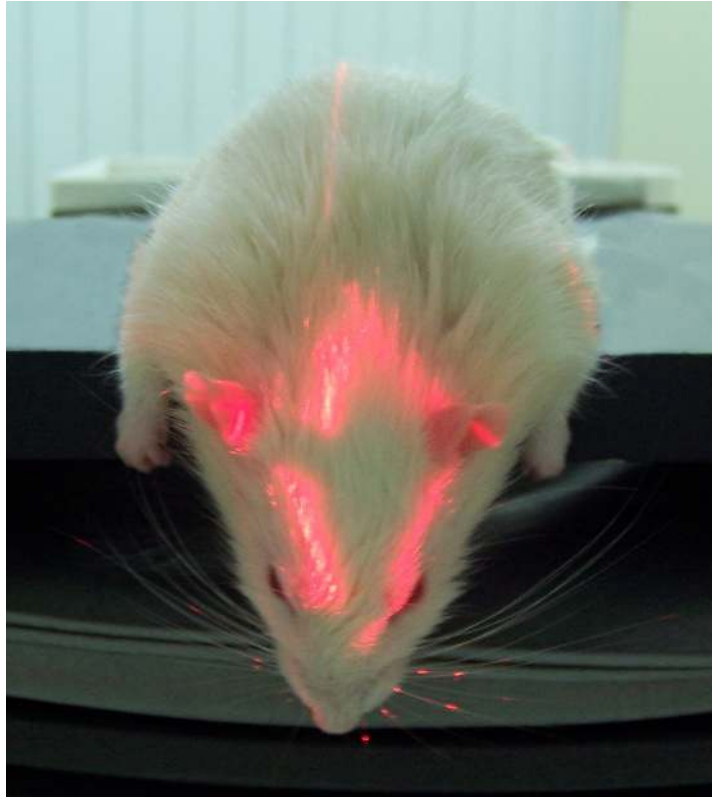


Şekil 24: (A) İşlem sonunda periost 6/0 ‘Vicryl’ ile ‘over-over’ onarıldı (B) Mezenkimal kök hücrelerin insülin iğnesi yardımı ile periost altındaki defekt alanına verilmesi

3. DEĞERLENDİRME

1. Radyolojik Değerlendirme

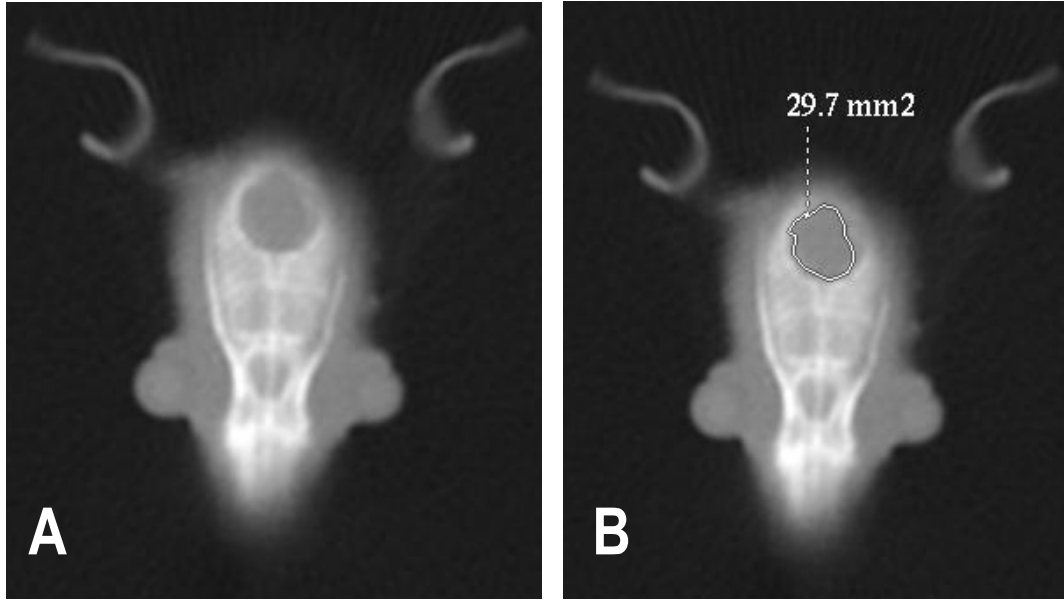
Değerlendirmeler 0., 4., 8. ve 12. haftalarda bilgisayarlı tomografi (GE CTI, General Electric Inc, ABD) yardımı ile sıçanların boynu fleksiyonda, gövde ile 90 derece açı yapacak şekilde gerçekleştirildi (**Şekil 25**).



Şekil 25: Boyun fleksiyonda gövde ile 90 derece açı yapacak şekilde koronal BT çekimi

1-1. Kemik Defekti Alan Ölçümleri

Ameliyat bitiminden sonraki 0., 4., 8. ve 12. haftalarda tüm deneklerin kranial kemik defektlerinin alanları koronal planda 1 mm'lik kesit kalınlıklı bilgisayarlı tomografi (BT) incelemeleriyle ölçüldü. Alan ölçümleri aynı cihazda; mm² cinsinden sonuç elde edilecek şekilde, grup hakkında bilgilendirilmeyen deneyimli bir radyoloji uzmanı tarafından yapıldı (şekil 26). Oluşturulan kraniyal kemik defektlerin zaman içinde alan ortalamaları açısından grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığına bakıldı.



Şekil 26: (A) Koronal planda 1 mm'lik kalınlıkta BT kesiti. (B) Aynı kesitte mm² cinsinden kemik defekti alan ölçümü

1-2. Kemik Defekt Alanı Kapanma Yüzde Oranları

Radyolojik olarak 4., 8. ve 12. haftalarda defekt alanı kapanma yüzdeleri ve ortalamaları hesaplanarak gruplar arasında anlamlı fark olup olmadığına bakıldı.

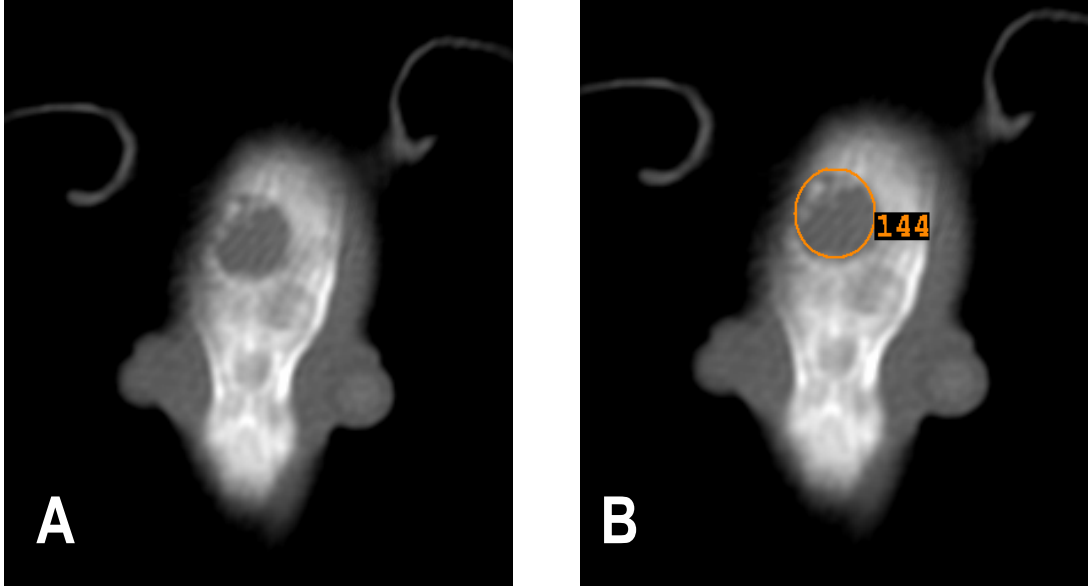
1-3. Kemik Yoğunluğunun Değerlendirilmesi

Kemik iyileşme kalitesini gösteren kriterlerden biri olan kalsifikasyonu, diğer bir deyişle yeni oluşan kemik yoğunluğunu radyolojik görüntülerde, bilgisayar ortamında değerlendirmek mümkün olmaktadır. Bu amaçla yapılan ölçümler, bilgisayarlı tomografi için Hounsfield ünitesi (HU) olarak tespit edilmektedir. Hava ‘-1000’ HU, su ‘0’ HU ve kemik ‘1000’ HU olarak kabul edilmekte, ölçülen alanın yoğunluğu ise bu değerlere dayanarak relatif bir değer olarak verilmektedir.⁷⁷

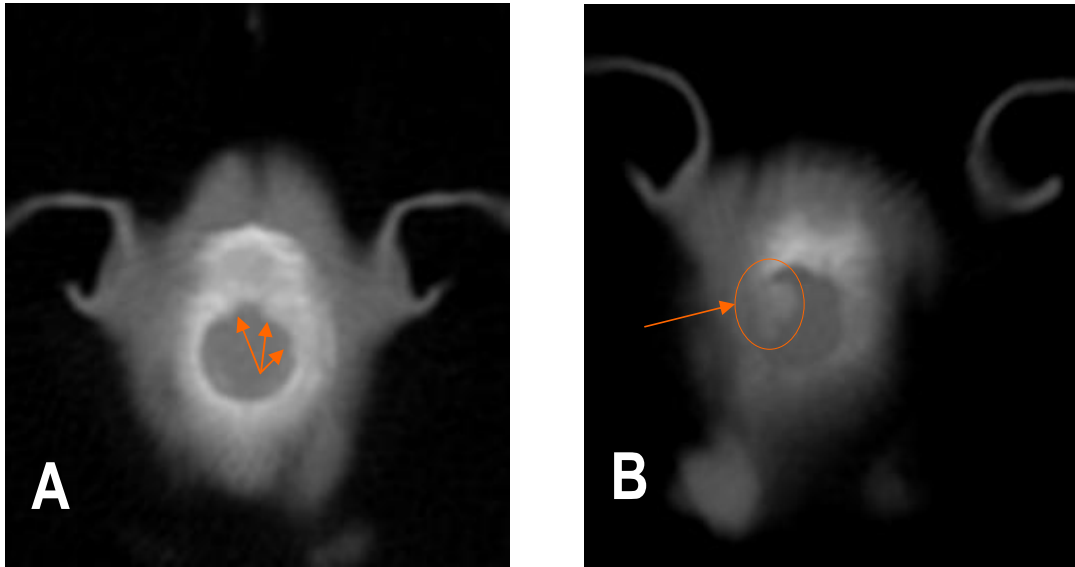
Yoğunluk değerlendirmesi, kemik iyileşmesinin evreleri göz önünde bulundurularak, sadece 12. hafta bilgisayarlı tomografi görüntüleriyle değerlendirildi. Kemik iyileşmesinin en iyi görüldüğü koronal 1 mm’lik BT kesitinden ölçüm yapıldı (**Şekil 27**). Gruplar hakkında bilgilendirilmeyen deneyimli bir radyoloji uzmanı tarafından, iyileşme görülen yerleri içine alacak şekilde tüm defektin HU cinsinden yoğunluğu tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığına bakıldı

1-4. Kemik iyileşme paterninin değerlendirmesi

Kemik defektlerinin iyileşme paternleri hem intramembranöz hem de endokondral kemikleşme şeklinde olduğundan tüm deneklerde oluşturulan kemik defektlerinin 12. hafta sonundaki koronal BT kesitlerindeki kemikleşme paterni defektin kenarlardan ‘testere dişi’ şeklinde kapanması şeklinde olabileceği gibi, bir kısmında ‘testere dişi’ şeklinde kapanmaya ek olarak defektin herhangi bir yerinde olan ‘dağınık kemikleşme’ paterninin varlığı değerlendirildi (**Şekil 28**). Dağınık kemikleşme paterni olanlar ‘1’ olarak tanımlanırken, dağınık kemikleşme paterni göstermeyenler ‘2’ olarak tanımlandı.



Şekil 27: (A) Kemik iyileşmesinin en iyi görüldüğü koronal 1 mm'lik kalınlıkta BT kesiti (B) Aynı kesitte kemikleşme görülen yerleri içine alacak şekilde tüm defektin HU cinsinden kemik yoğunluğunun ölçülmesi.



Şekil 28: 12. hafta sonundaki koronal BT kesitlerindeki kemikleşme paterni. (A) Defektin kenarlardan 'testere dişi' şeklinde kemikleşmesi (B) Defektin herhangi bir kenarından testere dişi şeklinde kemikleşmeye ek olarak defektin bir yerinde olan 'dağınık kemikleşme' paterni

2. Araştırma verilerinin analizi (İstatistiksel değerlendirme)

Elde edilen veriler SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) istatistik paket programına aktararak deneyimli bir istatistikçi tarafından analiz edildi. Her bir grup için 0., 4., 8. ve 12. hafta defekt alanlarının aritmetik ortalamaları ve defekt alanı kapanma yüzdeleri ortalama $\pm$ SD cinsinden sunuldu. Her bir grubun kendi içerisinde 0., 4., 8. ve 12. haftalarda defekt alanlarının karşılaştırılmasında, ‘tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi’ ve gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesinde ‘tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi’ kullanıldı. 0., 4., 8. ve 12. haftalarda, gruplar arasında defekt alanı ortalamaları, defekt alanı kapanma yüzdesi ortalamaları ve 12. hafta kemik yoğunlukları ortalamaları arasındaki fark ‘Kruskal-Wallis’ testi ile değerlendirilerek, fark saptanan durumda gruplar ikişerli olarak ‘Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney-U’ testi kullanılarak karşılaştırıldı. Grupların 12. hafta iyileşme paternleri ‘Ki-kare (χ^2)’ testi ile karşılaştırıldı. P değerinin 0,05’den küçük olması ($p<0,05$) ‘istatistiksel olarak anlamlı’ şeklinde değerlendirildi. Bonferoni düzeltmeli Mann Whitney-U testi değerlendirmesinde 4 grup ikişerli karşılaştırıldığından, $p<0,025$ ‘istatistiksel olarak anlamlı’ kabul edildi.

BULGULAR

RADYOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

Tüm deneklerin kraniyal kemik defektlerinin alanları koronal planda BT incelemelerle 0., 4., 8., ve 12. haftalarda ölçüldü ve kaydedildi. Tüm deneklerin kraniyal kemik defektlerinin 0-4., 0-8. ve 0-12. haftalardaki kapanma yüzdeleri hesaplandı (**Tablo II,III,IV,V**).

Tablo II: Grup I deneklerinin defekt alanlarının haftalara göre değişimi ve defekt alanlarının 0. haftaya göre kapanma yüzdeleri.

Grup I	0. Hafta Defekt Alanı (mm ²)	4. Hafta Defekt Alanı (mm ²)	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	8. Hafta Defekt Alanı (mm ²)	0-8. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	12.Hafta Defekt Alanı (mm ²)	0-12. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
Denek 1	38,3	28,9	24,5	27,6	27,9	26,0	32,1
Denek 2	31,9	31,8	0,3	31,7	0,6	31,8	0,3
Denek 3	38,7	37,4	3,3	36,8	4,9	35,7	7,7
Denek 4	25,7	25,3	1,5	22,3	13,2	22,0	14,4
Denek 5	37,4	34,4	8,0	33,8	9,6	34,0	9,0
Denek 6	28,8	25,4	11,8	24,5	14,9	23,2	19,4
Denek 7	35,1	34,6	1,4	28,2	19,6	27,9	20,5
Denek 8	33,2	32,4	2,4	32,6	1,8	30,5	8,1
Denek 9	40,7	38,3	5,9	32,3	20,6	32,4	20,3
Denek 10	31,8	30,3	4,7	29,3	7,8	29,2	8,1

Tablo III: Grup II deneklerinin defekt alanlarının haftalara göre değişimi ve defekt alanlarının 0. haftaya göre kapanma yüzdeleri.

Grup II	0. Hafta Defekt Alanı (mm ²)	4. Hafta Defekt Alanı (mm ²)	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	8. Hafta Defekt Alanı (mm ²)	0-8. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	12.Hafta Defekt Alanı (mm ²)	0-12. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
Denek 1	34,1	30,2	11,4	26,4	22,5	19,6	42,5
Denek 2	35,2	35,7	-1,4	33,1	5,9	32,5	7,6
Denek 3	35,8	34,5	3,6	31,9	10,8	31,9	10,8
Denek 4	31,3	29,1	7,0	26,8	14,3	26,3	15,9
Denek 5	22,0	18,8	14,5	18,5	15,9	14,5	34,0
Denek 6	27,4	27,6	-0,7	29,5	-7,6	24,7	9,8
Denek 7	31,9	29,7	6,9	21,2	33,5	21,4	32,9
Denek 8	30,9	30,2	2,2	29,2	5,5	29,7	3,8
Denek 9	32,9	30,8	6,3	29,8	9,4	26,5	19,4
Denek 10	31,1	24,5	21,2	23,7	23,7	18,3	41,1

Tablo IV: Grup III deneklerinin defekt alanlarının haftalara göre değişimi ve defekt alanlarının 0. haftaya göre kapanma yüzdeleri.

Grup III	0. Hafta Defekt Alanı (mm²)	4. Hafta Defekt Alanı (mm²)	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	8. Hafta Defekt Alanı (mm²)	0-8. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	12. Hafta Defekt Alanı (mm²)	0-12. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
Denek 1	44,4	35,9	19,1	35,2	20,7	34,4	22,5
Denek 2	34,2	33,1	3,2	29,0	15,2	28,7	16,0
Denek 3	41,7	39,1	6,2	36,0	13,6	31,4	24,7
Denek 4	39,6	34,9	11,8	25,1	36,6	19,7	50,2
Denek 5	25,7	25,4	1,1	23,8	7,3	17,2	33,0
Denek 6	39,7	39,3	1,0	24,4	38,5	22,9	42,3
Denek 7	38,6	36,9	4,4	28,4	26,4	21,1	45,3
Denek 8	35,3	32,3	8,5	31,2	11,6	24,1	31,7
Denek 9	33,1	29,6	10,5	24,4	26,2	23,5	29,0
Denek 10	25,2	24,7	1,9	23,7	5,9	19,8	21,4

Tablo V: Grup IV deneklerinin defekt alanlarının haftalara göre değişimi ve defekt alanlarının 0. haftaya göre kapanma yüzdeleri.

Grup IV	0. Hafta Defekt Alanı (mm²)	4. Hafta Defekt Alanı (mm²)	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	8. Hafta Defekt Alanı (mm²)	0-8. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	12. Hafta Defekt Alanı (mm²)	0-12. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
Denek 1	35,6	34,3	3,6	28,7	19,3	20,5	42,4
Denek 2	29,4	27,5	6,4	23,6	19,7	22,8	22,4
Denek 3	33,0	32,8	0,6	31,5	4,5	30,4	7,8
Denek 4	35,6	37,8	-6,1	34,9	1,9	31,3	12,0
Denek 5	35,0	34,7	0,8	31,2	10,8	29,8	14,8
Denek 6	37,6	33,5	10,9	33,3	11,4	31,6	15,9
Denek 7	36,1	35,7	1,1	35,4	1,9	35,2	2,4
Denek 8	41,7	40,6	2,6	33,9	18,7	31,3	24,9
Denek 9	35,6	31,8	10,5	29,2	17,9	27,8	21,9
Denek 10	42,5	39,0	8,2	39,9	6,1	29,3	31,0

1. Defekt Alanı Değerlendirme Bulguları

Her bir grup için 0., 4., 8. ve 12. haftalardaki kemik defekt alanlarının ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (**Tablo IV**). Gruplar arasında cerrahi ile oluşturulan kemik defekt alanları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (**Kruskal-Wallis Testi**) (**Tablo VI**).

Her bir grubun kendi içerisinde 0., 4., 8. ve 12. hafta defekt alanları ortalamaları incelendiğinde, zaman içerisindeki defekt alanı azalması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$) (**Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi**) (**Tablo IV**) (**Şekil 29, 30**).

0., 4., 8. ve 12. hafta defekt alanları ayrı ayrı karşılaştırıldığında, hiçbir haftada defekt alanı ortalaması açısından, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (**Kruskal-Wallis testi**) (**Tablo IV**) (**Şekil 29, 30**).

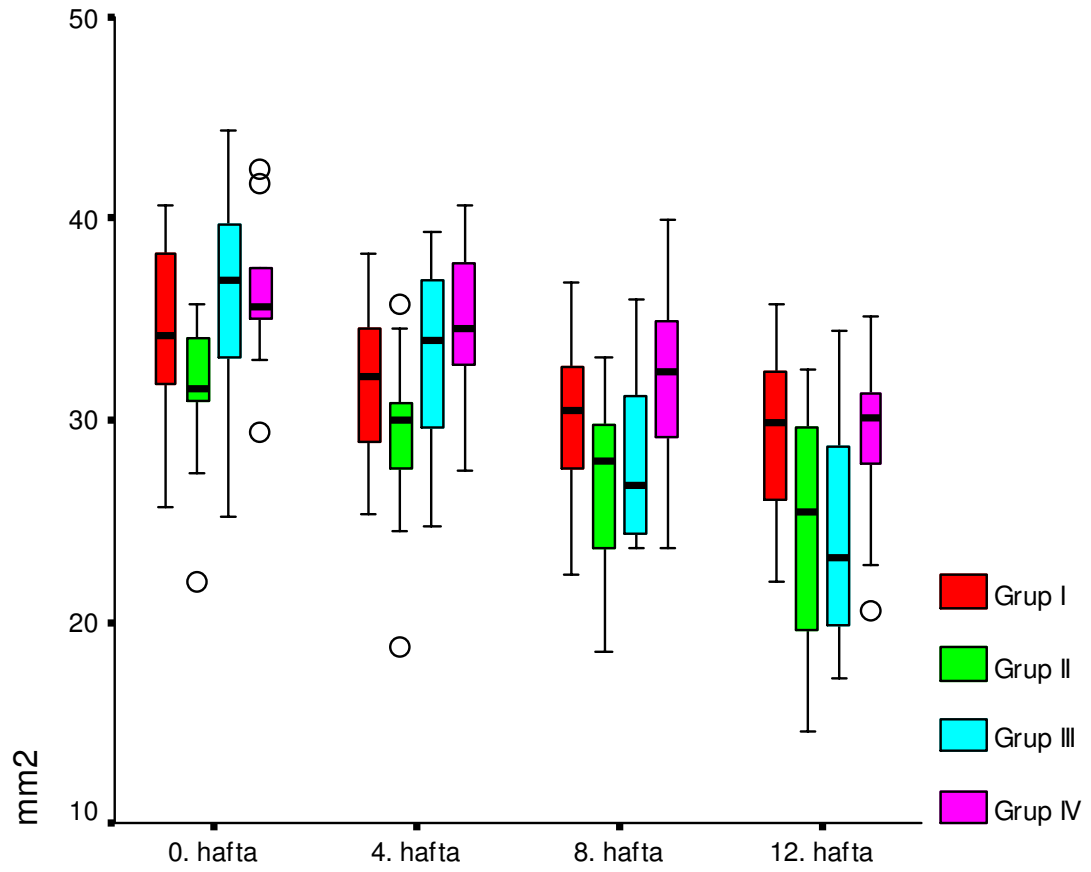
Tablo IV: Gruplardaki deneklerin 0., 4., 8. ve 12.haftalara göre kemik defektlerinin alanlarının aritmetik ortalama, standart sapma ve denek sayıları.

Grup	N	0. hafta (ortalama $\pm$ SD)	4. hafta (ortalama $\pm$ SD)	8. hafta (ortalama $\pm$ SD)	12. hafta (ortalama $\pm$ SD)	p [†]
I	10	34,16 $\pm$ 4,75	31,88 $\pm$ 4,50	29,91 $\pm$ 4,40	29,27 $\pm$ 4,51	0.021
II	10	31,26 $\pm$ 4,05	29,11 $\pm$ 4,80	27,01 $\pm$ 4,68	24,54 $\pm$ 6,01	0.023
III	10	35,75 $\pm$ 6,41	33,12 $\pm$ 5,19	28,12 $\pm$ 4,68	24,28 $\pm$ 5,54	0.001
IV	10	36,21 $\pm$ 3,81	34,77 $\pm$ 3,79	32,16 $\pm$ 4,44	29,00 $\pm$ 4,35	0.012
p [*]		0.068	0.074	0.132	0.098	0.003 [‡]

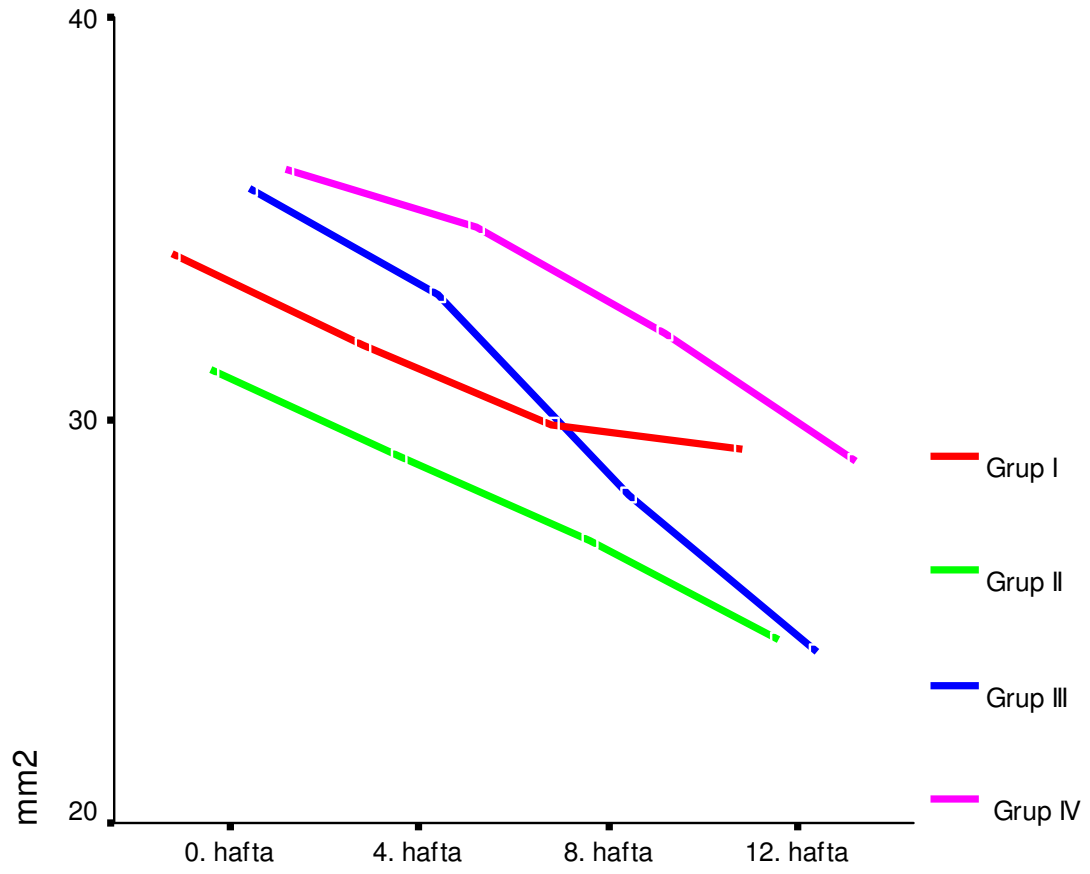
[†] Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi

[‡] Tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi

* Kruskal Wallis testi



Şekil 29: Defekt alanlarının gruplar arasında zamana göre değişimleri incelendiğinde her bir grubun defekt alanlarının istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde küçüldüğü görüldü ($p < 0,05$) (Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi). 0., 4., 8. ve 12. hafta defekt alanları ayrı ayrı karşılaştırıldığında, hiçbir haftada defekt alanı ortalaması açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p > 0,05$) (Kruskal-Wallis testi).



Şekil 30: Grupların defekt alanlarının haftalara göre değişimi incelendiğinde Grup III'teki defekt alanındaki azalma dikkati çekmekteydi ($P=0.001$) (Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi).

2. Defekt Alanı Kapanma Yüzdelерinin Değerlendirme Bulguları

Her bir grup için 0-4.,0-8. ve 0-12. haftalardaki kemik defekti kapanma yüzdelерinin ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı (**Tablo V**).

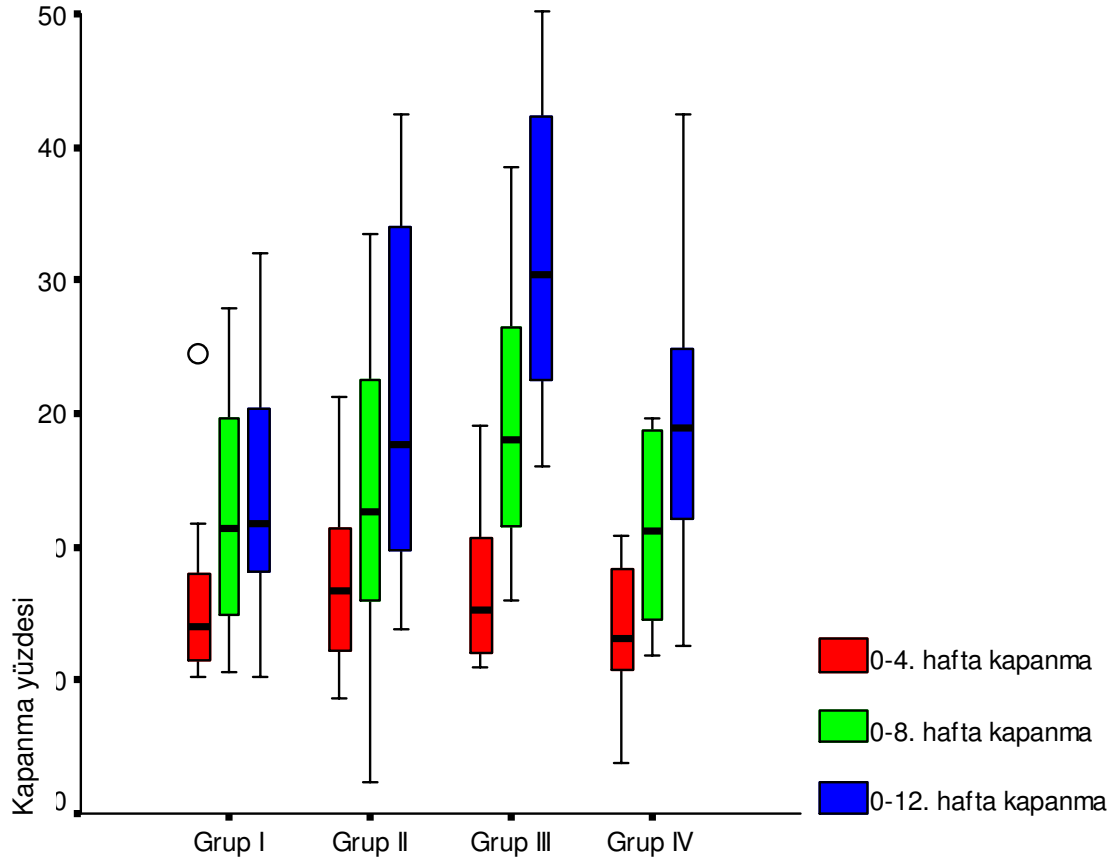
Tablo V: Gruplardaki deneklerin 4., 8. ve 12. haftalardaki kemik defekti kapanma yüzdelерinin ortalamaları, standart sapmaları ve denek sayıları.

Grup	N	0-4. hafta (ortalama $\pm$ SD)	0-8. hafta (ortalama $\pm$ SD)	0-12. hafta (ortalama $\pm$ SD)
I	10	6,40 $\pm$ 7,20	12,12 $\pm$ 8,84	14,03 $\pm$ 9,18
II	10	7,12 $\pm$ 7,02	13,43 $\pm$ 11,49	21,84 $\pm$ 14,53
III	10	6,81 $\pm$ 5,79	20,24 $\pm$ 11,50	31,64 $\pm$ 11,22
IV	10	3,88 $\pm$ 5,27	11,26 $\pm$ 7,32	19,60 $\pm$ 11,62
p [†]		0.743	0.249	0.018

[†] Kruskal Wallis testi

0-4., 0-8. ve 0-12. haftalar için 4 grubun kapanma yüzdeleri karşılaştırıldığında, 0-12. haftadaki kapanma yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (**p=0,018**) (**Kruskal-Wallis testi**) (**Tablo V**) (**Şekil 35,36**).

Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için yapılan ikili karşılaştırmalarda Grup III ile Grup I arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (**p=0,002**) (**Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi**) (**Şekil 31**).



Şekil 31: Grupların defekt alanlarının 0-4., 0-8. ve 0-12. haftalar için kapanma yüzdeleri. Onikinci hafta kapanma yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (**p=0.018**) (**Kruskal-Wallis testi**).

Onikinci hafta kapanma yüzdesi için yapılan ikili karşılaştırmalarda (**Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi**):

Grup I ile II arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**p=0.257**).

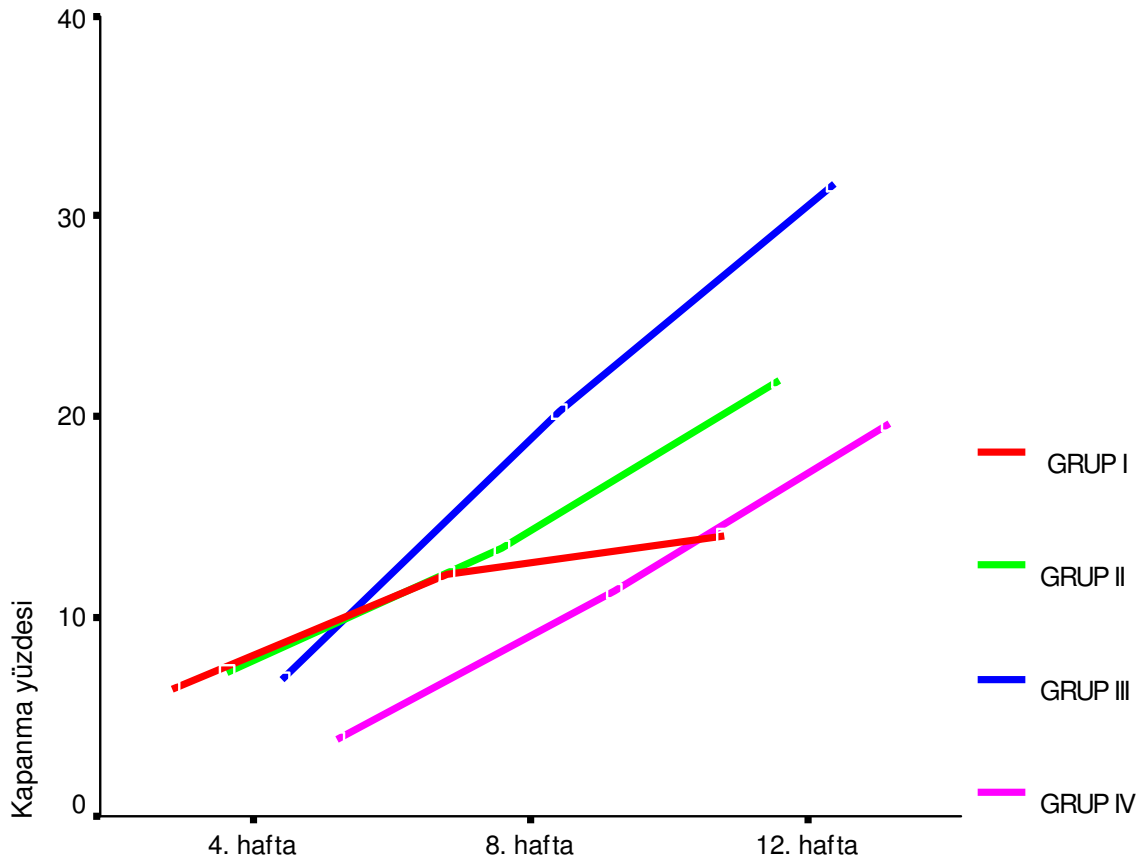
Grup I ile III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (**p=0.002**).

Grup I ile IV arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**p=0.226**).

Grup II ile III arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**p=0.112**).

Grup II ile IV arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**p=0.821**).

Grup III ile IV arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**p=0.028**).



Şekil 32: 0-4., 0-8. ve 0-12. haftalar için 4 grubun kapanma yüzdeleri karşılaştırıldığında Grup I ile Grup III arasında kapanma yüzdeleri arasındaki fark özellikle 0-12. hafta için dikkat çekmektedir ($p=0,002$) (Bonferoni düzeltmeli Mann-Whitney U testi).

3. Kemik Yoğunluğu Değerlendirme Bulguları

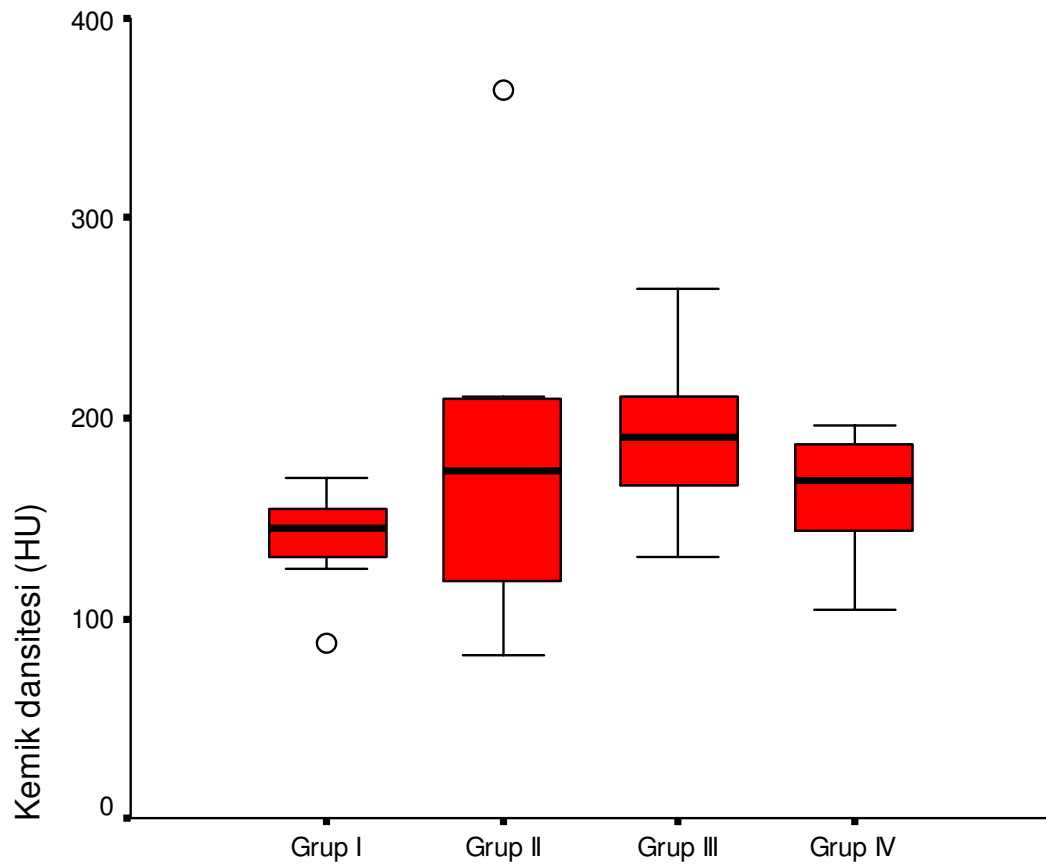
Tüm deneklerin kraniyal kemik defektlerinin 12. hafta sonundaki kemik yoğunlukları ve her grup için 12. hafta sonundaki kemik yoğunluğu ortalamaları hesaplandı (**Tablo VII**).

Tablo VI: Deneklerin kraniyal kemik defektlerinin 12. hafta sonundaki kemik yoğunlukları ve her grubun kemik yoğunluklarının ortalamaları

Denekler	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Denek 1	138	119	185	196
Denek 2	139	210	166	144
Denek 3	169	133	197	186
Denek 4	170	82	166	155
Denek 5	130	211	261	196
Denek 6	88	174	265	182
Denek 7	151	194	131	104
Denek 8	155	173	152	118
Denek 9	124	116	211	187
Denek 10	152	364	197	149
Ortalamalar ($p^{\dagger}=0,068$)	141,6	177,6	193,1	161,7

[†] Kruskal Wallis testi

Onikinci hafta kemik yoğunluğu ölçüm ortalamalarına göre Grup III'teki kemik yoğunluğunun daha fazla olduğu saptandı ancak gruplar arasında kemik yoğunluğu ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,065$) (Kruskal-Wallis testi) (Tablo VI) (Şekil 33).



Şekil 33: 12. hafta kemik yoğunluk ölçüm ortalamalarına göre Grup III'teki kemik yoğunluğu daha fazlaydı ancak gruplar arasında kemik yoğunluğu ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Kruskal-Wallis testi).

4. Kemikleşme Paterninin Değerlendirmesi

Tüm deneklerin kraniyal kemik defektlerinin 12. hafta sonundaki kemikleşme paternleri değerlendirildi (**Tablo VII**). ‘Testere dişi’ şeklinde kemikleşmeye ek olarak defektin herhangi bir yerinde olan ‘dağınık kemikleşme’ paterninin varlığı ‘1’ olarak tanımlanırken, dağınık kemikleşme paterni göstermeyenler ‘2’ olarak tanımlandı.

Tablo VII: Deneklerin kraniyal kemik defektlerinin 12. hafta sonundaki kemikleşme paternleri

Denekler	Grup I	Grup II	Grup III	Grup IV
Denek 1	2	1	1	1
Denek 2	1	1	1	1
Denek 3	2	2	2	1
Denek 4	2	2	1	1
Denek 5	2	1	2	2
Denek 6	2	2	1	2
Denek 7	1	1	1	2
Denek 8	2	2	2	1
Denek 9	2	2	1	1
Denek 10	2	2	1	1

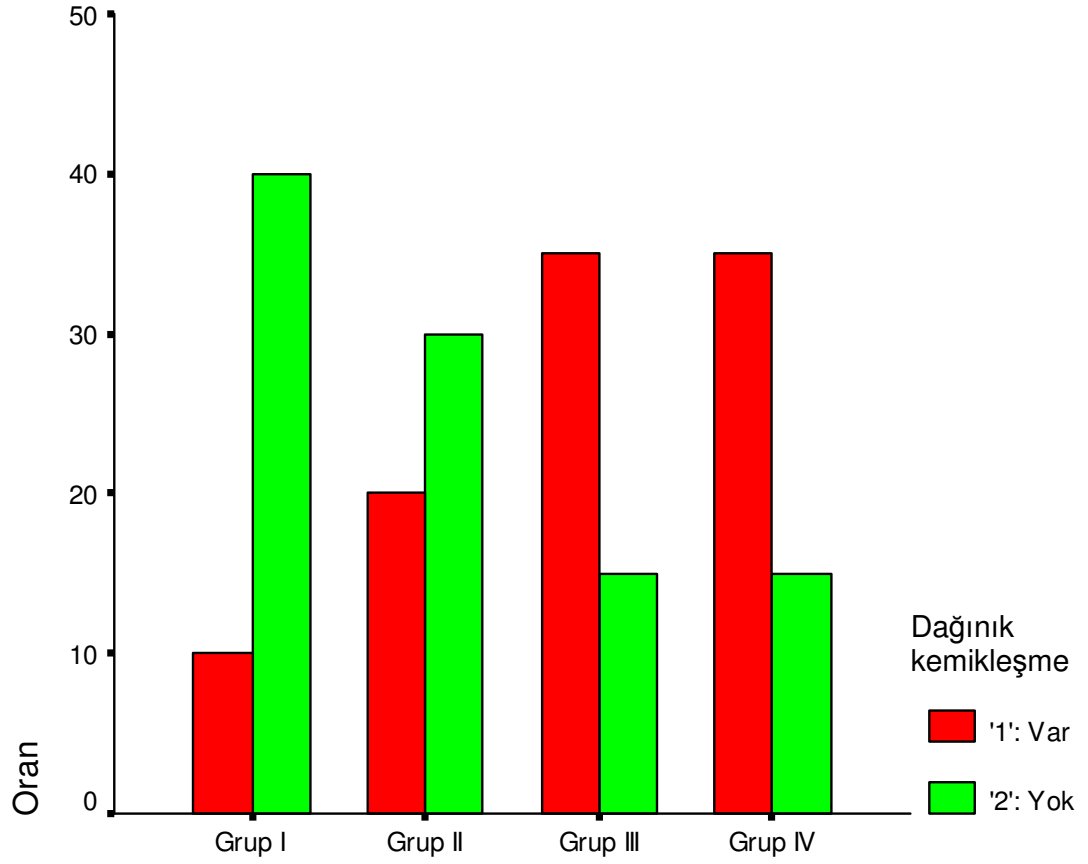
Her grup için 12. hafta dağınık kemikleşme paterni yüzdeleri hesaplandı. (**Tablo VIII**)

Tablo VIII: Her bir grup için 12. hafta dağınık kemikleşme paterni yüzdeleri

Gruplar	Dağınık kemikleşme paterni olanlar	Dağınık kemikleşme paterni olmayanlar
I	20	80
II	40	60
III	70	30
IV	70	30

$$(\chi^2 = 7,2) (P=0,066)$$

Grup III ve IV’de dağınık kemikleşme, Grup I ve II’ye göre daha çok görölmesine rağmen; gruplar arasında dağınık kemikleşme paterni açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (**p>0,05**) (**Ki-kare testi**) (**Tablo VIII**) (**Şekil 34**).



Şekil 34: Grup III ve IV’de dağınık kemikleşme, grup I ve II’ye göre daha çok görülmesine rağmen; gruplar arasında dağınık kemikleşme paterni açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p>0,05$) (Ki kare testi).

TARTIŞMA VE SONUÇ

Kranial kemik defektlerinin kapanmasında 19. yüzyıldan günümüze kadar otojen greftler, sentetik, yarısentetik ve alloplastik materyaller kullanılmıştır.¹³

Kranial kemik defektinin iyileşmesi sırasında ölü boşluğu çevreleyen dokuların sağlıklı olması gerekmektedir. Kraniyumda periosteum ve özellikle dura bu olayda önemlidir.⁷⁸ Yeni oluşan kemik çevreden merkeze doğru (sentripedal) oluşmaktadır.⁷⁸ Etraftaki kemik doku dura ve periosteum olmaksızın yetersiz yeni damarlanma ve kemikleşme gösterir. Diğer iskelet yapılarının aksine kafatası kemiklerinin iyileşmesinde periosteumun daha az bir önemi vardır.^{44,78} Ancak dura ile periosteumun karşılıklı etkileşiminin de önemli olduğu bildirilmiştir.⁴⁴ Bu çalışmada kemik defekti oluşturulurken dura ve altındaki sagital sinüs korunmuş ve kesilen periosteum, defekt üzerine getirilerek onarılmıştır. İçeride kalan ölü boşlukta yumuşak doku sıkışması ve fibroblastik aktivite en aza indirilerek MKH ve DKM'nin etrafa kaçması önlenmiştir.

Sıçanlarda kritik büyüklükteki kemik defektinin boyutu konusunda net bir fikir birliği yoktur. Çoğu yayın 8 mm'yi kabul ederken bir kısmı da 6 mm ve hatta 4 mm'yi kritik kranial kemik defekti olarak kabul etmiştir.^{4,85,89,97} Bu çalışmada 7 mm'lik tam kat kemik defekti yaratılarak kritik büyüklükteki kranial kemik defekti oluşturuldu.⁸

Sıçan kritik büyüklükteki kranial kemik defekti modeli ilgili çalışmalarda DKM'nin etkisi daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir. Bu çalışmalarda insan kaynaklı DKM kullanımı sıklıkla mevcuttur. İnsandan elde edilen ve çeşitli derecede rezidüel kalsiyum içeren allojen

dondurulmuş-kurutulmuş demineralize kemik matriksi (DKDKM) ve dondurulmuş kemik matriksinin (DoKM) çeşitli rezidüel kalsiyum içeren preperatlarının, politetrafloretilen ile kombine edilerek sıçanlardaki kritik büyüklükteki kemik defektlerindeki iyileşme etkisine bakıldığında en fazla iyileşmenin %2 rezidüel kalsiyum içeren DKDKM grubunda olduğu tespit edilmiştir. Aynı çalışmada yapılan kemik yoğunluk ölçümlerinde bu grubun kemik yoğunluğu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir.⁹⁹

Demineralize kemik matriksi içerisindeki proteinlerin etkisini ayrı ayrı inceleyen yayınlar vardır. İnsan rekombinant kemik morfojenik protein-4 (İrKMP-4)'ün [human recombinant bone morphogenic protein-4 (HrBMP-4)] sıçan kritik büyüklükteki kraniyal kemik iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen bir çalışmada yazarlar, dozdan bağımsız olarak İrKMP-4'ün absorbe kollajen sünger ve beta-trikalsiyum fosfat ile beraber verilmesinin postoperatif 8. haftada istatistiksel olarak anlamlı şekilde histolojik kemik oluşumunu indüklediğini belirtmişlerdir.⁸⁰

Han ve ark. İrKMP-4'ün fibrin-fibronektin sistem içinde verilmesinin sıçan kritik büyüklükteki kemik iyileşmesini postoperatif 8. haftada arttırdığını histolojik olarak tespit etmişlerdir.⁴¹

İrKMP-2, 4, ve 7'nin sıçan kritik büyüklükteki kemik iyileşmesi üzerine etkileri incelendiğinde üç faktör arasında iyileşme açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.⁴⁸ Bütün bu çalışmalarda DKM ve içerisindeki proteinler bir taşıyıcı sistem kullanılarak verilmiş ve kraniyal kemik defektindeki etkileri gösterilmiştir.^{41,48,80,99} Yukarıda belirtildiği üzere insan kaynaklı DKM'nin sıçanlarda kullanımının allerjik reaksiyonları ile ilgili bir açıklama yoktur. İnsan kaynaklı DKM'nin taşıyıcı olmaksızın kraniyal kemik defektlerindeki etkisini inceleyen bir çalışma yoktur ve bizim çalışmada bu test edildi.

Çalışmamızda kraniyal kemik defektinin iyileşmesinin değerlendirilmesinde BT ile alan ölçümü, kapanma yüzdesi ve kemik yoğunluğu ölçümleri kullanıldı. Bu değerlendirme

kriterleri kullanılarak yapılan daha önceki yayınlarda kraniyal kemik defektlerinin değerlendirilmesinde düz radyogramlar veya BT kullanılmıştır.^{77,85} Direkt kraniyal kemik defektlerindeki etkinliğini inceleyen bir yayın olmamakla beraber bu bölgeye yakın olması ve fikir vermesi açısından, sıçan zigomatik arkının ortasından yapılan kemik defektinin takibinde üç-boyutlu bilgisayarlı tomografi (3BBT) ve düz radyogramlar karşılaştırılmıştır.⁷⁷ Postoperatif 10. haftada yapılan ölçümlerde düz radyogramların kırık hattındaki fibröz kallusu yakalama şansının 3BBT'ye göre istatistiksel olarak daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Fakat istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 20. haftada yapılan ölçümlerde, 3BBT ile yapılan ölçümün defektin gerçek boyutunu düz radyogramlardan daha iyi tespit ettiği ancak istatistiksel olarak anlamlı şekilde defekti olduğundan daha küçük gösterdiği tespit edilmiştir.⁷⁷ Sıçanların kraniyal kemik defektlerinde, düz radyografik değerlendirmelerin gerçek iyileşme paternini olduğundan küçük veya büyük olarak gösterdiği ve tek başına kullanılmaması gerektiğini bildiren yayınlar vardır ancak tek başına BT ölçümlerin doğruluğunu test eden bir veri yoktur.⁸⁵ Bizim çalışmamızda kritik büyüklükteki alan ölçümünün değerlendirmesinde haftalara göre değişim incelendiğinde 0., 4., 8. ve 12. hafta defekt alanları ayrı ayrı karşılaştırıldığında, hiçbir haftada defekt alanı ortalaması açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (**p>0.05**) (**Kruskal-Wallis testi**) (**Tablo IV**) (**Şekil 29, 30**). Ancak her bir grubun 0., 4., 8. ve 12. hafta defekt alanları ortalamaları incelendiğinde, zaman içerisindeki defekt alanı azalması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (**p<0.05**) (**Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi**) (**Tablo IV**) (**Şekil 29, 30**). Zamanla defekt alanının kapanması en çok Grup III'te dikkat çekmekteydi. Bunu sırasıyla Grup IV ve Grup II takip etmekteydi. Defekt alanı değişimi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmasa da, her grup kendi içinde incelendiğinde zaman içerisindeki defekt alanı azalması açısından istatistiksel olarak en anlamlı defekt alanı azalan Grup III'tü (**p=0,001**)

(Tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi) (Tablo IV) (Şekil 29, 30). İlginç olan radyolojik sonuç kontrol grubundaki defekt alanı açısından olan değişimdi. Kritik büyüklükte kemik defekti kendi kendine kapanamayacağından özellikle 8. haftanın sonundaki fibröz kallusun defekt alanındaki radyolojik küçülmeyi sağladığı ve bu haftadan sonra değişmediği söylenebilir. Ancak bunu test etmek için daha uzun süre takipli çalışmalar gerekmektedir. Çalışmada ‘O.’ haftada gruplar arasında cerrahi ile oluşturulan kemik defekti alanları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı ($p=0.068$) (Kruskal-Wallis testi) (Tablo IV). Ancak gruplardaki defekt alanları ortalamaları homojen olmadığından tüm deneklerin kranial kemik defektlerinin 0-4., 0-8. ve 0-12. haftalardaki kapanma yüzdeleri hesaplandı (Tablo VIII, IX, X, XI). 0-4., 0-8. ve 0-12. haftalar için dört grubun kapanma yüzdeleri karşılaştırıldığında, 0-12. haftadaki kapanma yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,018$) (Kruskal-Wallis testi) (Tablo V). Bu farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirlemek için yapılan ikili karşılaştırmalarda Grup III ile Grup I arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0,002$) (Bonferoni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi) (Şekil 31). Buna göre Grup III’teki deneklerin 0-12. hafta sonundaki defekt alanı kapanma yüzdeleri Grup I’e göre istatistiksel olarak daha fazlaydı. Grup III’ten sonra defekt alanı radyolojik olarak en çok iyileşen Grup II idi. Bu bulgular, yukarıdaki defekt alanının zamana göre değişimindeki Grup III’ten sonraki sıralamayı değiştirmişti. Zamana göre defekt alanı değişimindeki azalma Grup III’dan sonra Grup IV iken; defekt alanı iyileşme yüzdeleri açısından sıralama yapılacak olursa Grup III’dan sonra en çok Grup II’de iyileşme görülmüştür. Daha önceki yayınlarda belirtildiği gibi DKM’nin, kök hücrelerin ortama göçü, farklılaşması ve osteojenik doku oluşturmadaki etkisinin türe ait bir etki olabileceği, insan kaynaklı DKM’nin sıçan mezenkimal kök hücrelerinin farklılaşması ve kemik oluşumu

üzerindeki etkileri radyolojik olarak yapamadığı veya birbirlerine zıt etki gösterdikleri düşünülebilir. Ancak ileri çalışmalarla bu nokta daha ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

Kemik yoğunlukları tüm denekler için 12. haftanın sonunda ölçüldü. Grup III'teki kemik yoğunluğu daha fazla olma eğilimi taşıyordu, ancak gruplar arasında kemik yoğunluğu ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($p=0,065$) (**Kruskal-Wallis**) (**Tablo VI**) (**Şekil 33**). İstatistiksel olarak anlamlı olmasa da Grup III'ün kemik yoğunluk ortalaması en fazla iken bunu Grup II ve Grup IV'teki ortalamalar izlemekteydi. Bu bulgular yukarıda belirtilen kemik defekti kapanma yüzde ortalamalarının değişim sırasına uymaktaydı.

Çalışmadaki radyolojik bulgulardan diğer ilginç bir nokta ise kemikleşme paternlerindeki farklılık idi. Oluşan fibröz kallus ve intramembranöz kemikleşme paternine bağlı olarak defekt kenarlarından 'testere dişi' şekline bir kemikleşmenin yanında özellikle Grup III ve Grup IV'de 'testere dişi' şekline kemikleşmeye ek olarak enondral kemikleşmeyi andıran, defektin bir kenarında veya herhangi bir yerinde ada ada 'dağınık kemikleşme' paterni vardı. Kemikleşme paterni açısından fark olup olmadığına baktığımızda Grup III ve Grup IV'de %70 dağınık kemikleşme gözlenirken, Grup II'de %40 ve Grup I'de %20 dağınık kemikleşme paterni gözlemlendi ancak gruplar arasında kemikleşme paterni açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı ($P>0,05$) (**Ki-kare testi**) (**Tablo VIII**) (**Şekil 34**). Allojen kök hücrelerin sıçan kraniyal kemik defektlerinde radyolojik olarak dağınık kemikleşme paternini uyarması söz konusu olabilir ancak bu hipotezin histolojik bulgular ile desteklenmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak sıçan kraniyal kritik kemik defektlerinde mezenkimal kök hücre uygulaması radyolojik olarak kemik defekt alanında istatistiksel olarak anlamlı küçülme sağlamasının yanında kemik iyileşme paterninde de farklılık oluşturma eğilimindedir. Kemik defekti kapanması üzerine olan bu olumlu etkisi insan kaynaklı DKM ile beraber uygulandığında görülmedi. Bu etkileşimin altındaki mekanizmayı açıklamak için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

ÖZET

Kritik büyüklükteki kraniyal kemik defektlerinin kapanmasını sağlamak veya hızlandırmak amacıyla birçok malzeme ve kimyasallar kullanılmıştır. Son yıllarda giderek artan bir merak uyandıran Mezenkimal kök hücrelerin sıçan kritik kraniyal kemik defektlerindeki etkinliği araştırıldı.

Çalışmada 50 adet wistar türü erkek sıçan kullanıldı. 10 adet sıçan allojen mezenkimal kök hücre elde etmek için kullanıldı. Geriye kalan sıçanlar dört gruba ayrıldı. Her bir sıçanın frontal kemiğinde 7 mm çaplı kritik büyüklükte tam kat kemik defekti yaratıldı. Grup I (n=10) operatif kontrol grubu iken, Grup II'de (n=10) insan kaynaklı demineralize kemik matriksi, Grup III'de (n=10) mezenkimal kök hücre, Grup IV'de (n=10) mezenkimal kök hücre ve demineralize kemik matriksi kombinasyonu defektlere uygulandı. Deneklerin tamamı 12. hafta sonunda sakrifiye edildi. Değerlendirmede radyolojik olarak, gruplar arasında 0., 4., 8., ve 12. haftaların defekt alan ölçümleri ve kapanma yüzdeleri, 12. hafta için kemik yoğunluklarının ve kemikleşme paternlerinin karşılaştırmaları yapıldı.

Tüm grupların defekt alanlarının zaman içinde istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı ancak hiçbir haftada defekt alanı ortalaması açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olmadığı saptandı. Grup III'ün 0-12. haftadaki kapanma yüzdesinin Grup I'e göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla olduğu saptandı. 12. hafta kemik dansite ölçümünde Grup III'teki kemik yoğunluğunun en çok olduğu ancak gruplar arasında kemik yoğunluk ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Grup III ve Grup IV'de %70 dağınık kemikleşme gözlenirken Grup II'de %40 ve Grup I'de %20 olarak gözlenmesine rağmen gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı.

Sonuç olarak sıçan kritik kraniyal kemik defektlerindeki allojen mezenkimal kök hücre uygulaması, radyolojik olarak 12. hafta sonunda kemik defekt alanında istatistiksel olarak anlamlı küçülme yapmasının yanında kemik yoğunluğunda artış ve kemik iyileşme paterninde de farklılık oluşturma eğilimindedir. Kemik defekt alanındaki iyileştirici etkisi insan kaynaklı demineralize kemik matriksi ile beraber uygulandığında azalmaktadır. Bu etkileşimin altındaki mekanizmayı açıklamak için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

SUMMARY

Different types of materials and chemicals have been used for the closure and accelerating the healing of critical size cranial defects. In this study the effectiveness of the mesenchimal stem cells, which has avoked a curiosity recently, was investigated in critical size cranial defects of rats.

Fifty wistar type male rats were evaluated in the study. Ten rats were used to obtain allogenic MSC's. The remainders were separated into four groups. A full thickness circular bone defect 7 mm in diameter was created in the frontal bone of each rat. Group I (n=10) was operative control group. In Group II demineralize bone matrix, in Group III mesenchimal stem cells and in Group IV demineralize bone matrix and mesenchimal stem cell combination was applied into the defects. At the end of the 12th week, all of the rats were sacrificed. Radiologic evaluation of the defect areas within the groups at zero, 4th, 8th and 12th weeks, bone density measurements and the healing pattern at the end of the 12th weeks were compared.

In all groups there were statistically significant decrease in defect areas, but the average values of the defect areas within the groups were not statistically significant. The percentage of the healing area of the Group III at the 12th week was statistically significant greater than Group I. Group III's bone density at the 12th week was the greatest but there was not a statistically significant difference within the groups for bone density. In Group III and Group IV, distrubuted healing patern was observed in 70% of the animals, on the other hand this healing patern was evident 40% of Group II and 20% Group I. But there was not a statistically significant difference within the groups for healing patern.

In conclucion, allogenic rat mesenchimal stem cell application has created a statistically significant radiologic reduction at the bone defect area of the critical size cranial defects at the end of the 12th week. Mesenchimal stem cell aplication has also increased the bone density and changed the healing patern. The positive effect on the healing of the defect area was reduced while combined with demineralize bone matrix. The exact mechanism of this effect should be investigated in further studies.

KAYNAKLAR

1. Abedin M, Tintut Y, Demer LL: Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res.* 95(7):671-676, Review, 2004
2. Adkisson HD, Strauss-Schoenberger J, Gillis M, Wilkins R, Jackson M, Hruska KA: Rapid quantitative bioassay of osteoinduction. *J Orthop Res.* 18(3):503-511, 2000
3. Ahn JJ, Terry Canale S, Butler SD, Hasty KA: Stem cell repair of physeal cartilage. *J Orthop Res.* 22(6):1215-1221, 2004
4. 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
5. 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
6. Bancroft JD, Stevens A: *Theory and Practice of Histological Techniques.* 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork1996, Chapter 15, page: 309-339
7. 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

8. 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
9. Bauer TW, Muschler GF: Bone graft materials. An overview of the basic science. Clin Orthop Relat Res. (371):10-27, Review, 2000
10. Bayramiçli Mehmet: Deneysel mikrocerrahi. 1. baskı. Argos iletişim, İstanbul 2005, S:123
11. 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
12. 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
13. Bostrom R, Mikos A: Tissue engineering of bone. In: Atala A, Mooney DJ, Vacanti JP, et al (eds). Synthetic Biodegradable Polymer Scaffolds, vol 1. Boston: Birkhauser,:215–234, 1997
14. 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
15. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE: Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. Bone. 21(3):225-35, 1997

16. 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
17. 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
18. 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
19. Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 9(5):641-650, 1991
20. 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
21. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, Luu HH, An N, Breyer B, Vanichakarn P, Szatkowski JP, Park JY, He TC: Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *J Bone Joint Surg Am.* 85-A(8):1544-1552, 2003
22. Chiang H, Kuo TF, Tsai CC, Lin MC, She BR, Huang YY, Lee HS, Shieh CS, Chen MH, Ramshaw JA, Werkmeister JA, Tuan RS, Jiang CC: Repair of porcine articular cartilage defect with autologous chondrocyte transplantation. *J Orthop Res.* 23(3):584-593, 2005

23. 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

24. Cinotti G, Patti AM, Vulcano A, Della Rocca C, Polveroni G, Giannicola G, Postacchini F: Experimental posterolateral spinal fusion with porous ceramics and mesenchymal stem cells. *J Bone Joint Surg Br.* 86(1):135-142, 2004

25. 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.

26. Connolly JF: Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* (313):8-18, 1995

27. Cottler-Fox MH, Lapidot T, Petit I, Kollet O, DiPersio JF, Link D, Devine S: Stem cell mobilization. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 419-437, 2003

28. Devine SM, Peter S, Martin BJ, Barry F, McIntosh KR: Mesenchymal stem cells: stealth and suppression. *Cancer J.* 7 Suppl 2:S76-82, 2001

29. Devine SM: Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? *J Cell Biochem Suppl.* 38:73-79, 2002

30. 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

31. Davy DT: Biomechanical issues in bone transplantation. *Orthop Clin North Am*. 30(4):553-63, 1999

32. 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

33. 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

34. Edwards JT, Diegmann MH, Scarborough NL: Osteoinduction of human demineralized bone: characterization in a rat model. *Clin Orthop Relat Res*. (357):219-228, 1998

35. Erices A, Conget P, Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*. 109(1):235-242, 2000

36. 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

37. Frame JW: A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 38(3):176-180, 1980
38. Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol.* 16(3):381-390, 1966
39. 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
40. 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
41. Han DK, Kim CS, Jung UW, Chai JK, Choi SH, Kim CK, Cho KS: Effect of a fibrin-fibronectin sealing system as a carrier for recombinant human bone morphogenetic protein-4 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol.* 76(12):2216-2222, 2005
42. 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
43. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H: Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 87(7):1430-1437, 2005
44. 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

45. 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
46. Hornicek FJ, Woll JE, Kasprisin D, eds: *Standards for Tissue Banking*, 10th ed. McLean, VA: American Association of Tissue Banks, 2002
47. 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
48. Hyun SJ, Han DK, Choi SH, Chai JK, Cho KS, Kim CK, Kim CS: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects. *J Periodontol.* 76(10):1667-74, 2005
49. Im GI, Kim DY, Shin JH, Hyun CW, Cho WH: Repair of cartilage defect in the rabbit with cultured mesenchymal stem cells from bone marrow. *J Bone Joint Surg Br.* 83(2):289-294, 2001
50. Izawa H, Hachiya Y, Kawai T, Muramatsu K, Narita Y, Ban N, Yoshizawa H: The effect of heat-treated human bone morphogenetic protein on clinical implantation. *Clin Orthop Relat Res.*(390):252-258, 2001
51. 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

52. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D: Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 46(12):3349-3360, 2002
53. Jortikka L, Laitinen M, Wiklund J, Lindholm TS, Marttinen A: Use of myoblasts in assaying the osteoinductivity of bone morphogenetic proteins. *Life Sci.* 62(26):2359-2368, 1998;
54. Junueira LC., Carneiro J: *Basic Histology* 10th ed. Lange 2003, s:141-154
55. Khan SN, Sandhu HS, Parvataneni HK, Girardi FP, Cammisa FP Jr: Bone graft substitutes in spine surgery. *Bull Hosp Jt Dis.* 59(1):5-10, 2000
56. Kierszenbaum A.L: *Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş.* Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık 2006, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, sayfa 118.
57. 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
58. 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

59. Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME: Long-term healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. *Clin Orthop Relat Res.* (318):222-230, 1995

60. 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 critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res.* 49(3):328-337, 2000

61. Ladd AL, Pliam NB: Use of bone-graft substitutes in distal radius fractures. *J Am Acad Orthop Surg.* 7(5):279-290, 1999

62. 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

63. Leslie P. Gartner, James L. Hiatt: *Color textbook of Histology.* 2th edition, W.B Saunders company 2001, page:129-155

64. Louisia S, Stromboni M, Meunier A, Sedel L, Petite H: Coral grafting supplemented with bone marrow. *J Bone Joint Surg Br.* 81(4):719-724, 1999

65. Ludwig SC, Boden SD: Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: a basic science summary. *Orthop Clin North Am.* Oct;30(4):635-45. 1999

66. Maddox E, Zhan M, Mundy GR, Drohan WN, Burgess WH: Optimizing human demineralized bone matrix for clinical application. *Tissue Eng.* 6(4):441-448, 2000
67. 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
68. 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
69. Martin GJ Jr, Boden SD, Titus L, Scarborough NL: New formulations of demineralized bone matrix as a more effective graft alternative in experimental posterolateral lumbar spine arthrodesis. *Spine.* 24(7):637-645, 1999
70. 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
71. 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
72. Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP: Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48(12):3464-3474, 2003

- 73.** Muschler GF, Nitto H, Matsukura Y, Boehm C, Valdevit A, Kambic H, Davros W, Powell K, Easley K: Spine fusion using cell matrix composites enriched in bone marrow-derived cells. *Clin Orthop Relat Res.* (407):102-118, 2003
- 74.** 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
- 75.** Oshima Y, Watanabe N, Matsuda K, Takai S, Kawata M, Kubo T: Behavior of transplanted bone marrow-derived GFP mesenchymal cells in osteochondral defect as a simulation of autologous transplantation. *J Histochem Cytochem.* 53(2):207-216, 2005
- 76.** 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
- 77.** 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
- 78.** Ozerdem OR, Anlatıcı 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

79. Ozturk A, Yetkin H, Memis L, Cila E, Bolukbasi S, Gemalmaz C: Demineralized bone matrix and hydroxyapatite/tri-calcium phosphate mixture for bone healing in rats. *Int Orthop.* 30(3):147-152, 2006
80. Pang EK, Im SU, Kim CS, Choi SH, Chai JK, Kim CK, Han SB, Cho KS: Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-4 dose on bone formation in a rat calvarial defect model. *J Periodontol.* 75(10):1364-1370, 2004
81. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, Lieberman JR: Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue Eng.* 11(1-2):120-129, 2005
82. 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
83. Pountos I, Giannoudis PV: Biology of mesenchymal stem cells. *Injury.* 36 Suppl 3:S8-S12, 2005
84. Pryor ME, Polimeni G, Koo KT, Hartman MJ, Gross H, April M, Safadi FF, Wikesjo UM: Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *J Clin Periodontol.* 32(9):966-972, 2005
85. 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

86. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutevov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M: Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med.* 344(5):385-386, 2001
87. Reddi AH, Anderson WA: Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification hemopoiesis. *J Cell Biol.* 69(3):557-572, 1976
88. Reddi AH: Bone morphogenetic proteins: from basic science to clinical applications. *J Bone Joint Surg Am.* 83-A Suppl 1(Pt 1):S1-6, 2001
89. Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* (205):299-308, 1986
90. 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.*
91. 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
92. 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
93. 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

- 94.** Skowronski PP, An YH: Bone graft materials in orthopaedics. *Musc Orthopaed J* 6:58–66, 2003;
- 95.** Song L, Tuan RS: Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 18(9):980-982, 2004
- 96.** Swenson CL, Arnoczky SP: Demineralization for inactivation of infectious retrovirus in systemically infected cortical bone: in vitro and in vivo experimental studies. *J Bone Joint Surg Am.* 85-A(2):323-332, 2003
- 97.** 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
- 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.** Turonis JW, McPherson JC 3rd, Cuenin MF, Hokett SD, Peacock ME, Sharawy M: The effect of residual calcium in decalcified freeze-dried bone allograft in a critical-sized defect in the *Rattus norvegicus* calvarium. *J Oral Implantol.* 32(2):55-62, 2006
- 100.** Urist MR. Bone: Formation by autoinduction. *Science* 150:893–899, 1965
- 101.** Virchow R: Cellular pathology. London: John Churchill, 1863.
- 102.** 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

- 103.** Wang JC, Davies M, Kanim LEA, Ukatu CJ, Dawson EG, Lieberman JR: Prospective comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion. Paper presented at: Annual Meeting of the North American Spine Society; New Orleans, LA. October 2000
- 104.** Winn SR, Uludag H, Hollinger JO: Carrier systems for bone morphogenetic proteins. Clin Orthop Relat Res. (367 Suppl):S95-106, 1999
- 105.** Wlodarski KH, Reddi AH: Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. Calcif Tissue Int. 39(6):382-385, 1986
- 106.** 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
- 107.** Yanai T, Ishii T, Chang F, Ochiai N: Repair of large full-thickness articular cartilage defects in the rabbit: the effects of joint distraction and autologous bone-marrow-derived mesenchymal cell transplantation. J Bone Joint Surg Br. 87(5):721-729, 2005
- 108.** 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
- 109.** Zhang M, Powers RM Jr, Wolfinbarger L Jr: A quantitative assessment of osteoinductivity of human demineralized bonematrix. J Periodontol. 68(11):1076-1084, 1997