

**T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**RAT KALVARYUMUNDA OLUŞTURULAN KRİTİK BOYUT DEFEKTLERİNDE  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ, BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT SERAMİKLERİ VE  
TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK  
ARAŞTIRILMASI**

**Doktora Tezi  
Dt. Kamil Serkan AĞAÇAYAK**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN**

**AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**

**2011**

T.C.  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

RAT KALVARYUMUNDA OLUŞTURULAN KRİTİK BOYUT DEFEKTLERİNDE  
MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİ, BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT SERAMİKLERİ  
VE TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE  
ETKİLERİNİN HİSTOLOJİK VE İMMUNOHİSTOKİMYASAL OLARAK  
ARAŞTIRILMASI

Doktora Tezi  
Dt. Kamil Serkan AĞAÇAYAK

DANIŞMAN  
Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN

AĞIZ-DİŞ-ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

DİYARBAKIR

2011

Bu doktora tezi Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğünce  
desteklenmiştir.  
Proje No: 09-DH-07

T.C  
DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
MÜDÜRLÜĞÜ

“Rat Kalvaryumunda Oluşturulan Kritik Boyut Defektlerinde Mezenkimal Kök Hücreleri, Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri Ve Trombositten Zengin Plazmanın Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkilerinin Histolojik Ve İmmunohistokimyasal Olarak Araştırılması” isimli Doktora Tezi 04.01.2011 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN  
Tezi Teslim Eden : Dt. Kamil Serkan AĞAÇAYAK

Jüri Üyesinin Ünvanı Adı Soyadı

Başkan : Prof.Dr.Behçet EROL

Üye : Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN

Üye : Prof.Dr.Hülya KOÇAK BERBEROĞLU

Üye : Doç.Dr.Rezzan GÜNER

Üye : Doç.Dr.Sema ÇELENK

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

04/01/2011

Prof. Dr. Salih HOŞOĞLU  
Dicle Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince derin bilgilerinden istifade ettiğim, alçak gönüllü, hiç bitmeyen çalışma azmi ve her türlü desteği ile sürekli yanımda olan değerli hocam, danışmanım Prof. Dr. Belgin GÜLSÜN'e, cerrahi branşı tercih etmemde büyük katkıları olan ve eğitimimde yardımını esirgemeyen, derin bilgilerinden istifade ettiğim değerli hocam Prof. Dr. Behçet EROL'a, bölümümdeki diğer hocalarıma ve birçok paylaşımda bulunduğum tüm asistan arkadaşlarıma, çalışmamın mezenkimal kök hücre elde etme aşamalarında büyük desteğini gördüğüm Prof. Dr. Erdal KARAÖZ'e, uygun laboratuvar koşulları sağlamamız için yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Muzaffer TAŞ'a, çalışmamın histoloji kısmında yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Yusuf NERGİZ ve Arş. Gör. Selçuk TUNİK'e, istatistiksel çalışmalarda yardım eden Yrd. Doç. Dr. Yılmaz PALANCI'ya , desteğini her zaman arkamda hissettiğim ailem ve sevgili eşim Dr. Elif AĞAÇAYAK' a çok teşekkür ederim.

**Kamil Serkan AĞAÇAYAK**

**İÇİNDEKİLER****ÖN SAYFALAR**

KAPAK

İÇ KAPAK

ONAY SAYFASI.....I

TEŞEKKÜR.....II

İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....III

RESİMLER DİZİNİ..... IV

TABLOLAR DİZİNİ..... VII

ŞEKİLLER VE GRAFİKLER DİZİNİ.....VIII

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....IX

**ÖZET SAYFALARI**

TÜRKÇE ÖZET.....XI

SUMMARY.....XIII

**TEZ METNİ**

GİRİŞ VE AMAÇ.....1

GENEL BİLGİLER.....3

GEREÇ VE YÖNTEM.....50

BULGULAR.....69

TARTIŞMA.....110

SONUÇLAR.....133

KAYNAKLAR.....137

ÖZGEÇMİŞ.....159

## RESİMLER

- Resim 1** : Mezenkimal Kök Hücre elde etmek için eksize edilmiş rat femur ve tibiası görünümü.
- Resim 2A** : DMEM solüsyonu içindeki kemik iliği parçalarının görünümü.
- Resim 2B** : Santrifüj sonrası en üstte plazma ve ortada mononükleer hücrelerin kümeleşmesi.
- Resim 2C** : Ficoll'un uzaklaştırılmasından sonra elde edilen hücre peletinin görünümü.
- Resim 3** : 10 ml komplet medium içeren 25 ml'lik flaskın görünümü.
- Resim 4** : Flaska yapışan mezenkimal kök hücrelerin Inverted mikroskopta görünümü.
- Resim 5A** : Hücre süspansiyonunun 800 G'de 10 dakika süreyle santrifüj sonrası görünümü.
- Resim 5B** : Mezenkimal kök hücrelerin insülin iğnelere konularak kullanıma hazır hale getirilmiş görünümü.
- Resim 6** : Sodyum sitrat tüpündeki rat kanı.
- Resim 7** : Santrifüj cihazı.
- Resim 8** : Santrifüj işlemi.
- Resim 9** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft materyalinin görünümü.
- Resim 10** : Her grupta anestezi sağlandıktan sonra enseden altına kadar traşlanan ratın, çalışma masasına sabitlenmiş görünümü.
- Resim 11** : %10'luk 'povidon iodine' solüsyonu ile cerrahi alanın antisepsisinin sağlanmış görünümü.
- Resim 12** : Orta hat longitudinal bir deri insizyonu yapılarak frontal kemiğin ortaya çıkartılmış görünümü.
- Resim 13 A** : 7 mm çapında özel olarak tasarlanmış trephen frez.
- Resim 13 B** : Trephen frez takılmış anguldurva görünümü.
- Resim 14** : 7 mm çapında dairesel tam kat kemik kesisinin görünümü.
- Resim 15** : Dura korunarak oluşturulmuş, dairesel tam kat kemik defektinin görünümü.

- Resim 16** : İşlem sonunda 6/0 Vicryl® ile dikilen periost dokusunun görünümü.
- Resim 17** : Cilt insizyonunun 5/0 ipek suturele kapatılmış görünümü.
- Resim 18** : Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri ile doldurulmuş kemik defektinin görünümü.
- Resim 19** : TZP'nın insülin enjektörü yardımı ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verilmesi.
- Resim 20** : Mezenkimal kök hücrelerin insülin enjektörü ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verilmesi.
- Resim 21** : Kontrol grubunun 2. hafta histolojik görünümü.
- Resim 22** : Kontrol grubunun 2. hafta İmmünohistokimyasal görünümü.
- Resim 23** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 2. hafta görünümü.
- Resim 24** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 25** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 2. hafta histolojik görünümü.
- Resim 26** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 27** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta histolojik görünümü.
- Resim 28** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 29** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta histolojik görünümü.
- Resim 30** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 31** : Kontrol grubu 8. hafta histolojik görünümü.
- Resim 32** : Kontrol grubunun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü.

- Resim 33** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü.
- Resim 34** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 35** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft ve TZP uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü.
- Resim 36** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft ve TZP uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 37** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü.
- Resim 38** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 39** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü.
- Resim 40** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 41** : Kontrol grubunun 12. hafta histolojik görünümü.
- Resim 42** : Kontrol grubunun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 43** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü.
- Resim 44** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 45** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü.
- Resim 46** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 47** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü.



- Resim 48** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü.
- Resim 49** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü.
- Resim 50** : Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü.

**TABLolar**

**Tablo 1:** Kemik iyileşmesinde etkili büyüme faktörlerinin çeşitli çalışmalardan derlenmiş yorumları.

**Tablo 2:** Kemik greftlerinin özellikleri ve çeşitli yönlerden kıyaslanmaları.

**Tablo 3:** Mezenkimal kök hücrelerin terapotik kullanımını destekleyen deneysel ve klinik yayınların derlemesi.

**Tablo 4:** Deney gruplarındaki denek sayıları ve toplam denek sayısına oranları.

**Tablo 5:** Haftalara göre denek sayıları ve toplama oranları.

**Tablo 6:** Osteopontin ile boyanan hücrelerin derecelenmesi.

**Tablo 7:** Haftalara göre osteopontin ile boyanan denek sayıları ve oranları.

**Tablo 8:** Grupların osteopontin boyama pozitifliğine göre ikili kıyaslamaları.

**Tablo 9:** Osteonektin ile boyanan hücre derecelenmesi.

**Tablo 10:** Deney gruplarının osteonektin ile boyanmasının süre ile değişimi.

**Tablo 11:** Grupların osteonektin boyama durumlarına göre kıyaslanmaları.

**Tablo 12:** Osteosit yoğunluğunun kontrol grubuna göre derecelendirilmesi.

**Tablo 13:** Osteosit yoğunluğu derecelendirilmesinin toplam kesit sayısına göre dağılımı.

**Tablo 14:** Haftalara göre osteosit yoğunluğu derecelendirilmesinin toplam kesit sayısına göre dağılımı.

## ŞEKİLLER

**Şekil 1:** Osteoblastların periosteum altında çizgisel olarak dizilimi.

**Şekil 2:** Kansellöz kemiğin morfolojik yapısı.

**Şekil 3:** İntramembranöz kemikleşme.

**Şekil 4:** Kortikal kemiklerde kemik iyileşme süreci.

**Şekil 5:** Sıçan kafatasının yukarıdan görünümü.

## GRAFİKLER

**Grafik 1:** Bütün gruplarda haftalara göre osteopontin ekspresyonu yüzde oranının kıyaslaması.

**Grafik 2:** Bütün gruplarda haftalara göre osteonektin ekspresyonu yüzde oranının kıyaslaması.

**Grafik 3:** 2., 8. ve 12. haftalarda osteosit yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması.

**Grafik 4:** Gruplara göre %30'dan fazla osteosit yoğunluğu derecelendirilmesi verilerinin çizgisel grafikte dağılımı.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

TZP	: Trombosit zengin plazma
PRP	: Platelet rich plasma
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
TGF $\alpha$ ve $\beta$	:Transforming büyüme faktörü $\alpha$ ve $\beta$
EGF	:Epidermal büyüme faktörü
FGF	:Fibroblast büyüme faktörü
IGF	:İnsülin benzeri büyüme faktörü
CaP	: Kalsiyumfosfat
$C_6H_5O_7^{-4}$	:Sitrat
$CO_3^{-2}$	:Karbonat
$F^-$	:Florür
$OH^-$	:Hidroksil
BCP	:Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri
CHA	:Karbonat-hidroksilapatitin
$H_2O$	:Su
GAG	:Glikozaminoglikanları
KMP	:Kemik morfojenik protein
$\beta$ (TGF- $\beta$ )	:Transforming büyüme faktörü
IGF-I	:İnsülin benzeri büyüme faktörü-I
IGF-II	:İnsülin benzeri büyüme faktörü-II
PDGF	:Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PDAF	: Platelet-derived angiogenesis factor(trombosit kaynaklı anjiogenezis faktör)
OPGL	:Osteoprotegrin ligandı
cAMP	:Siklik adenzin fosfat
$H_2CO_3$	:Karbonik asit
$HCO_3^-$	:Bikarbonat
BMP	:Bone morphogenetic protein
DBM	:Demineralize Kemik Matriksi
$\beta$ TCP	: $\beta$ -trikalsiyum fosfat

HA	: Hidroksilapatit- $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
IBS	: Enjektabl kemik seramikler
EKH	: Embriyonik kök hücreler
YKH	: Yetişkin/somatik kök hücreler
HKH	: Hematopoetik kök hücreler
MYPH	: Multipotent yetişkin progenitör hücre
TBT	: Topikal bovin trombin
MKH	: Mezenkimal kök hücreler
DMEM	: Dulbeccosminimum essential medium
FBS	: Fetal bovine serum
PBS	: Phosphate-buffer-saline
TFP	: Trombositten fakir plazma
$\beta$ -TCP	: $\beta$ -Trikalsiyum fosfat
ONC	: Osteonectin
OPN	: Osteopontin
FD	: Fibröz doku
BD	: Bağ doku
OA	: Osteoblastik aktivite
İK	: İkincil kemik trabekülleri
DKKA	: Dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogreftleri
BPKA	: Bovin poröz kemik allogrefti
DKMK	: Dondurulmuş-kurutulmuş mineralize kemik
DKDK	: Dondurulmuş-kurutulmuş demineralize kemik
INR	: International Normalized Ratio
YDR	: Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu
TKBF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PCBM	: Partiküler kansellöz kemik ve kemik iliği
KMKH	: Kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler
$\beta$ -TKF	: $\beta$ -trikalsiyum fosfat seramikler
BPKA	: Bovin poröz kemik allogrefti
$\mu\text{m}$	: Mikrometre
p	: İstatistiksel anlamlılık

## ÖZET

Günümüzde yeni teknolojilerin gelişmesiyle, kemik defektlerinin onarılmasında birçok yeni tedavi metodları ve biyomateryaller kullanılmaktadır. Malformasyon, enfeksiyon, travma veya rezeksiyon nedeniyle oluşan oral ve maksillofasiyal bölgedeki kemik defektlerinin yapısal ve fonksiyonel rekonstrüksiyon problemleri, henüz tatmin edici bir Resimde çözümlenememiş olup, modern rekonstrüktif cerrahinin en zor uğraşlarından biri olarak karşımıza çıkmaktadır. Geniş kemik defektlerinin iyileşmesi amacıyla, çeşitli kemik greftlerinin veya kemik yerine geçen biyomateryallerin kullanımı bazen kaçınılmazdır.

Bu tez çalışmasındaki amacımız; oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftlerinden bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, trombositten zengin plazma ve son yıllarda kullanılmaya başlanılan mezenkimal kök hücrelerin osteogenezis üzerine olan etkileriyle beraber, bu materyallerin osteonektin ve osteopontin enzim ekspresyonları ile osteosit yoğunluklarını karşılaştırmaktır.

Çalışmamızda son yıllarda giderek artan bir merak uyandıran mezenkimal kök hücrelerin, trombositten zengin plazmanın ve bifazik kalsiyum fosfat seramiklerin, ratların kritik boyut kranial kemik defektlerindeki etkinliği araştırıldı. Bu araştırmada 90 adet Wistar-Albino türü dişi rat kullanılması planlandı. 10 adet rat trombositten zengin plazma elde etmek için kullanıldı. Geriye kalan ratlar beş gruba ayrıldı. Her bir ratın frontal kemiğinde 7 mm çaplı kritik büyüklükte tam kat kemik defekti oluşturuldu. Grup I (n=6) operatif kontrol grubu iken, Grup II'de (n=21) bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, Grup III'de (n=21) bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve trombositten zengin plazma, Grup IV'de (n=21) mezenkimal kök hücre ve bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti kombinasyonu ve Grup V'de (n=21) mezenkimal kök hücre, trombositten zengin plazma ve bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti kombinasyonu defektlere uygulandı. Deneklerin tamamı 2., 8. ve 12. hafta sonunda sakrifiye edildi. Histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirmede, gruplar arasında osteoblastik aktivite ve osteogenezis

paternleri dikkate alınmıştır. Bunun yanısıra osteopontin ve osteonektin enzim ekspresyon oranları ile osteosit yoğunluklarının oranları incelenmiş ve gruplar arası kıyaslamaları istatistiksel olarak yapılmıştır.

Yapılan çalışmanın sonucunda; araştırmanın 12. haftasında osteoblastik aktivite ve osteogenezisin daha ideal olduğu, osteogenezise bağlı olarak osteopontin ve osteonektin ile boyanmaya pozitif yanıt verdiği saptanmıştır. En ideal osteogenezisi oluşturan grubun Greft+Trombositten zengin plazma+Mezenkimal kök hücre grubunun olduğu, bunu sırasıyla Greft+ Mezenkimal kök hücre uygulanan grubunun, Greft+ Trombositten zengin plazma grubunun ve son olarakta yalnızca Greft uygulanan grubun izlediği gözlenmiştir.

Gruplararası yapılan kıyaslamalarda da, istatistiksel olarak en anlamlı sonucu veren grupların Greft+ Trombositten zengin plazma + Mezenkimal kök hücre ile yalnız greft grubu ( $p=0,005$ ), Greft+ Mezenkimal kök hücre ile yalnız greft grubu ( $p=0,028$ ), Greft+ Trombositten Zengin Plazma ile Greft+ Trombositten zengin plazma + Mezenkimal kök hücre ( $p=0,031$ ) grupları arasında olduğu saptanmıştır.

Osteokondüktif etkili grefte Trombositten zengin plazma ve Mezenkimal kök hücre ilavesiyle kritik boyut defektlerinde bile önemli bir kemik yapımının olduğu ve osteoindüksiyonun sağlandığı izlenmiştir. Greft+Trombositten zengin plazma+Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun osteogenezisi 2 kat artırması da önemli bir bulgu olup, ideal bir materyalin elde edilmesi hedefine yaklaşıldığı kanısı uyanmıştır.

**Anahtar sözcükler:** Mezenkimal kök hücre, trombositten zengin plazma, bifazik kalsiyum fosfat, osteogenezis, kritik boyut kemik defekti

## SUMMARY

According to the new technological developments, many new treatment methods and biomaterials are used to restore the bone defects. In oral and maxillofacial region; due to malformation, infection, trauma or resection; structural and functional reconstruction problems of bone defects are not satisfactorily dissolved and this can be faced as the most difficult problem in contemporary reconstructive surgery. In some cases, it is inevitable to use bone grafts and biomaterials in order to heal extensive bone defects.

In this study, our aim is to investigate the effects of biomaterials (such as biphasic calcium phosphate, platelet rich plasma and mesenchymal stem cell) used in oral and maxillofacial surgery on osteogenesis and to compare these materials in terms of osteonectin / osteopontin enzyme expression and effects on osteocyte density.

In our study the effectiveness of the mesenchymal stem cells, platelet rich plasma and biphasic calcium phosphate which has avoked a curiosity recently, was investigated in critical size cranial defects of rats.

This study was planned on ninety wistar female rats. Ten rats were used to obtain platelet rich plasma. The remainders were separated into five groups. A full thickness circular bone defect (7 mm in critical size) was created in the frontal bone of each rat. Group I (n=6) was operative control group. In Group II (n=21) biphasic calcium phosphate, in Group III (n=21) biphasic calcium phosphate and platelet rich plasma combination, in Group IV (n=21) biphasic calcium phosphate and mesenchymal stem cell combination, in Group V (n=21) biphasic calcium phosphate , platelet rich plasma and mesenchymal stem cell combination were applied into the defects. At the end of the 2th, 8th and 12th week, all of the rats were sacrificed. In histologic and immunohistochemical evaluation among groups, osteoblastic activity and osteogenesis patterns are considered. Additionally osteopontin and osteonectin enzyme expression level and osteocyt density are evaluated statistically and compared.



At the conclusion of the study, osteoblastic activity and osteogenesis are ideally occurred in the 12th week. Therefore prepartate were painted positively with osteonectin and osteopontin. Graft+Platelet rich plasma+Mesenchymal stem cell group was the most effective in inducing new bone formation (osteogenesis). This group is followed by Graft+ Platelet rich plasma and only Graft used group. Also regular bone formation and osteoinduction were detected, even in a critical size defect, in the Graft+ Platelet rich plasma+Mesenchymal stem cell group.

Higher level of osteogenesis (two times greater than other groups) is a significant finding that avokes the thought of an ideal reconstruction material for critical size defect is Graft+ Platelet rich plasma+Mesenchymal stem cell combination.

Statistically the significant result of group comparison was obtained from Graft+ Platelet rich plasma+Mesenchymal stem cell, 2nd only Graft group ( $p=0,005$ ), Graft+Mesenchymal stem cell and only graft group ( $p=0,028$ ), Graft+ Platelet rich plasma and Graft+ Platelet rich plasma+Mesenchymal stem cell groups ( $p=0,031$ ).

**Key Words:** Mesenchymal stem cell, platelet rich plasma, biphasic calcium phosphate, osteogenesis, critical size bone defect

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Konjenital, travmatik nedenler veya bazı cerrahi müdahaleler sonucu gelişen maksillofasiyal bölgedeki kemik defektleri, fonksiyonel ve estetik nedenlerden dolayı rekonstrüksiyona ihtiyaç gösterirler. Otojen, allojen ve ksenojenik kemik greftleri ile alloplastik kemik yapıları klinik rekonstrüksiyonlarda sıklıkla kullanılmaktadırlar.

Bunlardan otojen vaskülarize kemik greftleri, günümüzde belirgin osteojenik potansiyelleri ve enfeksiyona karşı güçlü dirençlerinden dolayı günümüzde "altın standart" olarak kabul edilmektedir.

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu amacıyla kullanılan greftlerin, osteojenik aktivitelerinin olması ve kemik rejenerasyonu ile tamirini stimüle edici özelliklerinin bulunması tercih edilir. Bu amaçla kullanılan hidroksilapatitler, trikalsiyum fosfatlar ve bunların farklı kombinasyonlarının ogmentasyon prosedürlerinde önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Bu gibi materyaller, büyük kemik defektlerinde yapısal desteğe ihtiyaç duyulduğunda önem kazanırlar.

Bunun yanısıra kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücreler multipotansiyel hücreler olmalarından dolayı, rekonstrüktif cerrahide kullanılması yönünde çeşitli araştırmalar mevcuttur. Son yıllarda kendini yenileme, sınırsız bölünme, birçok hücre tipi veya dokuya farklılaşabilme kapasitesine sahip hücre topluluğu olan kök hücreleri üzerinde, önemli çalışmalar başlatılmıştır. Elde edilen bilgilerin artmasıyla birlikte, yeni ilaç ve toksinlerin araştırılmasında da bu hücrelerden yararlanılmaktadır. Kök hücreler uzun süre kendini yenileyebilme kapasitesine sahip ve dokulardaki öncü hücrelere farklılaşabilme özelliği olan hücrelerdir.

Günümüzde kök hücreleri; diyabet, parkinson hastalığı, konjestif kalp hastalığı, kemik hastalıkları, karaciğer yetmezliği gibi birçok durumda kullanılırken, fibroblast büyüme faktörü varlığında kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerinin yüksek oranda osteojenik, kondrojenik ve adipojenik serilere farklılaştığı bilinmektedir. Kemikler, bu hücrelerin biyolojik destek yapılarının içine lokal olarak verilmesiyle tedavi edilmektedir.

Mezenkimal kök hücreleri, çeşitli alloplastik materyallerle kombine edilerek, elde edilen karışımın kemik defektlerinde yeni kemik oluşumuna etkileri üzerine literatürde giderek artan çalışmaların başladığı dikkat çekmektedir.

Otojen kan plazmasının santrifüje edilerek elde edilen trombositten zengin plazma ise; yeni kemik formasyonunu hızlandırma, stimüle etme ve yumuşak doku iyileşmesini sağlamada büyüme faktörü olarak kullanılmaktadır.

Çalışmamızda, kök hücre teknolojisi ile elde edilen mezenkimal kök hücreleri, bifazik kalsiyum fosfat seramikleri ve trombositten zengin plazma kullanılarak, bu materyallerin ve hücrelerin kemik defektinde osteogenezis üzerine etkilerinin histolojik ve immunohistokimyasal olarak araştırılması hedeflenmiştir.

## 2.GENEL BİLGİLER

Maksillofasiyal bölge, vücudun en önemli sistemlerinden biri olan sindirim sisteminin başlangıcıdır. Çiğneme, konuşma, yutkunma, tad ve soluk almada rol oynayan bölge, önemli duyuları içeren bir yapıdır. Bu yapı deri, mukoza, bağ dokusu gibi yumuşak doku tabakaları ile dişler ve destek kemik dokularından oluşur.

Çene ve yüz bölgesi kemiklerini ilgilendiren defektlerin etyolojisinde enfeksiyöz, inflamatuvar, kistik ve neoplastik nedenlerle ortaya çıkan patolojik durumlar, travma ve konjenital deformiteler sayılabilir. Maksillofasiyal cerrahide, tedavi amacıyla yapılan müdahalelerin sonunda da fiziksel yaralanmalar meydana gelebilir. Oluşan bu defektler sert ve/veya yumuşak dokuları kapsayabilir. Çeşitli etyolojilerle meydana gelen defektlerin hızla ve anatomik forma en uygun şekilde onarımı gerekir. Kemik yapı defektleri büyüklüğüne, şekline, lokalizasyonuna ve miktarına göre farklı tedavi planlaması gerektirirler. Defektin tam olarak onarımını sağlayacak uygun tedavi planlamasının ve kullanılacak materyalin seçimi, cerrah tarafından çok dikkatli yapılmalıdır<sup>1-3</sup>.

Uzun yıllardan beri farklı uzmanlık dallarından çeşitli araştırmacılar, oluşan kemik defektinin onarımında yeni kemik yapımını stimüle edebilecek nitelikte olan greftler ve biyomateryaller üzerinde çalışmaktadırlar. Kemik iyileşmesinde temel amaç, kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşmeyi sağlamaktır. Uygun büyüklükte kemik defektlerinde bunu sağlamak mümkün olsa da; farklı vücut bölgelerinde, belirli bir büyüklüğün üzerindeki kemik defektleri kendiliğinden iyileşememekte ve rekonstrüktif cerrahiye ihtiyaç göstermektedirler<sup>4-6</sup>.

Sorunsuz ve hızlı bir iyileşme sağlayabilmek ve istenmeyen etkilerin oluşmasını engellemek amacı ile greft materyalleri kullanılarak birçok deneysel ve klinik çalışmalar yapılmış ve halen de yoğun biçimde yapılmaktadır. Kemiksel iyileşmeyi olumlu etkileyebileceği düşünülen materyaller yalın ve kombine halde kullanılmakta ve kıyaslamalı çalışmaları devam etmektedir<sup>7,8</sup>.

Rekonstrüktif cerrahide; örneğin kist ve tümör kavitelerinin onarımında, alveoler kret defektlerinde, fasiyal kemiklerin ogmentasyon işlemlerinde, damak yarıklarının greftlenmesinde, sinüs tabanı ogmentasyonunda çeşitli otojen, allojen ve alloplastik kemik greftleri kullanılmaktadır. Bu materyallerin kendilerine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Bu tür defektler için altın, gümüş gibi metaller, ksenogreftler, allogreftler ve otogreftler uzun yıllardan beri kullanılmaktadır. Teknolojinin gelişmesiyle alloplastik materyaller de bu tür defektlerde sıkça kullanılır hale gelmiştir. Ancak bu tür seçeneklerin rezorbsiyon, enfeksiyon, doku reaksiyonu ve donör alan morbiditesi gibi dezavantajları vardır. Bu yan etkilerden kurtulabilmek, büyük kemik defektlerinin de kendiliğinden iyileşmesini sağlamak ya da yerleştirilen kemik greftlerinin bölgeye osseointegrasyonunu hızlandırmak amacı ile büyüme faktörlerinin kemik iyileşmesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Rekombinant teknolojisi ile elde edilen bu faktörlerin osteoindüktif etkisi ispatlanmış, ancak teknolojilerinin pahalı olması nedeniyle, kullanımını kliniğe yeterince yansımamıştır<sup>9-11</sup>.

Trombosit zengin plazma (TZP); vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), 'transforming' büyüme faktörü  $\alpha$  ve  $\beta$  (TGF  $\alpha$  ve  $\beta$ ), epidermal büyüme faktörü (EGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) vb büyüme faktörlerini içeren ve kanın farklı iki frekansta santrifüj edilmesiyle oluşan bir maddedir. Elde edilen plazmadaki trombosit miktarı normal plazmadakinin 3–5 katıdır. Bu ürüne, trombin ilavesiyle trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinden çok sayıda mediatör salınır. Bunların hemen hepsi kemik iyileşmesinde görev alan mediatörlerdir. Trombosit jel, platelet jel gibi farklı isimler de verilen TZP, teorik olarak yukarıdaki faktörleri içerdiği göz önüne alındığında önemli bir üründür. Bunun yanında otolog olarak üretilebiliyor olması, son on yılda özellikle kemik iyileşmesinde klinik kullanım alanı bulmasına sebep olmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda yara ve kemik iyileşmesini hızlandırdığı, şişliği, ağrıyı, enfeksiyonu ve skarı azalttığı, kanama kontrolünü sağladığı iddia edilmektedir<sup>12-18</sup>.

Mezenkimal kök hücreler ise; kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas gibi farklı mezenkimal dokulara 'in vitro' veya 'in vivo' olarak dönüşebilen multipotent hücrelerdir<sup>19</sup>. Bunlar kemik iliği hücrelerinin, yaklaşık % 0,01 ile % 0,001'ini oluşturur<sup>20</sup>. Cam ve plastiğe yapıştıkları için, hematopoetik kök hücrelerden kolaylıkla ayrılırlar<sup>21</sup>.

Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ, kas, deri gibi dokularda bulunurlar. MKH'ler, çok sayıda pasaj boyunca kültürde üretilebilmekte ve tek hücre düzeyinde osteoblastları, kondroblastları, adipositleri, fibroblastları ve iskelet myoblastlarını da içeren mezodermal hücrelere diferansiye olabilmektedirler<sup>22-24</sup>. 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<sup>25</sup>. Birçok araştırma, insan ve hayvan MKH'lerinin immün rejeksiyon yapan antijenler içermediği ve rejeksiyona sebep olmadığını bildirmektedir<sup>26,27</sup>. Bu hipotezi destekleyen deneysel çalışmalarda da, allojen MKH transplantasyonunun otojen transplantasyonlar kadar başarılı olduğu gösterilmiştir<sup>28</sup>. Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen keratinositlerin veya dermal fibroblastların yara iyileşmesinde, kondrositlerin kıkırdak iyileşmesinde, myositlerin myokard iyileşmesinde, retinal pigment epitel hücrelerinin yaşa bağlı maküler dejenerasyonda ve 'Shwann' hücrelerinin santral sinir sisteminin demiyelinizan hastalıklarının tedavisinde kullanımı araştırılmıştır<sup>20,23,29,31</sup>.

Mezenkimal kök hücreler bir matriks yardımı ile implant haline getirilip, hayvan modellerinde kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır<sup>20,30-33</sup>. Özellikle uzun kemiklerin kendiliğinden kapanmayan defektlerindeki kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini inceleyen araştırmalar vardır<sup>30,32</sup>. Mezenkimal kök hücrelerin, kraniyal kemikler gibi yassı kemikler üzerindeki etkinliğini inceleyen çok az çalışma vardır<sup>34</sup>.

Kemik defektlerinin onarımında kullanılan kemik greft materyalleri osteoindüktif veya osteokondüktif olabilir. Kemik dokusu; ekstrasellüler matriks proteinlerinin mineralizasyonunu içeren bir seri kompleks olaylar zinciri sonucu şekillenmektedir. Kalsiyum fosfat içerikli biyomateryaller; kemik

tamirinde, augmentasyonda veya kemiğin yerine geçebilen doldurucu madde olarak kullanılmaktadırlar. Mevcut CaP biyomateryalleri; orijinleri (doğal, yapay), kompozisyonları (hidroksilapatit, trikalsiyum fosfat ve bifazik kalsiyum fosfat), fiziksel formları (partiküler, blok, siman, polimer içerikli kompozit) ve fizikokimyasal özelliklerine göre farklılıklar gösterirler. Bu materyaller, içerikleri ve fiziksel özellikleriyle birbirinden ve de kemikten ayrılırlar<sup>35,36</sup>.

Hidroksilapatitler, kemiğin mineral yapısına benzerliği nedeniyle vücut tarafından kolayca kabul edilen, yüksek biyouyumluluğa sahip kalsiyum fosfat grubu bir implant materyalidir. Kemik; kollajen ana faz içerisinde HA kristalleriyle desteklenmiş kompozit bir yapıdır. Kemiğe sertliğini veren mineral, yaşam süresince kimyasal olarak sürekli değişim içerisinde. Canlının türüne, yaşına ve cinsiyetine bağlı olmakla beraber, kemik dokusu yaklaşık % 20 oranında matriksten (bunun % 90'ı kollajen, % 10'u diğer organik maddelerden), % 70'i minerallerden ve % 10'u da sudan oluşmaktadır. Kemikteki mineral, temel olarak HA'nin kristal yapısına benzeyen bir çeşit kalsiyum ve fosfat apatittir. Kemiğin mineral fazında mikroyapısal farklılıklarını oluşturan; sitrat ( $C_6H_5O_7^{-4}$ ), karbonat ( $CO_3^{-2}$ ), florür ( $F^-$ ) ve hidroksil ( $OH^-$ ) iyonları da bulunur<sup>37,38</sup>.

Hidroksilapatitin (kalsiyum fosfat bileşiği), kemiğin mineral bileşeni olduğu anlaşıldıktan sonra, dental, maksillofasial ve ortopedik cerrahide kemik greft materyali olarak geliştirilmeye başlanmıştır. Seramik kemik implantı olarak klinik ve deneysel çalışmalara en çok konu olmuş materyal olan hidroksilapatitin; blok, granül, non-poröz, poröz, rezorbe olabilen ve olmayan tipleri mevcuttur. Alveolar kenar augmentasyonu için blok ve parçalı formdaki HA'ler tercih edilirken, çekim sonrası alveolar kenar rezorbsiyonunu önlemek için de kök formundaki HA'ler kullanılmaktadır. Gözenekli ya da dens HA seramikler invivo olarak biyorezorbsiyon göstermediklerinden "kalıcı kemik implantlar" olarak değerlendirilirler. Ayrıca ortognatik ile kraniyofasiyal uygulamalarda yer tutucu olarak kullanılabilirler<sup>37</sup>.

Kalsiyum fosfat implant materyallerinin en temel kısıtlılığı, biyomekanik özelliğindedir. Birçok seramikler gibi bu materyaller de, kolay kırılabilen ve düşük sıkıştırılma resistansına sahip materyallerdir. Kalsiyum fosfat

biyomateryalleri; lokal veya sistemik toksisitesi, inflamatuvar veya yabancı cisim reaksiyonu olmayan ve direkt olarak kemik üzerine fikse edildiğinde kemik ile implant arasında fibröz dokunun oluşmadığı materyallerdir. Bu materyallerin osteogenezisi stimüle edebileceği düşünülmüş olmasına karşın, bu konuda yapılan araştırmalar kalsiyum fosfatın kemik oluşumunu indüklediğini, ancak sert doku gelişimine uygun olduklarını göstermektedir<sup>39</sup>.

Augmentasyon uygulamalarında blok formundaki HA'in kullanım ve stabilizasyon zorluğu nedeniyle partiküler HA'lerin kullanımı ön plana çıkmıştır. Ancak parçalı HA kullanıldığında ise, parçaların migrasyonu ve alveoler kenar üzerinde istenilen şekli koruyamamaları söz konusu olunca, HA'lerin, kollojenler, jelatinler ve fibrin yapıştırıcılar gibi materyallerle birlikte kullanılması gündeme gelmiştir.

CaP seramiklerinin ve diğer ilgili biyomateryallerin gelişimi, kemik greftlerinin rezorbsiyon ve kemiğin yerini tutma özelliklerinin daha iyi olmasını sağlamıştır. 1920–1975 arası yapılmış olan sınırlı bilimsel çalışmalar, TCP olarak tanımlanmış CaP materyallerinin, kemik defektlerinde yapımı başarılı olarak hızlandırdığını ve periodontal defektlerde de kullanımının uygun olduğunu vurgulamıştır<sup>40-42</sup>. Nery tarafından kullanılmış olan TCP, ileriki dönemlerde LeGeros tarafından %20  $\beta$ -TCP ve %80 HA içeren bir karışım olarak tanımlanmıştır<sup>43</sup>. Bu materyal ve diğer  $\beta$ -TCP/HA içerikli karışımlar sonraları, **“Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri (BCP)”** olarak adlandırılmıştır. Bifazik kalsiyum fosfatlar, saf HA'ten biyolojik olarak daha aktiftirler.

BCP'ların en büyük özelliği, konak kemik dokusuyla güçlü bir bağlanma yapması ve fibröz bir aralığın oluşumuna izin vermemeleridir. Dinamik bir özelliği olan bu yüzleşmenin (bağlanmanın) oluşumu, bir seri olayın gerçekleşmesiyle meydana gelmektedir<sup>44-47</sup>. Yani hücrelerle etkileşim ve erime/çökme işlemleri sonucu, kemik mineral maddesine çok benzeyen karbonat-hidroksilapatitin (CHA) oluşumudur.

$\beta$ -TCP seramiğinin biyoyoumlu, osteokondüktif, tamamen rezorbe olabilen bir materyal olarak kist kaviteilerinin doldurulmasında, periodontal



cerrahi ve implant cerrahisinde kullanımının başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir<sup>39</sup>.

## 2.1.KEMİK DOKUSU

Ossöz dokular, embriyolojik olarak mezenkimal hücrelerden encondral ya da membranöz kemikleşme yolu ile farklılaşan ve ekstrasellüler matriksi kalsifiye olan özel bir bağ dokusudur. Vücudun en sert yapısı olmasına karşın, kendi içerisinde dışarıdan gelen kuvvetlerle şekillenebilecek kadar dinamik bir dokudur. Kemiğe uygulanan basınç rezorbsiyona neden olurken, gerilim kuvveti yeni kemik oluşumuna yol açar<sup>48</sup>. Vücut kalsiyum depolarının % 99'unu içerisinde saklamakla kalmaz, içerdiği kemik iliği sayesinde hematopoetik bir organ gibi davranır<sup>49</sup>.

Kemik dokusu eklem içi sinoviyal yüzeyleri hariç, periosteum denen tabaka ile sarılıdır. Periosteum kendi içerisinde dışta yoğun fibröz bir bağ dokusu ve içte osteoprogenitör hücreler içeren hücresel bir tabakadan oluşmuştur<sup>48</sup>. Kemiklerin ortasındaki boşluk, osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlardan oluşan endosteum tabakası ile örtülüdür<sup>50-52</sup>.

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<sup>51,52</sup>.

## 2.1.1.KEMİK ANATOMİSİ VE HİSTOLOJİSİ

### A. KEMİK MATRİKSİ

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 fosfat esas olarak 'hidroksilapatit kristalleri' şeklinde bulunur. 40 nm uzunluk, 25 nm genişlik ve 1,5-3 nm kalınlıktaki hidroksilapatit kristalleri kollajen boşluklar arasında depolanırken, yüzey iyonları su (H<sub>2</sub>O) ile birleşir ve iyon alışverişini gerçekleştirir<sup>49</sup>. Kemik dokusunun sertliği, kollajen doku ile hidroksilapatit kristalleri arasındaki etkileşime bağlıdır. Eğer kemik dekalsifiye edilirse, orijinal şekli korumakla beraber kolay bükülebilir hale gelir<sup>48</sup>.

#### ➤ Organik matriks

Kemik kuru ağırlığının % 35'ini oluşturur. Organik komponentin % 90'ını tip I kollajen lifler yapar ve bunlar 67 nm aralıklarla yerleşmiş, 50-70 nm çapında çapraz bağlı liflerden oluşmuştur. Bunun yanında, kondrotin sülfat ve keratan sülfat gibi glikozaminoglikanları (GAG) içerir. Kemikteki glikoproteinler; hidroksilapatite bağlanan osteokalsin, osteoblast ve osteoklastların üzerindeki integrinler ve hidroksilapatite bağlanan osteopontinlerdir. Vitamin D, bu glikoproteinlerin sentezini artırır. Kemik sialoproteinini ise, osteoblast ve osteoklastların üzerindeki integrinlere bağlanarak, bu hücrelerin kemik matriksine tutunmasını sağlar. Eğer organik komponent uzaklaştırılırsa, orijinal şekli korumakla beraber kemik çok kolay kırılabilir bir hale gelir<sup>48, 49</sup>.

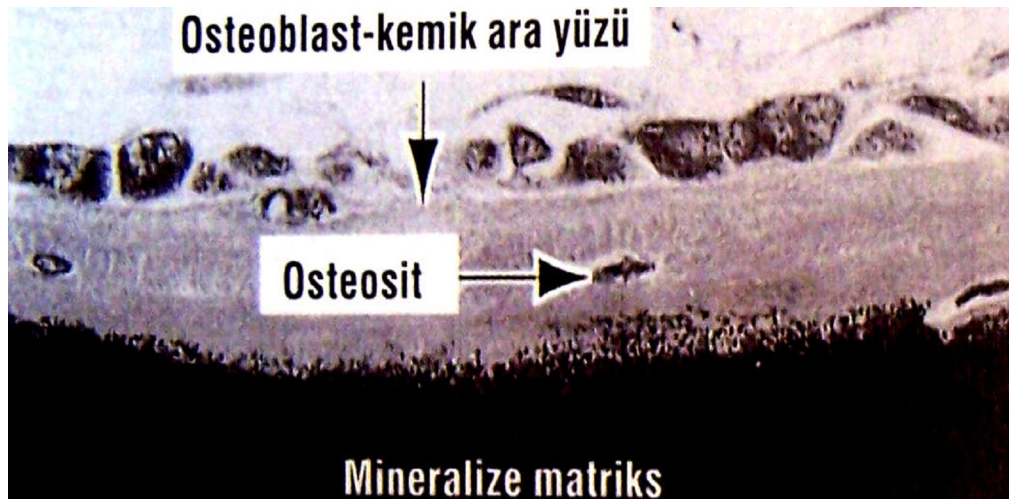
## B. KEMİK HÜCRELERİ

### a.Osteoprogenitör hücreler

Embriyonik mezenkimden köken alarak, kemik büyümesinde aktif rol oynarlar ve mitoz bölünme ile bölünerek osteoblastlara farklılaşabilirler. Bu hücreler periosteumun iç tarafında, haversian kanallarında ve endosteumda bulunurlar. Düşük oksijen konsantrasyonlarında kondrojenik hücrelere dönüşebilirler. İğsi şekilli ve soluk boyanan oval çekirdekleri vardır. Bu hücreler kemik büyümesinde aktif rol oynarlar<sup>53</sup>.

### b.Osteoblastlar

Osteoprogenitör hücrelerden köken alan bu hücreler; Tip 1 kollajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ile osteokalsin, osteonektin ve osteopontin gibi organik matriks bileşenlerinin sentezinden sorumludurlar. Ayrıca, kemik rejenerasyonunda önemli rol oynadıkları düşünülen, kemik morfojenik protein (KMP), transforming büyüme faktörü-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 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)<sup>9,10,11,51,53</sup>.



**Şekil 1:** Osteoblastların periosteum altında çizgisel olarak dizilimi (Kierszenbaum A.L. 2006)<sup>51</sup>.

Osteoblastlar kısa uzantılarla komşu osteoblastlara, ayrıca uzun uzantıları sayesinde ise osteositlere tutunurlar. Bu tutunmalar 'gap junction'lar aracılığı ile olur ve osteositlerle aralarındaki 'gap junction' miktarı, osteoblastlarla olduğundan daha fazladır. Osteoblastın etrafı, salgıladığı ekstrasellüler matriks ile çevrilince 'laküna' adı verilen boşlukta "osteosit" halini alır.

Ekstrasellüler matriks kalsifiye olduğunda, 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. Paratiroid hormon bu reseptöre bağlanınca, osteoprotegrin ligandı (OPGL) ve osteokalsin stimüle edici faktör salgılanır. Böylece aktive edilen osteoklastlar, kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirir. Ayrıca osteoblastlar, osteoidi parçalayan enzimi salgılayarak osteoklastın organik matriks ile ilişkisini sağlarlar<sup>54-57</sup>.

### **c.Osteositler**

Kalsifiye kemik matriksi içerisindeki lakünalarda bulunan ve osteoblastlardan farklılaşan matür kemik hücrelerdir. Her mm<sup>3</sup> kemik parçasında 20.000-30.000 kadar osteosit hücre bulunur<sup>53</sup>. Lakünalardan ışınal tarzda dağılan tünel benzeri kanalikül yapıları içerisinde, osteositin sitoplazmik uzantıları vardır. Bu uzantılarla ve komşu osteosit hücresi ile iyon ve küçük molekül alışverişine imkân sağlayan 'gap junction' lar oluştururlar<sup>58-60</sup>.

Kanalikül içinde ayrıca osteositi besleyen ekstrasellüler sıvı vardır. Bu hücrelerin çekirdekleri, yassılaştırmış 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<sup>58,59</sup>. Bu maddelerin salınması ile büyüme ve gelişme sırasında 'pre-osteoblastların', yeni kemik oluşumundaki yönlendirilmeleri yanısıra kemik kuvvetlerinin kemik şekli üzerindeki etkileri

sağlanır<sup>61</sup>. Bu olay sonunda erkek bireylerin 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<sup>2</sup> kadardır. 1,3 litredeki 20 gr'dan fazla hücre içi ve dışı yönünde değişebilen kalsiyum iyonu, yeterli kan kalsiyum seviyesini sağlar<sup>51,53</sup>. Bu hücreler, olgun kemikte en fazla bulunan hücre tipidir. Yaşlanmayla, östrojen hormonunun azalması ve glukokortikoid yapıda hormonların artması sonucu osteositlerin sayısı azalır<sup>62,63</sup>.

#### **d. Osteoklastlar**

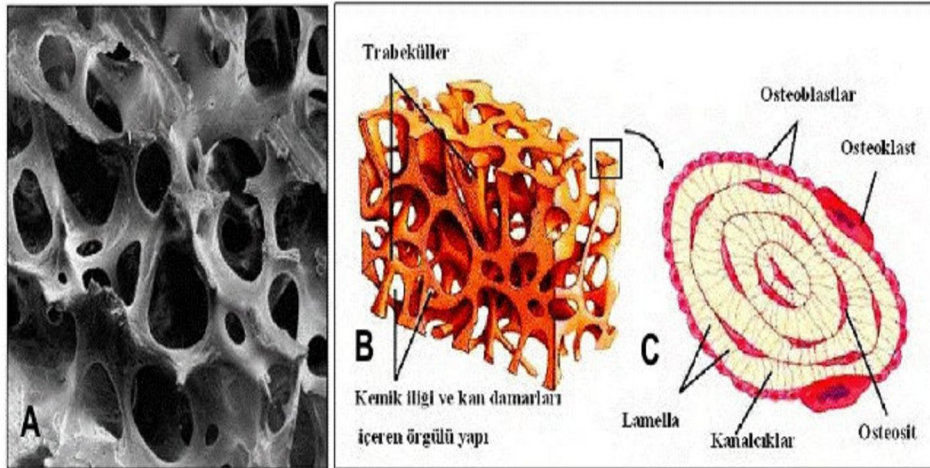
Osteoklastlar çok çekirdekli hücreler olup, kemik iliği granülosit-makrofaj öncül hücrelerinden köken alan ve kemik rezorbsiyonundan sorumlu olan hücrelerdir. Osteoklast stimüle edici faktör, koloni stimüle edici faktör-1, osteoprotegrin ve kalsitonin reseptörleri içerirler. Kemik rezorbsiyonundan sonra apoptozise uğrarlar. 150 µm çapında, 50 kadar çekirdekli, hareketli, asidofilik sitoplazmaları vardır. Granülosit-makrofaj öncül hücreleri koloni-stimüle edici faktörün etkisiyle ve mitoz bölünme 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 çukurcularda otururlar<sup>62-64</sup>. Bu lakünalar kemik rezorbsiyonunun olduğu bölgelerdir. Hücre içindeki karbonik anhidraz enzimi CO<sub>2</sub> ve H<sub>2</sub>O'dan karbonik asit (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) oluşturur. Karbonik asit hücre içerisinde proton (H<sup>+</sup>) ve bikarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) iyonuna dönüşür. Bikarbonat iyonu, Na<sup>+</sup> iyonu yardımı ile plazmalemmayı geçip kılcal damarlara girer. Laküna üstüne oturan girintili-çıkıntılı plazmalemmadaki proton pompası H<sup>+</sup> 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 verilir. Paratiroid hormon ve kalsitonin hormonları, osteoklastların kemik rezorbsiyonunu düzenlerler<sup>51,53,64,65</sup>.

### **C.KEMİĞİN MAKROSKOBİK YAPISI**

Uzun kemiğin shaftına “diyafiz”, 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. Sesamoid kemikler ve eklem yüzlerinde periosteum yoktur. Periosteum yoğun, kalsifiye olmayan, düzensiz bağ dokusu olup, ‘Sharpey lifleri’ ile kemiğe tutunur<sup>53</sup>.

Kafatası yassı kemikleri, uzun kemiklerden farklı bir şekildedir. İç ve dış yüzeyler iç ve dış tabula denilen yoğun kompakt kemik ve aralarındaki ‘diploe’ denilen kansellöz kemikten oluşmuştur. Dış tabulanın üstü periosteum, iç tabulanın içi duramater ile örtülüdür<sup>53,66</sup>. Kansellöz kemiğe yakından bakacak olursak, kemik trabeküllerinden oluştuğu görülür. Haversian sistem içermezler ve içerisindeki kemik iliği ise, kan hücrelerini oluşturan kırmızı kemik iliği ve çoğunluğu yağdan oluşan sarı kemik iliği olarak ikiye ayrılır (**Şekil 2**).



**Şekil 2:** Kansellöz kemiğin morfolojik yapısı. **A:** Kansellöz kemiğin gevşek trabeküler yapısının görünümü. **B:** Kansellöz kemiğin trabeküler yapısının ve kemik iliği ile kan damarları içeren örgülü yapının şematik görünümü. **C:** Kansellöz kemik haversian sistem içermez (Kierszenbaum A.L. 2006) <sup>51</sup>.

#### **D.KEMİĞİN MİKROSKOBİK YAPISI**

Mikroskopik olarak kemik, primer (matür, lameller) ve sekonder (immatür) olarak ikiye ayrılır. Sekonder kemik, fetal gelişim sırasında ve kemik iyileşmesi esnasında 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 yapılar, lameller yapıya paralel uzanır<sup>67</sup>.

- **Kompakt Kemiğin Lameller Yapısı**

Kompakt kemik 'lamel' adı verilen ince katmanlardan oluşur. Bu lameller özellikle uzun kemiklerin diyafiz kısımlarında bulunur. Kendi içerisinde dış sirkümfarensiyel lameller, iç sirkümfarensiyel lameller, osteon (haversian kanal sistemi) ve interstisyel lameller diye kısımları vardır<sup>53,60,68</sup>.

### **I- İç ve dış sirkumfarensiyel lameller**

Dış sirkumfarensiyel lameller, periosteum altında bulunur ve periosteumu kemiğe bağlayan Sharpey liflerini içerir. İç sirkumfarensiyel lameller ise dış lameller kadar yoğun olmayan, kemik iliğini saran ve kemik iliğindeki kansellöz kemiğin trabeküllerinin tutunduğu bir yapı oluşturur<sup>53,62,69,70,71</sup>.

### **II- Haversian kanal sistemi (osteon) ve interstisyel lameller**

Haversian kanal sistemi, ortada vasküler bir boşluk etrafında silindirik 4-20 arasındaki lamellerden oluşan bir yapıdır. Her osteon, kalsifiye kollajen yapıdan oluşan bir yapı ile sarıdır. Haversian kanallarının duvarı osteoprogenitör hücre ve osteoblastlarla çevrilidir. Osteonların haversian kanalları, birbirlerine 'Walkmann kanalları' ile bağlıdır. Walkmann kanalları, haversian kanallarına oblik 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<sup>53,69,70</sup>.

## **E.KEMİK OLUŞUMU**

Kemikler embriyonik gelişimde iki farklı yolla oluşurlar.

-İntramembranöz kemikleşme

-Enkondral kemikleşme

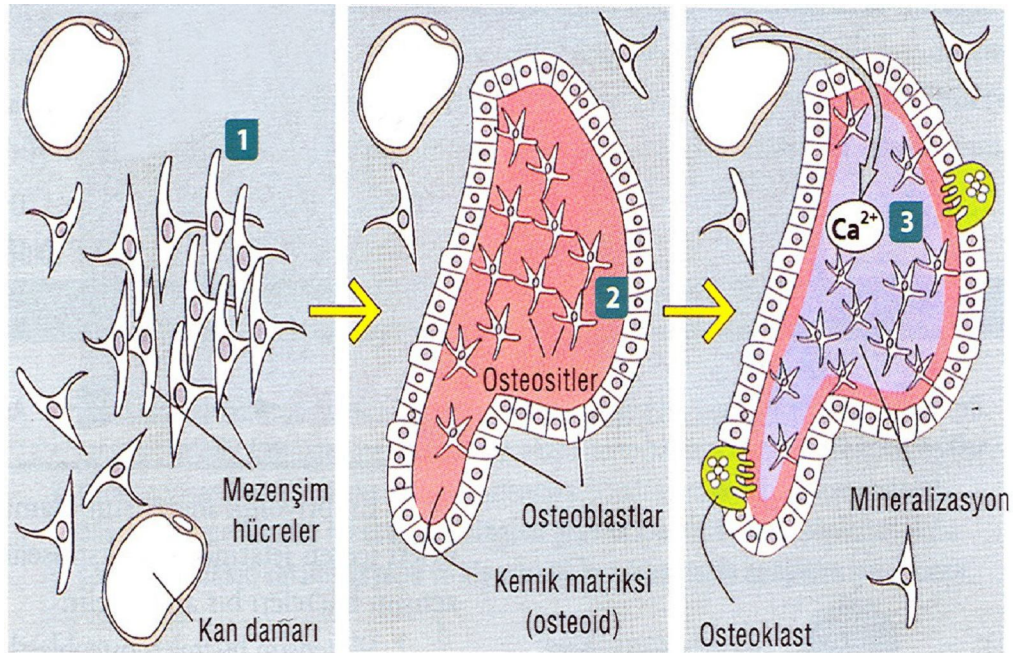
### **I- İntramembranöz Kemik Oluşumu**

Mezenkimal dokular içerisindeki kemik oluşumudur. Çoğu yassı kemik bu yolla iyileşir. Bu tip kemik oluşumu; 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 3**). 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 oluşumunu devam ettirirler. Kansellöz yapı içerisindeki trabeküler yapı yeterli olunca, içlerindeki interstisyel vasküler bağ dokusu, kemik iliği haline gelir. Oluşan birçok kemikleşme merkezi birleşerek, oksipital kemik gibi yapıları yaparlar<sup>72,73</sup>.

Fontaneller, birleşmemiş kemikleşme merkezleridir. Kalsifiye olmayan mezenkimal hücreler, periosteum ve endosteuma dönüşür. Periosteumun iç tabakası ve duranın periosteal tabakası kompakt kemiğe dönüşerek iç ve dış tabakayı yaparlar.



**Şekil 3:** İntramembranöz kemikleşme. **(1)** Mezenkimal hücrelerin kan damarları etrafında kümeleşmesi. **(2)** Mezenkimal hücrelerinin osteoblastlara dönüşmesi ve kemik matriksinin şekillenmesi. **(3)** Kapillerden osteoid dokuya kalsiyum ve fosfat iyonları taşınması ile kalsifikasyonun sağlanması (Kierszenbaum A.L. 2006)<sup>51</sup>.

## II- Enkondral Kemik Oluşumu

Kemik oluşumu için kıkırdak bir iskeletin varlığı gereklidir. Uzun ve kısa kemikler bu yolla kemikleşir. İki aşamada oluşur<sup>72-74</sup>:

I- Hyalin kıkırdak bir iskeletin oluşması

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

### **A- Birincil kemikleşme merkezinin oluşumu**

a) Kemik oluşacak yerde hyalin 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 dönüşür.

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 ederek, ölmelerine neden olur. Kıkırdak modelin ortasında birbiriyle devamlı boş kaviteler oluşur ve ilerdeki kemik iliği kavitesini yaparlar.

d) Kemik yapı araları, osteoklastlar sayesinde periosteal delikler açar ve bu delikler osteoprogenitör hücreler, hematopoetik hücreler ve kan damarları ile kıkırdak modele gerekli besin ve oksijeni sağlar. Damarlarla gelen kalsiyum ve fosfat iyonları, alkalen fosfataz aracılığıyla birleşerek kıkırdak matrikse çöker ve böylece diyafizde bir kemikleşme merkezi ortaya çıkar.

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/kemik kompleksini rezorbe ederler ve kemik iliği böylece genişler. Bu işlem ilerledikçe epifizyal plaklar dışındaki kıkırdaklar kemikleşmiş olur<sup>62,73,75</sup>.

## B- İkincil Kemikleşme Merkezinin Oluşumu

Yeni oluşan kemiklerin epifiz kısımlarındaki kemikleşme, diyafizlerdeki kemik oluşumu dışında aynıdır. Osteoprogenitör hücreler epifiz kıkırdağını yaparak 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<sup>53,76</sup>.

## F. KEMİK UZAMASI

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 kolonileri 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 dönüşerek, kalsifiye kıkırdak matriks ile kalsifiye kıkırdak/kemik kompleksini yapar.

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

## G.KEMİK GENİŞLEMESİ

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 rezorbsiyonu olmalıdır<sup>53,72,73</sup>.

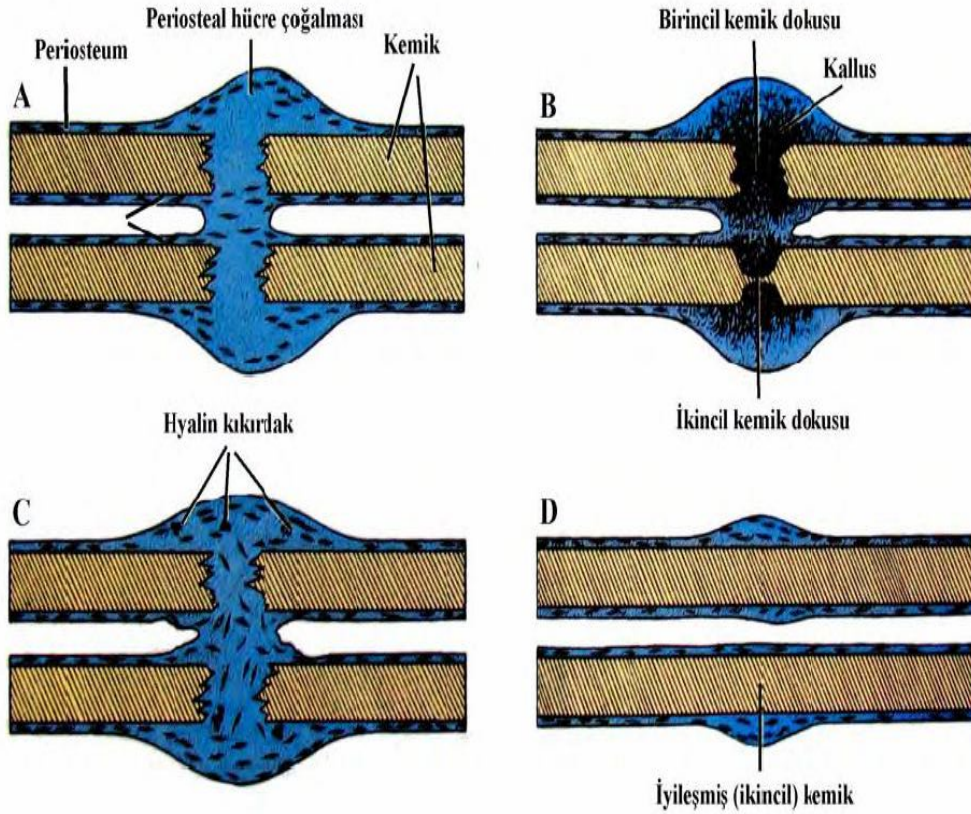
## **H.KEMİK İYİLEŞMESİ**

Kemik iyileşmesi hem kemikleşme, hem de intramembranöz kemikleşme yolu ile olur<sup>52,53,76</sup>. Kemik kırığı, kemik matriksinin harabiyetine, hücre ölümüne, periosteum ve endosteumun yırtılması ile 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, anastomoz damarlarına doğru yeni bir kan akımı başlar. Bunun sonucunda hasar, her iki tarafta genişler çünkü birçok 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 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 manşeti 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 kıkırdağı yaparlar. Çoğalmış osteoprogenitör hücrelerin periosteuma yakın kısımlarındaki hücreler, komşu 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, birleşerek dış kallusu oluşturur. Ortadaki kıkırdak enkondral kemikleşme yolu ile, bunun etrafındaki tabakalar ise intramembranöz kemikleşme yoluyla kemikleşirler. Kırık uçları kansellöz

kemik ile birleştikten sonra, primer kemik yapının sekonder kemik yapı ile değişmesiyle “yeniden şekillendirilme-remodeling” 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 4**). Mekanik strese maruz kalan kemiğin konveks yüzü pozitif, konkav yüzü negatif elektriklerle 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 oluşur<sup>77-79</sup>.



**Şekil 4:** Kortikal kemiklerde kemik iyileşme süreci. **A:** Periosteum ve endosteumdaki osteoprogenitör hücrelerin mitotik aktivitesinde artış. **B:** Osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara dönüşerek kemik manşetini yapması. **C:** Ortadaki osteoprogenitör hücrelerin kırık dokuyu yapması. **D:** Kırık uçlarının kansellöz kemik ile birleştikten sonra, “remodeling”in sağlanması” (Junqueira L. C.)<sup>80</sup>.

### 2.1.2. Kemik İyileşmesinde Etkili Büyüme Faktörleri

Kemik metabolizması bazı kimyasal, elektriksel ve mekanik uyarılarca düzenlenir. Özellikle kemik iyileşmesi sırasında trombosit, makrofaj ve fibroblastlar, bazı proteinler ve büyüme faktörleri salgırlar. Bu proteinler karmaşık trafiği düzenlemekte, migrasyon, proliferasyon ve diferansiasyon ile rezorbsiyon arasındaki hassas dengeyi yerel olarak sağlamaktadırlar. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kemik iyileşmesinde rol alan birçok kemik uyarıcı faktör tanımlanmıştır. Bunların bazıları sınırlı da olsa klinik olarak kullanılmış, ancak rutin klinik kullanıma girmeleri zor görünmektedir. Bunlardan BMP (bone morphogenetic protein)'ler, TGF- $\beta$  "transforming growth factor  $\beta$ ", PDGF "platelet derived growth factor", FGF "fibroblast growth factor", VEGF "vascular endothelial growth factor" ve IGF "insülin-like growth factor" en çok bilinenleridir. Bu faktörler çeşitli saflaştırma metodlarıyla direkt denekten elde edilebildiği gibi, rekombinant olarak da istenilen miktarda elde edilmesi mümkündür. İlk çalışmalarda, doğrudan kemik iyileşmesi olan bölgeye uygulanmıştır. Ancak günümüzde faktörlerin yavaş salınımını sağlayan modellerle veya kemik benzeri ürünlerle kombine şekilde uygulamaları yapılmaktadır<sup>9,10,11,81</sup>. **(Tablo 1)**

Büyüme Faktörü	Ektopik Kemik Oluşturma	Segmental Defekt İyileşmesi	Kemik İyileşmesine Etkisi	Diğer Büyüme Faktörleriyle Etkileşim	Düşük Vertebralı Grubunda Etki	Primatlarda Etki	Potansiyel Klinik Kullanım
BMP	Evet	Endokondral ++++ Membranöz ++++	-Kallus hacmini artırır -Mekanik direnci artırır -Eksojen uygulama kritik büyüklükteki kemik defektlerini iyileştirebilir	TGF- $\beta$ ile sinerjistik	Evet	Evet	-Spinal füzyon -Alveolar kemik defektleri -Segmental defektler -Diş implantları
TGF- $\beta$	Hayır	Endokondral ++ Membranöz ++	-Kallus hacmini artırır -Mekanik direnci artırır -Subperiostal enjeksiyonu kondrogenez ve membranöz kemikleşmeyi uyarır -Eksojen uygulama kritik büyüklükteki kemik defektlerini iyileştirebilir	- TGF- $\beta$ ile sinerjistik -FGF-2 ve VEGF ekspresyonunu artırır	Evet	Hayır (sınırlı çalışma)	-Tek başına etkinliği bilinmiyor
FGF	Hayır	Endokondral ++ Membranöz ++	-Kallus hacmini artırır -Mekanik direnci artırır -Eksojen uygulama kritik büyüklükteki kemik defektlerini iyileştirebilir	-VEGF ekspresyonunu artırır - TGF- $\beta$ ile kemotaksis için sinerjistik etki gösterir	Evet	Evet (sınırlı çalışma)	-İyileşmeyen yaralarda anjiogenezisi artırır
PDGF	Hayır	Endokondral Membranöz-	-Kallus hacmini artırır -Mekanik direnci artırır -Eksojen uygulama kritik büyüklükteki kemik defektlerini iyileştirebilir	-VEGF ekspresyonunu artırır - TGF- $\beta$ ile sinerjistik etki gösterir	Evet	Hayır	-Kronik yaralarda kullanım

**Tablo 1: Kemik iyileşmesinde etkili büyüme faktörlerinin çeşitli çalışmalardan derlenmiş yorumları ( Fındıkçioğlu K. 2006) <sup>82</sup>.**

## 2.2. KEMİK GREFTLERİ

“Greft” terimi, doku ve organların kazanılmış veya konjenital defektlerin rekonstrüksiyonunda yer tutucu özelliğinin yanısıra kemik yapımını uyaran tüm materyaller için kullanılır. “İmplant” terimi cansız dokuların transplantasyonunda kullanılmaktadır. Bu anlamda implant materyalleri olarak; canlılığını yitirmiş allojenik greft, hayvanlardan elde edilen organik ve inorganik cansız materyaller ve sentetik materyaller bulunmaktadır<sup>83</sup>.

Sentetik materyal olarak; seramik hidroksilapatit implantları, trikalsiyum fosfat implantları, çeşitli metaller ve bunların farklı formlarıyla kombinasyonları sayılabilir. Bu maddelere "Alloplastik materyaller" denir<sup>84</sup>. Oral ve maksillofasiyal cerrahi uygulamalarda transplante edilebilen çeşitli doku tipleri içerisinde en genel kullanımı olan doku, kemiktir. Kemik dokusu, tamir olayında skar dokusu oluşumundan çok, yeniden yapılanma ve yer değiştirme olaylarının rol oynadığı tek dokudur. Kemik grefti uygulamalarında alıcı yatak ve greft materyali kemik oluşumunda birbirine yardımcıdır. Yüz ve çene kemiklerinin rekonstrüksiyonunda başarılı sonuçlar elde edebilmek için, alıcı yataktaki vaskülarite ve fibroblastik hücrelenmenin yanısıra transplante edilen kemiğin osteojenik kalite ve kantitesi de önemlidir<sup>83</sup>.

Tüm bunlar düşünüldüğünde, osteogenezisteki artış, yeni kemik oluşumu için matriks sağlanması ve mekanik stabilite, araştırmaların odak noktasını oluşturmuştur<sup>85</sup>. Otojen dokuların transplantasyonları bazı cerrahi ve teknik problemler taşıyabilirler de kural olarak immünolojik komplikasyon içermezler. Ne varki, kemiğin allogreft ve xenogreftleri oral cerrahide kullanılırken, greftin rededilme fenomenine ciddi şekilde önem verilmelidir. Greftin alıcı tarafından yabancı bir cisim olarak algılanması, alıcıda grefti yok etme yönünde bir yanıt gelişmesine yol açar. Hücresel düzeyde olan bu yanıt, T lenfositleri geliştirir<sup>86</sup>. Greftin uygulanmasından hemen sonra ortaya çıkmayan bu yanıt, kemik greftinin normal gelişimini sürdürdüğü izlenimini yaratmaktadır. Bu latent periyodun uzunluğu, alıcı ile verici arasındaki antijenik özelliklerin benzerliği ile ilgilidir<sup>66</sup>. Bir allogreftin immün cevap oluşturması ile bölgede artmış direnç şeklinde aylar süren spesifik immün faz oluşur. Aynı vericiden bu periyot içerisinde transplante edilecek ikinci bir



allogreft öncekinden çok daha hızlı yok edilir. Buna ikinci grup reaksiyon (ikinci set cevabı) adı verilir<sup>87,88,89</sup>. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanımı olan kemik greftleri ve implantlar, otojen kemik greftleri, homojen kemik greftleri (allogreftler), heterojen kemik greftleri (xenogreftler) ve alloplastik implantlardır<sup>90</sup>.

### ▪ **Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Uygulanan Greftlerin Endikasyonları**

Oral ve maksillofasiyal cerrahide en sık rastlanan greft uygulama endikasyonları şu şekilde sıralanabilir<sup>84,85,91</sup>.

1. Oral cerrahi operasyon sonrasında oluşan defektler (kist çıkarılması, gömük diş alınması, tümör rezeksiyonları sonrası),
2. Preprotetik operasyonlar, kret ogmentasyonu ve sinus tabanı yükseltilmesi operasyonu planlananlar,
3. Estetik amaçlı olanlar,
4. Travmatik defektler (çene kırığı, travmatik diş çekimi, sinüs açılması),
5. Ortognatik cerrahi işlemler esnasında gelişen defektler,
6. Endosseöz implantların çevresinde oluşan defektler,
7. Trafik kazaları, radikal onkolojik işlemler gibi aşırı derecede doku kayıplarının meydana geldiği olgular,
8. Neoplazmlar, yumuşak doku tümörlerinin çıkartılması ve bu tümörlerin kemiğe invazyonu sonucu kemiğin rezeksiyonu,
9. Enfeksiyonel osteomyelit olguları,
10. Mikrognati, retrognati, dudak–damak yarıkları gibi konjenital maksillofasiyal defektler,
11. Periodontal defektler,
12. Lokal skatrisler,
13. TME artroplastisi.

### ▪ İdeal Greft Materyalinin Özellikleri

Gerek sert doku, gerek yumuşak doku veya kombine defektlerin onarımında kullanılan greft materyallerinin esas görevi, defektlerin en kısa sürede, anatomik forma en uygun şekilde kapatılmasını ve yeni oluşacak dokulara rehberlik etmesini sağlamaktır<sup>84,85,91</sup>.

İdeal greft materyalinin özellikleri şu şekilde sıralanabilir:

1. Alıcı sahaya uyumlu olmalı,
2. Geniş defektler oluşturan cerrahi girişimler sonucu meydana gelen doku kayıplarını karşılayabilmeli
3. Antijenik özellik taşımamalı,
4. Yeterli destek ve stabiliteyi sağlayabilmeli,
5. Revaskülarizasyonu, osteogenezisi ve osteoindüksiyonu kolaylaştırmalı,
6. Greftleme sonrası kullanılabilirliği iyi olmalı,
7. İstenilen forma kolayca getirilebilmeli,
8. Defekt için yeterli miktarda temin edilebilir olmalı,
9. Adeziv yeteneği iyi olmalı,
10. Karsinojenik ve toksik etkileri olmamalı,
11. İkinci bir cerrahi operasyona ihtiyaç duyulmamalı,
12. Osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri olmalı,
13. Uzun süre saklanabilmeli,
14. Allerjik olmamalı,
15. Cerrahi sahadaki mekanik kuvvetlere karşı dirençli olmalı,
16. Maliyeti ucuz olmalı,
17. Kullanımları için detaylı ekipmana gereksinim duyulmamalı,
18. Uygulanımları kolay olmalı,
19. Sterilizasyonu etkili ve kolay olmalıdır.

### **Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Greft Materyallerinin Klasifikasyonu**

Bu konu ile ilgili Laurencin isimli araştırmacı ve arkadaşları kemik grefti materyallerini 2006 yılında yaptıkları çalışmalarında şu şekilde sınıflandırmışlardır<sup>92</sup>.

## I. Allogreft Esaslı Kemik Greft Materyalleri

Allogreft kemik, tek başına veya diğer malzemeler ile birlikte kullanılabilir (Allogro, OrthoBlast, Grafton, Opteform).

## II. Faktöre Dayalı Kemik Greft Materyalleri

Doğal ve rekombinant büyüme faktörleri, tek başına veya diğer malzemeler ile birlikte kullanılabilir (TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, BMP).

## III. Hücre Esaslı Kemik Greft Materyalleri

Hücreler yalnız başına ya da bir destek matriks üzerine yeni doku oluşturmak için implante edildiklerinde kullanılır (Mezenkimal kök hücreler).

## IV. Seramik Esaslı Kemik Greft Materyalleri

Kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat ve bioglass tek veya kombine olarak kullanılabilir (Osteograf, Norian SRS, ProOsteon, Osteoset).

## V. Polimer Esaslı Kemik Greft Materyalleri

Hem parçalanabilir hem de parçalanamaz polimerler, tek başına veya diğer malzemeler ile birlikte kullanılır (Cortoss, OPLA, Immix).

Jablanski (1982) ve Boyne (1984) isimli araştırmacılar ise, bu materyalleri **immünolojik orjinlerine** göre sınıflamıştır. Bu sınıflama şöyledir<sup>89,93</sup>:

1. Otojen greftler (Otogreftler)
2. Homojen greftler (Homogreftler)
  - a. Allojen greftler (Allogreftler)
  - b. İzojen greftler (İzogreftler)
3. Heterojen greftler (Heterogreftler, Ksenogreftler)

Bazı araştırmacılar ise kemik greft materyallerini **temel olarak** şu şekilde klasifiye etmişlerdir<sup>94,95</sup>:

### 1- Otogreftler (Otojen kemik grefti)

a- Kortikal Kemik

- b- Kansellöz Kemik
- c- Kortiko-kansellöz Kemik

## **2- Allogreftler (Homojen kemik grefti)**

- a- Taze dondurulmuş kemik
- b- Dondurulmuş kurutulmuş kemik
- c- Dondurulmuş kurutulmuş dekalsifiye kemik
- d- Solventlerle dehidrate edilmiş kemik

**İzogreft:** Taze kansellöz kemik iliği

## **3- Ksenogreftler (Heterojen kemik grefti)**

- a- Demineralize edilmiş kemik
- b- Deproteinize edilmiş kemik

## **4- Kemik esaslı olmayan sentetik biyomateryaller (alloplastlar)**

### **I-Doku Kaynaklılar**

- a- Dentin
- b- Sement
- c- Kıkırdak
- d- Sklera
- e- Durameter vs.

### **II-Metaller**

### **III-Jelatin Film**

### **IV-Polimerler**

- |                        |                                   |
|------------------------|-----------------------------------|
| a- Polimetilmetakrilat | f- Sert doku replasmanı           |
| b- Proplast            | g- Polietilenler                  |
| c- Polyalioksanone     | h- Polipropilen                   |
| d- Poliamide Metch     | ı- Silikonlar                     |
| e- Polygalctin 910     | j- Politetraflouroetilen (Teflon) |

### **V- Seramikler**

- 1- Kalsiyum Sülfat (Paris alçısı)
- 2- Kalsiyum Alimunat
- 3- Kalsiyum Karbonat
- 4- Bioaktif cam ve cam seramikler

## 5- Kalsiyum Fosfatlar

### a- Rezorbe Olanlar

\*Trikalsiyumfosfat

\*Hidroksilapatit

### b- Rezorbe Olmayanlar

\*Yoğun Hidroksilapatit

\*Poröz Hidroksilapatit

## DOĞAL MATERYALLER

### 1- Kollajen

### 2- Demineralize Kemik Matrisi (DBM)

### 3- Kemik Morfojenik Proteinler (BMP)

### 4- Trombositten Zengin Plazma (TZP,PRP-platelet rich plasma)

Whang PG isimli araştırmacı, kemik greftlerinin özelliklerini ve birbirleri ile aralarındaki farklılıkları aşağıdaki tabloda şöyle özetlemiştir<sup>96</sup>;

Kemik Greft Materyali	Osteojenik hücreler	Osteoindüktif faktörler	Osteokondüktif matris	Biyomekanik kuvvet
Otojen kansellöz kemik	+++	++	+++	-
Otojen kortikal kemik	+	+	+	+++
Allogreft donmuş	-	+	+	++
Allogreft liyofilize	-	+	+	+
Seramikler	-	-	+++	+
Demineralize kemik matrisi	-	++	+	-
Osteoindüktif büyüme faktörleri	-	+++	-	-
Kemik İliği	++	+	-	-
Mezenkimal kök hücreleri	+++	-	-	-
Otolog trombosit konsantrasyonu	-	++	-	-
Gen tedavisi	-	+++	-	-

**Tablo 2** : Kemik greftlerinin özellikleri ve çeşitli yönlerden kıyaslanmaları (-: kötü, +: iyi, ++: çok iyi, +++: mükemmel)(Whang PG 2003)<sup>96</sup>.

### 2.3. BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT SERAMİKLER

İmplant edilen materyal kadar kemik defektinin büyüklüğü, şekli, konumu da greftin başarısını etkilemektedir. Murashima ve arkadaşları, yaptıkları deneysel çalışmada köpeklerin mandibularına açtıkları değişik tip kemik defektlerine kalsiyum sülfat yerleştirmişler ve kalsiyum sülfatı bukkal duvardan lingual duvara kadar hazırladıkları kemik defektinde daha başarılı bulurken, gingival sulkus ile ilişkili defektlerde ise başarısının düştüğünü saptamışlardır<sup>97</sup>. Farklı araştırmacılar ise, greftin başarısını arttırmak için, çoğu zaman bir başka greftle veya büyümeyi indükleyen maddelerle kombine ederek kullanmışlardır. Bu amaçla Cortellini ve arkadaşları, kemik defektlerinin içine fibrotik doku büyümesini engellemek için kalsiyum sülfatı kollajen membran ile kombine ederek kullanmışlardır. Bariyer yerleştirmedikleri gruba göre daha başarılı sonuçlar elde etmişlerdir<sup>98</sup>. Başka çalışmalarda da muhtelif araştırmacılar; bu grefti antibiyotikler, büyüme faktörleri ve kemik morfogenetik faktörleri (Bone Morphogenetic Factors-BMP) ile kombine etmişlerdir<sup>99-101</sup>.

İmplantolojide, sinüsün kaldırılması veya oral cerrahide sinüsplastisi operasyonu bazen klinisyenleri zorlamaktadır. Defektin büyüklüğü, sinüsün alveoler krete yaklaşması ve sinüzitis bu tabloyu daha dramatik hale getirebilir ve greft kullanılması kaçınılmaz hale gelebilir. Pecora ve arkadaşları, sinüs augmentasyonunda kalsiyum sülfatı kullanmışlar ve greft materyali olarak kalsiyum sülfatın sinüs augmentasyonunda kullanılabilir bir madde olduğunu rapor etmişlerdir<sup>102</sup>. Bu konuda yapılmış başka bir çalışma ise, Leonardis ve arkadaşlarının sinüs augmentasyonunda kalsiyum sülfatı kullandıkları araştırma olup, bu çalışma sonunda kalsiyum sülfatı efektif bulduklarını rapor etmişlerdir. Ayrıca kalsiyum sülfatın diğer greft materyalleri ile veya antibiyotiklerle kombine kullanılabilirliğini ve daha çok araştırma yapılmasını da önermişlerdir<sup>103</sup>. Kalsiyum fosfat ailesi, sentetik kemik greftleri içinde hem osteointegrasyon hem de osteokondüksiyon özelliği olan sentetik bir materyal grubudur. Osteointegrasyon, kemik greftinin implantasyonundan hemen sonra oluşmaya başlayan hidroksilapatit (HA) tabakasının formasyonu ile oluşur. HA tabakasının oluşması için, implanttan ve defektin

etrafındaki kemikten kaynaklanan  $Ca^{+2}$  ve  $PO_4^{-2}$  iyonlarına gereksinim vardır. Bu greft materyali biyouyumlulukta mükemmeldir. Rapor edilmiş hiçbir sistemik toksisite veya yabancı cisim reaksiyonu bulunmamaktadır<sup>104</sup>. Kalsiyum fosfat seramikler, biyouyumluluk özelliklerine göre sınıflandırılmıştır.  $\beta$ -trikalsiyum fosfat ( $\beta$ TCP) ve HA kemik dokusunun inorganik komponentine benzeyen ve çeşitli nedenlerle yok olmuş kemiğin telafisine yeni bir boyut getiren kristal yapıdaki biyomateryallerdir<sup>105</sup>.

B-TCP, kemik grefti olarak bilinen en eski kalsiyum fosfat içeriğidir. 1920 yılında Albee ve Morrison, segmental kemik defektine  $\beta$ -TCP enjekte edildiğinde, kemik oranının arttığını rapor etmişlerdir<sup>40</sup>.  $\beta$ -TCP granüler veya blok tarzında, solid veya porlu yapıda hazırlanmışlardır. Yapısal olarak porlu  $\beta$ -TCP' in sıkıştırma ve gerilme kuvvetlerine direnci, spongioz kemik ile hemen hemen aynıdır<sup>106</sup>. Diğer kalsiyum fosfat preparatları gibi  $\beta$ -TCP da kırılabilir olup, gerilme ve kopmaya karşı zayıfken, sıkıştırma kuvvetlerine karşı dirençlidir. Genelde  $\beta$ -TCP 'in granüler formu kullanılmaktadır. Poröz granüler form, erken dönemde fibrovasküler yapıların greftin içine doğru büyümesiyle stabilizasyon sağlanır. Bu özellik nedeniyle poröz form solid granüler forma nazaran daha az oranda migrasyona uğramaktadır<sup>107,108</sup>.  $\beta$ -TCP, 6–18 ay sürecinde çözülme yoluyla rezorbe olmaktadır. Ancak  $\beta$ -TCP ile kemiğin yer değiştirmesi, aynı süreç içinde gerçekleşmez. Dolayısıyla defekt bölgesinde daima rezorbe olan  $\beta$ -TCP miktarından daha az miktarda kemik bulunmaktadır. Bundan dolayı,  $\beta$ -TCP' in klinik kullanım sıklığı, diğer rezorbe olan kemik greftleriyle benzer sayılır<sup>109</sup>. B-TCP'in porlu yapısı, spongioz kemiğin trabeküler yapısını taklit etmektedir. Bu greftin yapısındaki küçük porlar; kemik şekillendiren hücrelerin, besinlerin, büyüme faktörlerinin, kapiller damarların ve rezorbsiyon yapan fagositik hücrelerin araya girmesine izin verir. Daha büyük porlar vaskülarizasyonu ve içten büyümeyi teşvik eder. B-TCP, osteokondüksiyon için optimum büyüklükte porları (150-500 $\mu$ m) içermektedir ve partikülleri, remodeling fazında (yeniden şekillenme) osteoklastların içeri girebilmesi için ortalama 100 nm çapında üretilmiştir. Aynı zamanda bu seramik yapı, intraoperatif dönemde rahatlıkla

şekillendirmeye olanak verir. Tüm seramik yapıdaki materyaller gibi,  $\beta$ -TCP' da osteoindüktif özellik göstermemektedir<sup>110,111,112</sup>.

1970'lerde üretilen diğer bir kalsiyum fosfat preparatı ise, **Hidroksilapatit (HA)**. Kemiğin temel elementi olan Hidroksilapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  formülasyonundadır. HA seramik veya non-seramik formda, porlu veya solid tarzda, blok veya granül şeklinde bulunur. Granül formu periodontal kemik defektlerinde, blok formu ise alveoler kret augmentasyonunda kullanılmaktadır<sup>105</sup>. HA'in, kristal forma girmesi için 700–1300 °C arasında ısıtılmaktadır. Seramik HA preparatları, invivo ortamlarda rezorbsiyona oldukça dirençli olup, yılda ortalama kütlelerinin % 1-2'si rezorbe olmaktadır<sup>94</sup>. Buna karşın, seramik olmayan HA invivo ortamda kolayca rezorbsiyona uğramaktadır. Sentetik HA sıkıştırıcı kuvvetlere karşı dirençliyken, gerilme ve kopmaya karşı dirençsizdir ve HA kırılğan olup, ani kuvvette fraktür gelişme riski artmaktadır. Sentetik HA' in solid blok formunu şekillendirmek oldukça zordur. Fibroossöz büyümeye izin vermezken, elastisite modülü kemikten daha yüksektir. Metal implantların osteointegrasyonunu arttırmak için, yüzeyleri sentetik HA ile kaplanmaktadır<sup>113,114</sup>. HA' in porlu granüler yapısı, kemik defektlerini doldurmak için tek başına kullanılabilirdiği gibi, diğer kemik greftleri ile beraber de kullanılabilir<sup>115</sup>. HA materyali çoğu klinik kullanımlarda başarılı sonuçlar vermiş olmasına karşın, rezorbsiyon hızı yeni kemik oluşum hızı ile kıyaslandığında daha yavaş olduğu rapor edilmiştir. Rezorbsiyonu yavaş olduğu için de invivo ortamda çok uzun süre kalmaktadır. Bu da bazı komplikasyonlara yol açabilmektedir<sup>105</sup>. Son yıllarda HA' in fonksiyonunu ve rezorbsiyon oranını arttırmak için, diğer maddelerle kombinasyonu veya modifikasyonu gündeme gelmiştir<sup>95</sup>. Bu amaçla HA ile  $\beta$ -TCP kombine edilmiş ve bifazik kalsiyum fosfat elde edilmiştir. Bu deneysel çalışmamızda, bifazik kalsiyum fosfat olan  $\beta$ -TCP/HA (Bone Ceramic) materyalini kullandık. Greft materyalinin % 60'ı HA içerirken, % 40'ı da  $\beta$ -TCP' tan oluşmaktaydı. İçeriğinde bulunan HA %100 kristal yapıda iken, TCP ise tamamıyla  $\beta$ -trikalsiyum fosfattan oluşmaktaydı. B-TCP/HA osteokondüktif özelliktedir ve yapısındaki 100–500  $\mu\text{m}$  çapındaki porlar ile kemik büyümesini teşvik



etmektedir.  $\beta$ -TCP/HA biyolojik olarak rezorbe olup, kemiğin optimal büyüme ve şekillenmesini gerçekleştirir. Bu içerik doğal kemiğe yakın özellikte olduğu için, biyouyumluluğu iyi derecededir. Greft materyali tek başına kullanılabileceği gibi, otogreftlerle veya kemik iliği ile kombine şekilde de kullanılabilir.

B-TCP/HA ile yapılmış bir çalışmada, skolyozlu 12 pediatrik hastaya  $\beta$ -TCP/HA ve otogreft ile birlikte internal fiksasyon ve füzyon uygulanmıştır. Hem  $\beta$ -TCP/HA uygulanan grupta, hem de otogreft ile kombine edilen grupta 15 aylık takiplerin sonunda başarılı sonuçlar elde edilmiştir<sup>116</sup>. Bucholz isimli araştırmacı tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, metafizial defekti olan 40 hastaya interporözlü HA ve otogreft uygulanmış olup, çalışma sonunda iki grup arasında hiçbir radyolojik ve klinik farklılığın olmadığı rapor edilmiştir<sup>117</sup>. Daculsi ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, bu greft materyali insanlardaki ve köpeklerdeki uzun kemik defektlerine yerleştirilmiş ve 2., 4., 8. ve 18. haftalarda kontrol edilmiştir. Sonuç olarak  $\beta$ -TCP/HA'nın yeni kemik formasyonuna neden olduğu bulunmuştur<sup>118</sup>. Heise ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada; skolyozlu, soliter kemik kistli, tümörlü hastalardan 3 grup oluşturulmuş ve 1.gruba bifazik kalsiyum fosfat, 2. gruba otogreft ile kombinasyonu ve 3. gruba ise sadece otogreft yerleştirilmiştir. Çalışmalarında, kalsiyum fosfat grubunun greft gerektiren hastalarda tek başına güvenle kullanılabileceğini rapor etmişlerdir<sup>119</sup>. Muschik isimli araştırmacı ve arkadaşları ise, araştırmalarında skolyozlu hastalara  $\beta$ -TCP ve otogreft uygulamışlar ve  $\beta$ -TCP'in bu olgular için oldukça iyi bir kemik grefti olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca klinik ve radyolojik bulguların ışığında,  $\beta$ -TCP ve otogreftin birbirine yakın oranda füzyon gerçekleştirdiğini saptamışlardır<sup>120</sup>.

Bifazik kalsiyum fosfat materyalleri in vitro ve in vivo olarak kemikten elde edilen maddelere benzerlik taşıyan maddelerin kemik hücrelerinden ve benzer hücrelerden de salınmalarına neden olurlar. Ayrıca hücre ataşmanına, proliferasyonuna ve ekspresyonuna izin verirler. Biyolojik olarak rastlanan ilk olaylar, BCP'in implantasyonu sonrası biyolojik sıvı diffüzyonu ve bunu takip eden hücre kolonizasyonudur.

BCP'ın biyodegradasyonu, HA ve  $\beta$ -TCP kristallerinin ayrı ayrı rezorbsiyon işlemlerini içerir<sup>121-124</sup>. İmplantasyon sonrası HA'in  $\beta$ -TCP'a oranı daha da önem kazanır. Ayrıca  $\beta$ -TCP'ın HA'e oranla daha reaktif ve rezorbe olduğu da bilinmektedir<sup>125</sup>.

Daculsi isimli araştırmacı ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, CaP implantasyonu sonrası mikrokristal oluşumunun nonspesifik olduğunu göstermişlerdir<sup>126</sup>. Yani seramik tipi ve implant alanı önemli değildir. Biyolojik apatitin ve reziduel kristallerin yüzeyel olarak bağlanmaları, kemik hücre adezyonu ve bone ingrowth (porların içine doğru kemik oluşumu) için bir ortam hazırlar<sup>127</sup>. Restorasyon işlemi, CaP kristallerinin erimesini ve mikroporlardaki eriyen kristallere benzeyen CaP benzeri kristallerin çökmesini içerir. Bağlanma hattı, yeni biyomateryal/kemik yüzeyini içermesine rağmen, biyomateryal yüzeyini kapsamaz. Sonraki olaylar, bone ingrowth ve yeni oluşmuş kemiğin CaP biyomateryalinden oluşmuş CaP başlangıç formuyla yer değiştirmesini içermektedir<sup>125</sup>. Hücre kolonizasyonu, adezyonu, fagositoz ve osteoklastik rezorbsiyon, mineralizasyon, bone ingrowth ve kemik şekillenmesi, CaP seramiklerinin erimesi süresince gerçekleşen biyolojik apatit çökmesi olaylarıyla beraber göze çarpar. Sonuç olarak birleşim yüzeyi statik olmayıp, dinamik bir karakterdedir. Biyomekaniksel faktörler ve kemik maturasyonu gözlemlenir. "Bioaktivite konsepti", implant bağlanmasına ve enjektabl kemik maddesine bağlanabilir<sup>125</sup>. CaP materyaller, polimerik kompozitlerdeki ve simanlardaki komponentler veya doldurucular olarak kullanılabilir<sup>128,129</sup>. Hidrolik siman makroporoz değildir ve birçok çalışma osteokondüksiyon için makroporların gerekliliğini vurgulamıştır<sup>130</sup>. BCP konseptine göre, BCP granülleri ve hidrosolubl (suda erir) polimeri beraber içeren enjektabl kemik yerine geçen maddeler "osteokondüktif" özelliktedir<sup>131</sup>. Ayrıca bu maddeler mükemmel biyokompatibldirler ve iyi rezorbe olurlar. Başlangıç haldeki plastisiteleri kemik defektinin kolayca dolmasını sağlar<sup>132,133</sup>.

Enjektabl kemik seramikler (IBS), hidrolik kemik sementine benzer mekanik özellikleri içermez. Ancak, kemik hücreleri polimerlerce oluşturulan aralığı doldurma özelliğindedirler. Bone ingrowth, BCP taneciklerinin hem

çevresinde hem de rezorbsiyon sonucu oluşan aralığa doğru olmaktadır. Mekanik özellikler ancak kemiğin varlığında gözlenebilir<sup>129</sup>. Biyomaddelerdeki porların çapı çok önem taşımaktadır. Birçok araştırma in vivo osteokondüksiyon için optimal aralığın 150-500 µm olduğunu göstermiştir. 2–3 µm gibi küçük aralıklar, porların içine doğru hücre göçüne ve vaskülarizasyona engel olur. Osteoklastlar rezorbsiyondan sorumlu major hücreler olmalarına karşın, orjinleri halen belirsizdir. Bazı araştırmacılar, kemik iliğinde oluştuklarını benimserken bazıları sirkülasyondaki mononükleer hücreler olduklarını varsaymaktadırlar. CaP implant yüzeyinde beliren ilk hücreler monositler ve makrofajlardır<sup>134-137</sup>.

Araştırmada kullandığımız materyal Bone Ceramic®, sentetik olup, granül formdadır. Straumann Bone Ceramic® 100–500 mikron çapında, % 90 gözenekli yapıdadır. Bifazik kalsiyum fosfat, % 60 hidroksilapatit (% 100 kristal) ve % 40 β-trikalsiyum fosfat'ın 1100 ila 1500° C sıcaklıkta sinterlenmiş formuyla oluşturulmuştur.

## 2.4. KÖK HÜCRELER

### Tarihçe

Tarih boyunca insanoğlunun en büyük hedeflerinden biri, hastalıklara çare bulmak ve insan ömrünü uzatmak olmuştur. “Hasara uğramış bir organın kaybedilmiş fonksiyonlarını restore etmenin; onun yerine yenisini koymaktan daha iyi bir yolu var mıdır?” sorusu insanlık tarihi boyunca hep sorulmuştur. Tarih boyunca transplantasyon düşüncesi bu soru üzerine yoğunlaşmış olup; sfenksler, deniz kızları ve kantaronlar mitolojide birer zenotransplantasyon örneği olarak yerini almıştır. Mitolojide ateşi Olympos Dağından, tanrılardan çalarak insanlığa hediye etmesi üzerine, Zeus tarafından cezalandırılan Prometheus'un hikâyesi de buna bir örnektir. Zeus tarafından Kafkas (Kaf) dağında bir kayaya bağlanarak karaciğerinin her gün bir kartal tarafından yenmesi şeklinde bir cezaya çarptırılan Prometheus'un karaciğeri, her gün kendisini yenilemiştir. Bu, karaciğer hücresinin rejenerasyon yeteneğini ve dolayısı ile kök hücre kavramını ortaya koyan ilk

hikâyedir. Çeşitli bitkilerden elde edilen iksirlerin, binlerce yıl önce hastalıkların tedavisinde ilaç olarak kullanıldığına ait bilgiler mevcuttur. MÖ 1534 yılına ait olduğu düşünülen bir papirüste çeşitli hastalıklardan ve tedavilerinden bahsedilmektedir. Eski Mısır anıt ve hiyerogliflerinde insanların hastalıklı organlarının değiştirildiğini gösteren şekiller vardır. MÖ 1700'lü yıllarda Babillerin, bıçak kullanarak ameliyat yaptıklarına ait bilgiler bulunmaktadır. Organ nakillerinin o zamanlar gerçekte yapılıp yapılmadığı bilinmese de, insanoğlunun hastalıkları yenme ve yaşlanmanın önüne geçme çabaları ilk zamanlardan günümüze kadar sürmüştür. İnsanoğlunun belki de bilinçaltındaki ölümsüzlüğe ulaşma isteği, bugüne kadar tıp biliminin itici gücü olmuştur.

İlk olarak 1967 yılında tanımlanan embriyonel karsinoma hücrelerinin kültür ortamında çoğaltılması, bu alanda ileri doğru atılmış önemli bir adımdır ve o zamandan beri insan ve fare teratokarsinomlarından çok sayıda hücre serisi tanımlanmıştır. Bu hücrelerin diferansiasyonu, "embriyoid cisimcikler" olarak adlandırılan embriyo benzeri oluşumların meydana gelmesiyle sonuçlanan hücre agregasyonu ile gelişir. Söz konusu embriyoid cisimcikler ilk olarak, embriyonal karsinomlu farelerin asit sıvılarında gözlenmiştir. Bu hücrelerin, gelişimsel biyologlar için de önemli bir model oluşturdukları, çünkü in-vitro diferansiasyon paternlerinin, embriyogenezin çeşitli yönlerini açıkladığı ve 3 germ tabakasının tümünü temsil edici hücrelerin oluşumu ile sonuçlandığı anlaşılmıştır. Aynı zaman döneminde, in vitro fertilizasyon kliniklerinden alınan fazla embriyolar kullanılarak, insan embriyonik kök hücrelerinin üretilmesine yönelik çalışmalar da başlamıştır. Bu çalışmalar başlangıçta başarısız olmuş, ancak pre-implantasyon blastosistlerinden izole edilen hücrelerde diferansiasyonu incelemek için yapılan bir denemede tavşan embriyo hücreleri kültür ortamında geliştirilebilmiştir. 1998'de ilk insan embriyonik kök hücreleri kültüre edilebilmiştir. Aynı zaman diliminde, insan primordial germ hücrelerinden embriyonik germ hücreleri de elde edilmiştir. Bu kök hücrelerinin gelecekte hastalık tedavisi için kullanılabilecek olması büyük bir heyecan yaratırken, henüz çözümlenmemiş etik sorunlar ciddi bir direnç yaratmıştır. Bu hücrelere karşı gösterilen etik reaksiyonlar sonucu,

erişkin kök hücreleri ile ilgili çalışmalar da yoğunlaşmış ve bu hücrelerin belirgin plastisiteleri “kemik iliğinden kas”, “beynin kana çevrilmesi”, “kanın beyne çevrilmesi” gibi başlıkların görülmesine neden olmuştur. Bu ilk çalışmalardan sonra erişkin ve embriyonik kök hücrelerle ilgili çok sayıda yayın ortaya çıkmıştır. Bunların hepsi aynı amacı taşımaktadır: “**KÖK HÜCRE ESASLI TEDAVİ**”<sup>138,139</sup>.

### I.Mezenkimal Kök Hücre

Kök hücre biyolojisi ve klinikte kullanılabilirlikleri üzerine çalışmalar hızla artmaktadır. Kök hücreler bazı özelliklerinden dolayı, diğer hücrelerden farklıdırlar. Belirli doku hücre karakteristikleri taşımayan ve uygun sinyal oluncaya kadar farklılaşmamış fenotiplerini koruyan hücrelerdir. Organizmanın tüm yaşamı boyunca kendini yenileme özelliklerine sahiptirler. Bu özelliklerinden dolayı in vitro kültürlerde kolaylıkla çoğalabilmektedirler. Belirli biyolojik sinyaller altında fenotiplerinden tamamen farklı bir hücre tipine dönüşebilme potansiyelleri mevcuttur<sup>140</sup>. Kök hücreler buldukları 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 ise 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<sup>140</sup>.

Mezenkimal kök hücreler osteojenik, kondrojenik, adipojenik, myojenik ve fibroblastik stromal hücreler yönünde farklılaşırlar<sup>25,141-143</sup>. 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 farklılaşabilmektedirler<sup>144</sup>. Mezenkimal kök hücreler, kemik iliği aspirasyonundaki çekirdekli hücre popülasyonununun % 0,0001'inden daha

azını oluştururlar<sup>20</sup>. Kemik iliği aspirasyon materyali yoğunluk farkı oluşturan 'ficoll pague' veya 'percoll' gibi ajanlarla muamele edildiğinde 1,5X10<sup>6</sup> hücre/cm<sup>2</sup> yoğunlukta kümeleşirler. Primer kültürleri 12-16 günde elde edilirken, daha sonraki kültürlerde sayıları çoğaltılır. Mezenkimal kök hücreler morfolojik olarak yapışan fibroblastlara benzerler. Bu hücreler; ayrıca mezenkimal stromal hücreler, kemik iliği stromal hücreleri, mezenkimal progenitör hücreler olarak da adlandırılmışlardır. İsimlendirme konusundaki tartışma halen devam etmektedir. Bu hücreler genç hayvanların periosteum ve kemik iliğinde bol bulunmasına karşın, yaşın ilerlemesi ile sayıları azalır<sup>23</sup>. Orijinleri periost tabakası veya kemik iliği olabildiği gibi; kas, yağ ve sinoviyal dokuda da az sayıda bulunabilirler<sup>29</sup>. Mezenkimal kök hücrelerin sayısı ve aktivitesi, metafiz bölgeleri ve kalın vasküler periostta daha çoktur ve bu bölgelerdeki iyileşme daha iyidir<sup>25</sup>. Kemik iliği aspirasyon materyalinin % 0,01'inden daha az oranda bulunur<sup>145</sup>. 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<sup>146-148</sup>. Bu gözlemler, Virchow'un 1863 yılında damar duvarlarındaki ektopik kıkırdak ve kemik oluşumunu açıklayabilir<sup>149</sup>. Ayrıca MKH göbek bağı ve fetal dolaşım gibi iskelet dışı yapılardan da daha az oranda izole edilebilmiştir<sup>24,150</sup>.

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 tümör olabilir<sup>151</sup>. Bu hücrelerin hareketlenmesi ve farklılaşması kemotaksis ve integrin gibi transmembran proteinlerin ekstrasellüler matriks ile etkileşmesi ile gerçekleşir<sup>152</sup>. Fakat MKH üretimi ve çoğaltılması kültürde yapıldığından in vivo sinyallerle çoğalan MKH'lerin tüm özellikleri, tam anlaşılabilmiş değildir. Song ve Tuan'ın yaptıkları çalışmada, belirli alkalen fosfatase 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 durum MKH'lerin yüksek çoğalma potansiyelinden ziyade 'plastisiteleri' ve değişik hücre gruplarına dönüşüm yapabilme karakterleri olarak bilinmektedir<sup>153</sup>. Mezenkimal kök hücrelerin izolasyon teknikleri, daha çok onların yapışma özelliği kullanılarak geliştirilmiştir<sup>20</sup>. 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 edilmiş olur<sup>20</sup>.

## II. 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<sup>154</sup>. Değişik hücre tiplerinde eksprese edilen, değişik tipte antijen yapıları vardır. Bundan dolayı belirlenmeleri; adezyon molekülleri, ekstrasellüler matris ve büyüme faktörü reseptörleri gibi farklılaşma ve belirli hücre tipini gösteren geniş bir monoklonal antikor çeşidi ile yapılabilir<sup>155</sup>. Bugün için en çok kabul edilen immünofenotip profili CD105 (SH2) ve CD73 (SH3 ve SH4) ekspresyonudur<sup>23</sup>.

## III. Mezenkimal Kök Hücrelerin Bağışıklık Sistemini Baskılayıcı Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerinin, alıcının immün cevabından kaçtığına dair güçlü bulgular vardır. Bunun nedeninin MKH'lerden sınırlı sayıda eksprese olan alloantijenlerin varlığı ve hücre temas mekanizmalarının bloke edilmesi olduğu düşünülmektedir. Mezenkimal kök hücreler MHC sınıf I antijenler içermelerine karşın, 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. Bu kök hücreler T-hücre döngüsünü 'cyclin D2 down regülasyonu' yaparak G1 fazında durdurur. Yapılan çalışmalarda, T-hücreler, MKH kültüründen alındıktan sonra interferon-C üretseler dahi çoğalamadıkları saptanmıştır<sup>156,157</sup>.

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 stimüle ettiği MKH'in 'Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)' oluşturduğu tespit edilmiştir<sup>158</sup>. Mezenkimal kök hücreler immün cevapta rol oynayan B-hücreleri ve dendritik hücreleri de etkiler<sup>156,159</sup>. Bu hücreler dentritik hücrelerin monositlerden farklılaşmasını engellemenin yanısıra, IL-10 üreterek daha toleransı güçlü bir fenotip oluştururlar<sup>159</sup>.

Bağışıklık sistemini baskılama özelliklerinden dolayı MKH'lerin tedavi edici olarak kullanılabilecekleri düşünülmüştür. İlk gözlemlerde MKH'lerin maymunlarda in vivo olarak 'MHC-mismatched' deri greftlerinin yaşayabilirliğini arttırdığı görülmüştür<sup>26</sup>. Klinik olarak allojen kemik iliği transplantasyonu yapılan bir hastada gelişen 'graft-versus-host' hastalığı allojenik MKH infüzyonu ile başarılı bir şekilde tedavi edilmiştir<sup>160</sup>.

#### **IV. Mezenkimal Kök Hücrelerin Klinik Uygulamaları**

Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda MKH uygulamalarının serebral hasar, myokard iske mi/enfarktüs, musküler distrofi ve kemik kırığı modellerinde hasarlı dokunun iyileşmesini arttırdığı görülmüştür<sup>142</sup>. Fakat az sayıda yapılan klinik çalışmada direkt MKH'lerin etkisi ortaya konmuştur. Allojen kök hücre transplantasyonundan sonra ortaya çıkan 'graft-versus-host' hastalığının önlenmesi ve tedavisinde, MKH'ler başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Horwitz isimli araştırmacı ve arkadaşları ise, osteogenezis



impefectalı 3 çocuğa verilen MKH'lerin tedavi edici etkisini göstermişlerdir<sup>161</sup>. Ayrıca metakromatik lökodistrofi ve Hurler sendromunda da allojenik MKH'lerinin terapötik etkileri rapor edilmiştir<sup>162</sup>.

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.

## V. Kemik Rejenerasyonunda MKH Bazlı Stratejiler

Friedenstein ve arkadaşları MKH'lerin yeni kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını belirten yayınlarından sonra, MKH'lerin yeni kemik oluşumu ve kemik iyileşmesindeki yeri gösterilmiştir<sup>163</sup>. Birçok çalışmada MKH'lerin, deneysel olarak oluşturulan büyük kemik defektlerinin onarımındaki etkinliği gösterilmiştir<sup>142</sup>. 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 sağlamışlardır<sup>31</sup>. Araştırmacılar tekniklerinin basit, az girişimsel ve düşük komplikasyon oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir. Siwach ve arkadaşları da, gecikmiş, 'nonunion' kırık veya bacak uzatma yapılan ancak 'malunion' olan 72 hastanın 69'unda hastaların, perkutan otojen kemik iliği greftlemesi ile iyileşme sağladıklarını rapor etmişlerdir<sup>33</sup>.

Geniş kemik defektlerinde MKH emdirilmiş taşıyıcılar ile tedaviler araştırılmıştır. Bu teknikle geniş kemik defektlerinin iyileşmesi sağlanmakla beraber birtakım büyüme faktörleri eklenmesi ile etkinin arttığı tespit edilmiştir<sup>164,165</sup>. Borden isimli araştırmacı ve arkadaşları çalışmalarında, polimerik mikrosfer matris ile kombine edilen kemik morfojenik protein-7'nin, MKH'lerin osteojenik aktivitesini arttırdığını tavşanda göstermişlerdir<sup>166</sup>. Takahashi isimli araştırmacı ve arkadaşları biyolojik olarak yıkılabilen ve  $\beta$ -trikalsiyum sitrat emdirilmiş jelatin porların içindeki sıçan MKH'lerinin osteojenik yönde farklılaştığını bildirmişlerdir<sup>167</sup>.

Kemik rejenerasyonunda MKH bazlı iki temel strateji vardır. Birincil strateji olarak; kemik iliği kaynaklı MKH organizmadan alınıp, kültürde çoğaltılıp uygun taşıyıcı ile yine aynı organizmaya verilmektedir<sup>164</sup>. Köpekte spinal füzyon modelleri, koyunda ve köpekte femur ve tibiada büyük segmental kemik defekt modelleri bu bağlamda kullanılmıştır<sup>32,50,168,169</sup>. Özellikle köpekte yapılan femur defekt modelinde poröz hidroksilapatit/ $\beta$ -trikalsiyum ve seramik silindirik taşıyıcı ile kullanılan otojen MKH'lerin iyileşmenin özellikle 12. haftasında en yüksek miktarda kemikleşmeyi sağladıkları görülmüştür<sup>32</sup>.

İkinci strateji ise, büyük kemik iliği aspiratlarının (selektif hücre retansiyonu) konsantre edilerek hücre kültürü yapılmaksızın, otolog olarak eş zamanlı intraoperatif olarak verilmesidir<sup>170</sup>. 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 bir çalışmada  $\beta$ -Trikalsiyum fosfat selektif hücre retansiyonundan elde edilen MKH ile kombine edilmiştir. Bu çalışma sonucuna göre, Bifazik kalsiyum fosfat ile kombine edilmiş selektif hücre retansiyonundan elde edilen MKH'ler, otojen kansellöz kemik kadar iyi bir iyileşme paterni göstermiştir<sup>170</sup>.

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'lerinin, insan rekombinant kemik morfojenik protein-2 ve rekombinant bazik fibroblastik-büyüme faktör ile beraber verilmesi ile kraniyal kemik iyileşmesini hızlandırdıklarını göstermişlerdir<sup>34</sup>. Chang isimli araştırmacı ve arkadaşları 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<sup>171</sup>.

Kemik rejenerasyonunda MKH bazlı deneysel ve klinik çalışmalar  
**Tablo 3**'de özetlenmiştir.

Defekt tipi	MKH kaynağı	Model	Sonuç	Referans
Tibial nonunion	Kemik iliği	İnsan	Perkütan kemik iliği greftlemesinde çoğu hastada iyileşme	Goel A ve ark.2005 <sup>31</sup>
Nonunion, gecikmiş iyileşme	Kemik iliği	İnsan	Perkütan kemik iliği greftlemesinde 72 hastanın 68'inde iyileşme	Siwach RC ve ark. 2001 <sup>33</sup>
Nonunion	Kemik iliği	İnsan	Perkütan kemik iliği greftlemesinde 60 hastanın 53'ünde iyileşme	Hernigou P ve ark. 2005 <sup>172</sup>
Femoral defekt	İnsan yağ dokusu	Rat	8 haftada iyileşme	Peterson B ve ark. 2005 <sup>173</sup>
Kraniyal kemik defekti	İnsan kemik iliği	Rat	İyileşmede hızlanma	Akita S ve ark. 2004 <sup>34</sup>
Segmental kemik Defekti	Kemik iliği	Tavşan	KMP-7 ve kemik iliği yüklü poröz matrikste en iyi sonuç	Borden M ve ark. 2004 <sup>166</sup>
Segmental kemik Defekti	Kemik iliği	İnsan	6 ayda iyileşme	Quarto R ve ark. 2001 <sup>174</sup>
Kemik defekti	Kemik iliği	Tavşan	Artmış osteogenezis	Louisia S ve ark.1999 <sup>175</sup>
Osteokondral defekt	Kemik iliği	Rat	Hyalin kırıktrak ve subkondral kemik oluşumu	Oshima Y ve ark. 2005 <sup>176</sup>
Eklem kırıktrak defekti	Otolog kondrositler	Domuz	Hyalin kırıktrak oluşumu	Chiang H ve ark. 2005 <sup>177</sup>
Tam kat osteokondral defekt	Kemik iliği	Tavşan	Tam iyileşme	Im GI ve ark. 2001 <sup>178</sup>
Epifiz defekti	Kemik iliği	Tavşan	Epifiz defektinde iyileşme	Ahn JI ve ark. 2004 <sup>179</sup>
Tam kat kırıktrak defekti	Kemik iliği	Tavşan	Kollajen jel ve MKH onarımında artma	Yanai T ve ark. 2005 <sup>180</sup>
Osteoartrit ve menisküs yaralanması	Kemik iliği	Keçi	Eklem harabiyetinde durma ve menisküs dokusunun rejenerasyonu	Murphy JM ve ark. 2003 <sup>181</sup>
Spinal füzyon	Kemik iliği	Köpek	Greft yaşayabilirliğinde artma	Muschler GF ve ark. 2003 <sup>182</sup>
Spinal füzyon	Kemik iliği	Tavşan	MKH yüklü poröz MKH'lerle daha iyi sonuç	Cinotti G ve ark. 2004 <sup>183</sup>

**Tablo 3:** Mezenkimal kök hücrelerin terapotik kullanımını destekleyen deneysel ve klinik yayınların derlemesi.

#### 2.4. TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA:

Trombosit Zengin Plazma (TZP), donörden alınan venöz kanın santrifüj işlemlerine tabi tutularak kan elemanlarından trombositlerin ayrıştırılmasıyla elde edilen, yumuşak ve sert dokularda hemostaz ve yara iyileşmesinde belirli avantajlar sağlayan bir ajandır. TZP; PDGF ve TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörlerinin otolog olarak elde edilmesi için yaygın olarak kullanılan bir metottür. Pıhtılaşma sürecinin başlatılması ve trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinden büyüme faktörlerinin salınması için, TZP'ye ihtiyaç duyulmaktadır<sup>184-188</sup>.

Trombositler pıhtı formasyonu nedeniyle yara iyileşmesinde gereklidir ve yara iyileşmesini başlatmak ve desteklemek için büyüme faktörlerinin salınmasından sorumludurlar<sup>185</sup>. Cerrahiden sonra, trombositler bölgede kalıcı bir kan pıhtısı oluştururlar. Doku oluşumu, iyileşmenin desteklenmesi ve artırılması için, büyüme faktörlerinin salınımı başlar. Diğer kemiklerde olduğu gibi maksillofasiyal bölgenin gelişmesinde de hormonların ve büyüme faktörlerinin çok önemli rolleri vardır. Kemik ve yumuşak doku metabolizması üzerinde sistemik hormonların ve büyüme faktörlerinin etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur<sup>93,189-199</sup>.

Yaralanma sonucunda damarsal yapıların bozulmasını trombosit agregasyonu ve fibrin formasyonu takip eder. Yaralanmadan sonra trombositler ve yakın olan komşu hücrelerden doku içerisine çok sayıda büyüme faktörü salınmaya başlar. Trombositlerdeki büyüme faktörleri etkilerini spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. TZP'nin osteojenik hücrelerin proliferasyonunu artırarak kemik formasyonu ve rejenerasyonu üzerinde güçlü bir stimülatör olabileceği düşünülmektedir<sup>185,200</sup>. Büyüme faktörlerinin lokal uygulanması, özellikle rejenerasyon olmak üzere iyileşmeyi arttırmaktadır. TZP' nin içerisinde PDGF, TGF-  $\beta$  ve IGF-I bulunduğunu gösteren pek çok çalışma vardır. Bu faktörlerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinden dolayı, kullanımı umut vaat etmektedir<sup>201</sup>.

### **Trombositten Zengin Plazmanın Avantajları**

Bu avantajlar sıralanacak olursa;

- 1-Alıcı ve verici alanda operasyon sırasında ve sonrasında kanamanın azalması
  - 2-Yumuşak doku iyileşmesinin hızlandırılmasına yardımcı olması
  - 3-Adeziv etkisi sayesinde alıcı sahadaki greft materyalinin stabilitesini artırması
  - 4-Büyüme faktörleri sayesinde iyileşmekte olan dokuların vaskülarizasyonunun hızlandırılması
  - 5-Kemik replasman materyalleri ile kombine kullanılarak rejenerasyonun artırılmasını sağlaması
  - 6-Toksik olmaması
  - 7-Orijinal donörden alındığında otojen materyal olduğu için, immün reaksiyona neden olmaması
  - 8-Operasyon sırasında veya öncesinde kısa sürede hazırlanması (operasyon sırasında zaman kaybına neden olmaz.)
  - 9-Doku uyumlu olması
  - 10-Enfeksiyöz hastalıkların geçiş riskinin bulunmamasıdır<sup>201,202</sup>.
- PDGF, TGF- $\beta$ , PDEGF, IGF I ve PF-4 trombositlerden salınan faktörlerdir. Büyüme faktörleri trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinden salınırlar<sup>185,186,200,203</sup>.

#### **I. PDGF (Platelet-derived growth factor=Trombosit kaynaklı büyüme faktörü):**

PDGF'ler trombositlerin  $\alpha$ -granüllerinde bulunurlar ve pıhtılaşma sırasında salınırlar. Aynı zamanda monositler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde de bulunurlar. Mezenkimal hücreler, düz kas hücreleri ve fibroblastlar için güçlü bir mitojenik etki gösterirler<sup>184,198,204,205</sup>. PDGF' nin etkisi diğer büyüme faktörlerinin varlığına bağlıdır. Aynı zamanda lökositler, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için güçlü bir kemoatraktandır<sup>184,198,200</sup>. Bunlara ek olarak, anjiyojenik özellikleri sayesinde kollajen ve matriks formasyonunu stimüle ederler<sup>2</sup>.

## **II. TGF- $\beta$ (Transforming growth factor- $\beta$ =Transforme edici büyüme faktörü- $\beta$ ):**

Moleküler ağırlığı 25.000 daltondur. İki polipeptit zincirinin disülfat bağı ile bağlanması ile meydana gelmiştir. TGF-  $\beta$ 1, TGF-  $\beta$ 2 ve TGF-  $\beta$ 3 olmak üzere üç farklı gen yapısında bulunur. Bunlardan TGF-  $\beta$ 1'in trombositlerde ve kemikte yüksek

konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir. TGF- $\beta$ , otokrin ve parakrin mekanizmalar ile etki gösteren önemli düzenleyici bir moleküldür<sup>205</sup>. TGF- $\beta$ 'nın faaliyetleri, sadece lokal ve çevresel etkilerle sınırlı değildir. Günümüzde, TGF-  $\beta$ 'ların endokrin sirkülasyonunun otoimmün hastalıklar ve kronik fibrotik patolojilerde önemli bir payı olduğu anlaşılmıştır. Ayrıca aterosklerozis ve karsinogenezisi de içeren pek çok hastalıkta prognostik marker olarak kullanılmaktadır. Makrofajlar veya trombositler tarafından salınan TGF- $\beta$ 'lar etkilerini yakındaki fibroblastlar, kemik iliği kök hücreleri, endotel hücreler ve preosteoblastlar üzerinde gösterirler<sup>184,205</sup>. TGF- $\beta$ 'lar anjiogenezisi, konnektif dokudaki fibronektin, glikozaminoglikan ve kollajen yapımını stimüle ederler. TGF-  $\beta$ 'nın en önemli fonksiyonlarından biri de, osteoblast prekürsörlerinin mitojenezi ve kemotaksisidir<sup>184,205</sup>. Bu polipeptit, aynı zamanda osteoklast yapımını ve rezorpsiyonu inhibe ederek kemik oluşumunu artırır<sup>184,205</sup>. TGF-  $\beta$  in vitro olarak PDGF ile birlikte fibroblastların büyümesini stimüle ederken, epidermal büyüme faktörü ile birlikte de inhibe etmektedir<sup>205</sup>.

## **III. PDEGF (Platelet-derived epidermal growth factor=Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü):**

Cohen tarafından 1962'de keşfedilmiştir ve tanımlanan ilk büyüme faktörüdür. Keratinositlerin ve dermal fibroblastların proliferasyonunu stimüle ederek, epidermal rejenerasyonu ve yara iyileşmesini hızlandırır. Bunun yanısıra diğer büyüme faktörlerinin üretimini ve etkilerini artırır<sup>205</sup>.

#### **IV. PDAF (Platelet-derived angiogenesis factor =Trombosit kaynaklı anjiogenezis faktör):**

Deneysel olarak PDAF'ün vaskülarizasyonu (damarlanmayı) arttırıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir<sup>205,207</sup>. Vasküler endotelial hücreleri direkt veya indirekt yoldan etkilerler. Devaskülarize dokularda yeni kan damarlarının gelişmesini sağlarlar. Bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin düzenlenmesi PDAF tarafından yapılır. Bunlar, IGF-I, TGF  $\alpha$  ve  $\beta$ , PDGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), PDEGF ve interlökin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) dir. Bu faktör, hipoksi durumunda oldukça hızlı bir şekilde bölgede yerini alır<sup>205</sup>.

#### **V. IGF-I (Insulin-like growth factor-I=İnsülin benzeri büyüme faktörü):**

Ağırlığı 7.500 dalton olan tek zincirli polipeptit bir hormondur. IGF-I insülin ile %47 homoloji (benzerlik) gösterir. Kıkırdak büyümesini, kemik matriks oluşumunu, preosteoblast ve osteoblastların replikasyonunu stimüle eder<sup>190,205,208</sup>. IGF-I hücreleri direkt olarak stimüle edebilir. Osteoblastik hücrelerdeki alkalen fosfataz aktivitesini arttırır ve aktive eder (otokrin etki)<sup>205,208</sup>. IGF-I transkriptleri yaradaki makrofajlardan izole edilmiştir. Bu da, büyüme faktörlerinin lokal haberci (parakrin etki) olarak hareket edebileceğini düşündürmektedir. IGF-I'in PDGF ile kombinasyonu, yara iyileşmesinin kalite ve kantitesini arttırabilir.

#### **VI. PF-4 (Platelet factor 4=Trombosit faktör 4):**

Trombositlerin  $\alpha$  granüllerinden salınan PF-4 nötrofiller ve fibroblastlar için bir kemoatraktandır. Aynı zamanda güçlü bir antiheparin ajandır.

Kanno ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada TZIP uygulamasının, doz ve zamana bağlı bir modelde osteoblast benzeri hücrelerin 2 farklı tipinde proliferasyonu önemli oranda arttırdığını göstermişlerdir<sup>184</sup>.

- **TZIP Kullanımının Olası Riskleri:**

Elde edilen TZIP'nin jel haline getirilmesi için, kalsiyum klorid veya topikal bovin trombin (TBT) kullanılmaktadır. TBT'nin kullanımı ile ilgili olarak, hayatı tehdit etme riski olan koagülopatilere neden olabilecek faktör 5, 11 ve

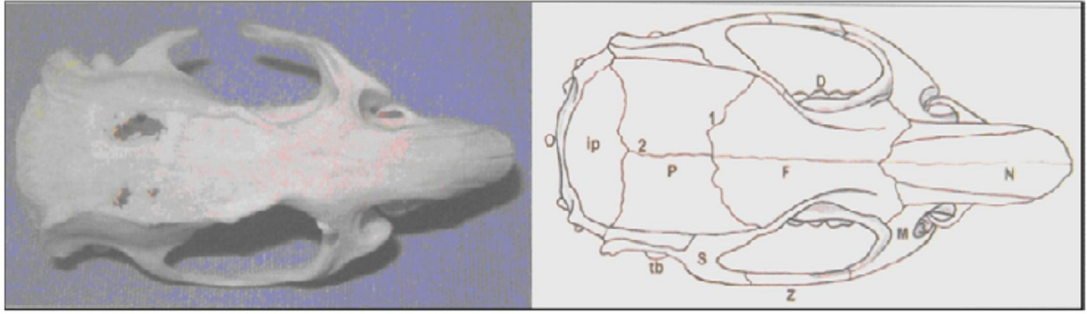
trombin antikorlarını harekete geçirebileceği rapor edilmiştir<sup>204,205</sup>.TBT ürünleri, yabancı protein ile ortaya çıkan ve immün sistem reaksiyonuna neden olabilecek faktör-5 içermektedir. Kardiyovasküler cerrahi hastalarında, TBT'nin meydana getirdiği koagülopatilerle ilgili yayınlanmış 32 olgu raporu vardır<sup>205</sup>. Ancak son yıllarda buna ITA jelleştirici ajan (Natrex Technologies Inc. Greenville NC) eklenmiştir<sup>204</sup>. Landesberg ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada TZP jel elde etmede 2 farklı yöntemi ve her bir yöntemde elde edilen PDGF ve TGF- $\beta$  miktarını karşılaştırmışlardır. TZP jel, santrifüj yoluyla elde edilen TZP'ye trombin ve kalsiyum klorit eklenerek veya ITA jelleştirici ajan kullanımı ile pıhtılaştırılarak hazırlanmıştır. Her iki metod ile TZP jel elde edilmesi 30 dakikadan az bir süre almıştır. ITA jelleştirici ajan kullanıldığında, bovin trombine gerek kalmadan yeterli miktarda jel başarıyla elde edilmiştir. Ayrıca her iki metodla da aynı miktarda PDGF ve TGF- $\beta$  elde edilmiştir.

Araştırmacı, jel hazırlanması için ITA jelleştirici ajan kullanımının kalsiyum klorit ve trombin ile aynı miktarda jel elde edilmesini sağladığını da eklemiştir. Araştırmacı göre, bu teknik özel bir ekipman gerektirmemekte ve koagülopati riskini ortadan kaldırmaktadır<sup>204</sup>.

## 2.5. RAT KAFATASI ANATOMİSİ

Laboratuvar sıçanı, tipik bir omurgalıdır. İskelet sistemi 'aksiyal' ve 'appendiküler' bölümlere ayrılır. Aksiyal iskelet, kafatası, omurga, sternum ve kaburgaları, appendiküler iskelet ise pektoral kavşak, üst ekstremitte, pelvis ve alt ekstremitteyi kapsar. Uzun nazal kemik yapının arkasında kafatası boşluğunun tavanını yapan frontal ve parietal kemikler bulunur. Parietal kemik ile oksipital kemik arasında interparietal kemik vardır (Şekil 5).





**Şekil 5:** Sıçan kafatasının yukarıdan görünümü **D:** Molar dişler **F:** Frontal kemik **M:** Maksillanın zigomatik çıkıntısı **N:** Nazal kemik **O:** Oksipital kemik **P:** Parietal kemik **S:** Skuamoz kemik **İP:** İnterparietal kemik **tb:** Timpanik bulla **1:** Koronal suture **2:** Sagittal suture **3:** İnfraorbital fissür (Bayramiçli M. 2005)<sup>209</sup>.

## 2.6. KRİTİK BÜYÜKLÜKTE KEMİK DEFECTİ

Schmitz and Hollinger, 1986 yılında 'kritik büyüklükteki kemik defekti'ni tanımlamışlardır<sup>210</sup>. 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<sup>6</sup>. Bu defektler kemik iyileşme modellerinde kullanılırlar. Sıçanlarda kabul edilen kritik büyüklükteki kraniyal kemik defekti "8 mm çapındaki bir dairesel tam kat kemik defekti" olarak tanımlanmıştır<sup>210,211</sup>. Sıçanlarda kritik büyüklükteki kraniyal kemik defektinin primer fibröz kallus dokusu ile dolduğu ancak üç aylık periyotta minimal bir kemikleşmenin olduğu tespit edilmiştir<sup>210-212</sup>. Fakat bazı çalışmalarda ise sıçan kafatasındaki kritik büyüklükteki kemik defekti "6 mm" olarak tanımlanmıştır<sup>212,213</sup>.

Enfekte olmayan ve stabilize bir defekt için;

1. Hayvanın türü
2. Hayvanın yaşı
3. Deneysel olarak oluşturulan defektin anatomik lokalizasyonu
4. Defektin büyüklüğü
5. Periostun intakt olması önemlidir<sup>214-217</sup>.

Kritik boyut defekti oluşturulacak deneylerde kemik rejenerasyonunun güvenilir bir şekilde test edilebilmesi için<sup>217</sup>;

- 1- Deneysel olarak oluşturulacak kemik defektinin minimal boyutu, her hayvan türü için belirlenmiş kritik boyuttaki kemik defektinden daha küçük olmamalıdır.
- 2- Deney hayvanları pahalı olmamalıdır.
- 3- Kolay elde edilebilmeli, manuplasyon ve anestezisi kolay olmalıdır.
- 4- İmplant sahası hem kortikal hem de kansellöz kemiği içermelidir.
- 5- Kemik defekti stabil olmalı, materyallerin hareketine izin vermemelidir.
- 6- Kırık riski en aza indirilmelidir.
- 7- Deney hayvanlarının takipleri tam ve doğru olarak yapılmalıdır.

### 3.GEREÇ VE YÖNTEM

Yaptığımız tez çalışmamız<sup>\*\*</sup>, deneysel bir araştırma olup kıyaslamalı gruplar elde edilmiş ve sonuçlar farklı açılardan değerlendirilmiştir.

Ayrıca bu araştırmamız multidisipliner bir çalışma olup, farklı bölümlerin ve araştırma merkezlerinin katkılarıyla, planlanan hedefler ve yöntemler objektif olarak şekillendirilmiştir. Araştırmamızın aşamaları ve multidisipliner yaklaşımla çalıştığımız bölümler sıralanacak olursa;

1. Araştırmamızda kullanılan mezenkimal kök hücreler (MKH) Kocaeli Üniversitesi Genetik Araştırma Merkezi'nde 200–240 gr ağırlığında Wistar Albino 4 aylık dişi ratlardan elde edilerek, operasyonlar için kullanılabilir şekilde hazırlanmış ve dondurulmuştur.
2. Hazırlanan dondurulmuş MKH'lerin çözülmesi, operasyonlarda kullanılabilir hale getirilmesi ve mikroskopik incelemesi için Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Döllenme ve Suni Tohumlama Laboratuvarında deneyimli bir ekiple çalışmalar devam ettirilmiştir.
3. Deney gruplarında kullanılan greft materyallerinden biri olan Trombositten Zengin Plazma (TZP) ise, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında hazırlanmıştır.
4. Araştırmamızda deney hayvanı olarak 200–240 gr ağırlığında Wistar Albino 4 aylık dişi ratlar kullanılmıştır. Bu ratların operasyonları, Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Araştırma Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Ameliyathanesinde yapılmış olup; bakım, barınma ve takipleri de aynı Araştırma Merkezinde sürdürülmüştür.
5. Sakrifiye edilen ratlardan alınan spesmenlerin boyanması, histolojik ve immunohistokimyasal değerlendirilmeleri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır.
6. İstatistiksel analiz Dicle Üniversitesi Halk Sağlığı Anabilim Dalı'nda SPSS 11.5 paket programı kullanılarak yapılmıştır.

---

\* Tez Çalışmamız Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (DÜBAP) tarafından 09-DH-07 numarasıyla desteklenmiştir.

\* Tez Çalışmamız Dicle Üniversitesi Deney Etik Kuruluna proje olarak sunulmuş olup, etik kurul onayı alınmıştır (DEHEK: 09-07).

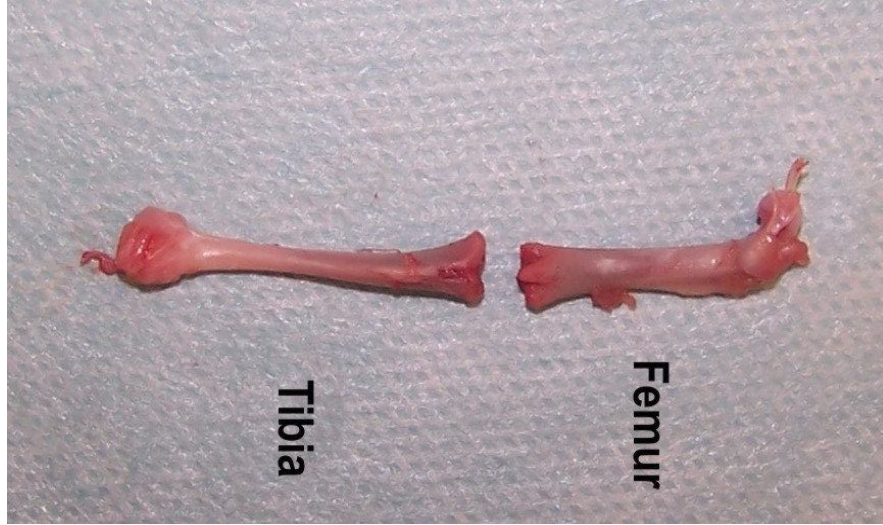
Araştırmamız, birbirini takip eden aşamalardan oluşmaktaydı. Bu aşamalar sıralanacak olursa;

1. Önce sıçan kemik iliğinden MKH izolasyonu yapılarak kültüre edildi.
2. Operasyon yapılan günde implante edilecek TZP hazırlandı.
3. Hazırlanan MKH, TZP ve Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri deney hayvanlarının kalvaryumunda oluşturulan kritik boyut defektlerine implante edildi.
4. Deney hayvanları 2., 8., ve 12. haftalarda kurban edilerek, elde edilen spesmenlerin histolojik ve immunohistokimyasal incelemeleri yapıldı. Sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirildi.

Deneyel çalışmamızda 100 adet Wistar Albino tipi dişi ratlar tek tek uygun kafeslerde,  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta ve 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırılmıştır. Deneklerin beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

#### **A. SIÇAN KEMİK İLİĞİ MEZENKİMAL KÖK HÜCRELERİNİN İZOLASYONU VE KÜLTÜRE EDİLMESİ**

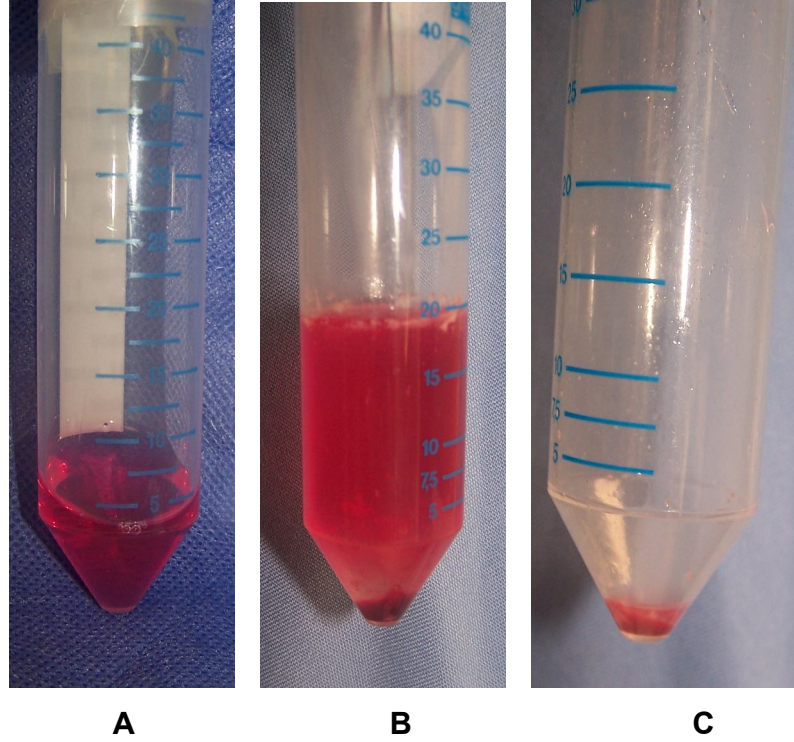
Çalışmamızın bu bölümünde, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Biriminden (DETAB) temin edilen 200-260 gr ağırlığında 20 adet Wistar Albino cinsi erişkin dişi sıçan kullanıldı. Denekler Ketamin-HCl (Alfamine®) (50 mg/kg i.m) ve Xylazine (Rompun®) (5 mg/kg i.m) anestezisi ile uyutuldu. Deneklerin femur ve tibia bölgeleri traş 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 (Resim 1). İşlem sonunda deneklere 2 cc intrakardiyak Lidokain HCL (Jetokain simplex®) enjeksiyonu yapılarak ötenazi sağlandı.



**Resim 1** : Mezenkimal Kök Hücre elde etmek için eksize edilmiş rat femur ve tibiası görünümü.

### **Kemik İliği Mononükleer Hücrelerinin İzolasyonu**

1. Kemiklerin metafiz kısımlarından osteotomi yapılarak kemik iliği parçaları 'Dulbeccosminimum essential medium' (DMEM) solüsyonu ile flasklanarak 50 ml'lik konik tüpler içine kondu (Resim 2-A).
2. Kemik iliğini içeren DMEM solüsyonu, volümünün 1:3'ü kadar 'Ficoll pague' içeren 50 ml'lik konik tüpler içerisine steril pipetle açılı ve hassas bir şekilde eklendi.
3. Ficoll ve kemik iliği aspiratı arasındaki sınırın karışmamış-pürüzsüz olduğu görüldü.
4. Ficoll ve kemik iliğini içeren tüpler, oda ısısında 400 G'de 30 dakika süreyle santrifüj edildi.
5. Santrifüj sonrası en üstte plazma, ortada mononükleer hücreler, altta ficoll ve en altta eritrosit ile granüositler kümeleşti (Resim 2-B).
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 işlemden sonra elde edilen hücre peleti, mezenkimal kök hücre elde etmek amacı ile kullanıldı (Resim 2-C).



**Resim 2:** **A:** DMEM solüsyonu içindeki kemik iliği parçalarının görünümü. **B:** Santrifüj sonrası en üstte plazma ve ortada mononükleer hücrelerin kümeleşmesi. **C:** Ficoll'un uzaklaştırılmasından sonra elde edilen hücre peletinin görünümü.

### Mezenkimal Kök Hücrelerin İzolasyonu

8. Bu hücre peleti üzerine 10 ml 'komplet medium' (%30 fetal bovine serum "FBS" ve %1 antibiyotik içeren DMEM) eklenerek, 25 ml'lik flask içinde %5 CO<sub>2</sub> içeren 37°C'lik etüvde inkübasyona alındı (Resim 3).



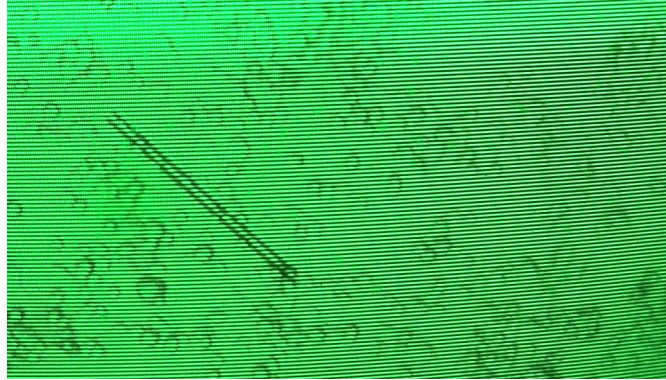
**Resim 3:** 10 ml komplet medium içeren 25 ml'lik flaskın görünümü.

9. İnkübasyonun 48. saatinde tüm komplet medium aspire edilerek, yapışmayan hücreler ortamdaki uzaklaştırıldı ve taze 10 ml komplet medium eklendi.

10. İlk 48 saatten sonraki her üç günde bir flask içindeki medium içerik tamamen dışarı atılarak, yeni 10 ml komplet medium eklendi.

11. İnkübasyonun 7. gününde flask inverted mikroskopta incelemeye alınarak, fibroblast karakterli kolonilerin var olup olmadığı kontrol edildi.

12. 14. gün inverted mikroskopta incelenen hücrelerin hemen hemen tüm flaskın zeminini kaplayarak, flaskın zemin görüntüsünü konfluent hale getirdiği saptandı ve flaskın tüm medium içeriği ortamdaki uzaklaştırıldı (Resim 4).



**Resim 4:** 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 oranında ilave edilerek 37°C'de 10 dakika süreyle inkübe edildi.

16. Bu aşamada yapışan hücreler ayrıldı, ancak halen 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 'Fetal Bovine Serum' ilave edildi.

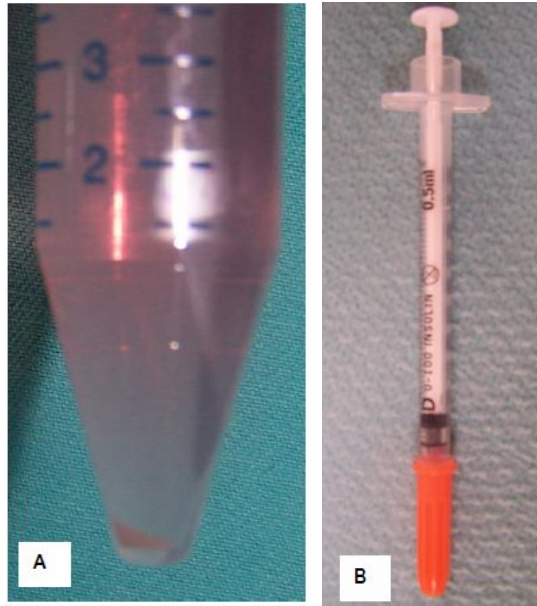
19. Elde edilen hücre süspansiyonu 800 G'de 10 dakika süreyle santrifüje edildi ve komplet medium ile iki kez yıkandı (Resim 5A).

### 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, tripsinizasyon aşaması ve tanımlanan şekilde pasaj işlemleri 2 kez daha tekrarlandı.

22. Üçüncü pasajın dördüncü günü, hücreler tripsinizasyon ile flasktan alınıp yıkandıktan sonra 10 $\mu$ l DMEM içinde 0,5X10<sup>6</sup> / $\mu$ l konsantrasyonda olacak şekilde 0,5 ml'lik insülin iğnelere konularak kullanıma hazır hale getirildi (Resim 5B).

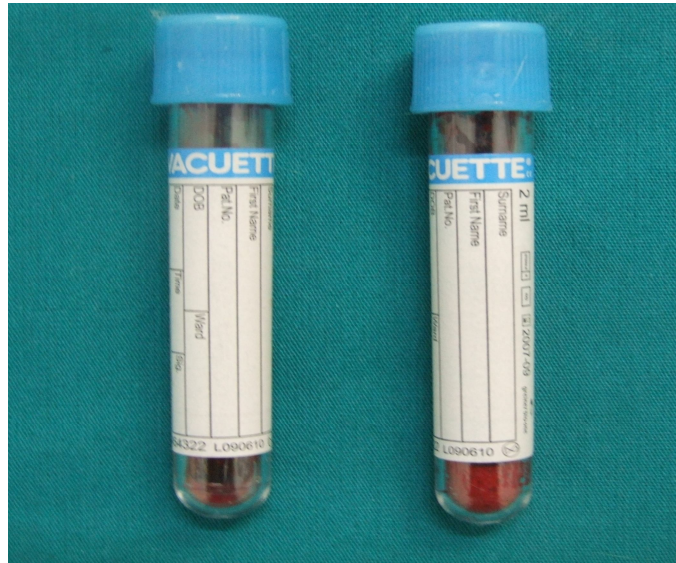


**Resim 5A:** Hücre süspansiyonununun 800 G'de 10 dakika süreyle santrifüj sonrası görünümü **B:** Mezenkimal kök hücrelerin insülin iğnelere konularak kullanıma hazır hale getirilmiş görünümü.



## B. TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMANIN HAZIRLANMASI:

10 adet ratın anestezisi Ketamin-HCl (Alfamine®) (50 mg/kg i.m) ve Xylazine'in (Rompun®) (5 mg/kg i.m) intramusküler enjeksiyonu ile sağlandı. Anestezi sağlandıktan sonra, ratın tüm kanı intrakardiyak olarak enjektörle çekildi ve bu kan sodyum sitrat tüplerine (4,5 ml) boşaltıldı (Resim-6). Tüpteki bu kanlar daha sonra D.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında 1200 rpm'de 10 dakika santrifüje edildi (CS-15 Centrifuge, Heraeus, Labofuge Ae) (Resim-7,8). Ratların vücuttaki tüm kanı intrakardiyak olarak alındığı için, bu esnada sakrifiye işlemi de tamamlandı. Bu yöntemle TZP (trombositten zengin plazma) ve TFP'nın (trombositten fakir plazma), kırmızı kan hücre fraksiyonlarından ayrılarak en üstte toplanması sağlandı. TZP ve TFP başka bir tübe alındı ve bunları birbirinden ayırmak için tekrar 7385 rpm'de 5 dakika santrifüje edilip, konsantrasyonu artırılmış trombositten zengin plazma elde edildi. Elde edilen TZP'nin hücre sayısı yapıldığında  $1.600.000 \text{ mm}^3$  bulundu.



**Resim 6:** Sodyum sitrat tüpündeki rat kanı



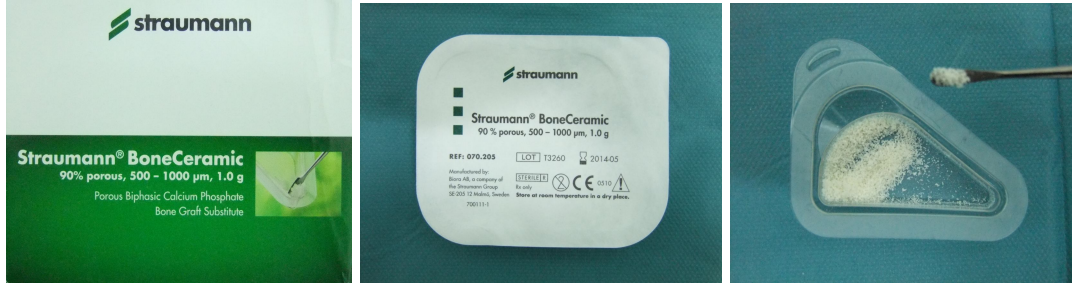
**Resim 7: Santrifüj cihazı**



**Resim 8: Santrifüj işlemi**

### C. BİFAZİK KALSİYUM FOSFAT SERAMİKLERİ

Araştırmamızda kullandığımız Bifazik kalsiyum fosfat seramiğinin partikül boyutu 500-1000 µm olup, tamamen sentetik bir grefttir (Straumann-Bone Ceramic®). Bu seramik greftin bileşiminde % 60 oranında hidroksilapatit (HA) ve % 40 oranında ise β-Trikalsiyum fosfat (β-TCP) bulunmaktaydı (Resim-9).



**Resim 9:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft materyalinin görünümü (Straumann® Bone Ceramic).

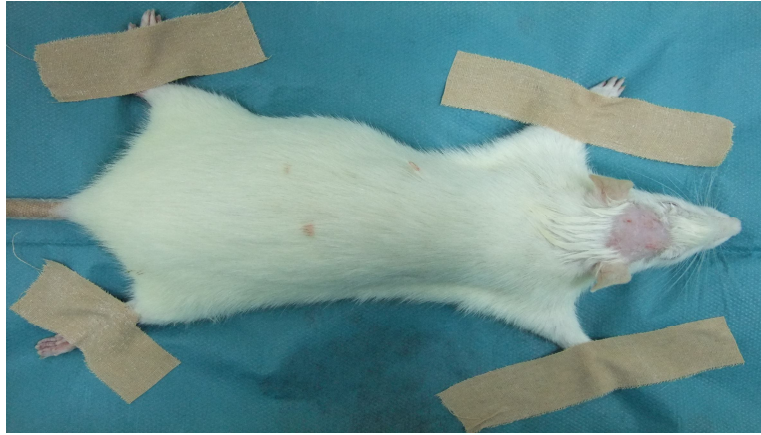
### D. CERRAHİ OPERASYONLAR VE DEFEKTLERİN REKONSTRÜKSİYONLARI

DeneySEL çalışmamızın üçüncü aşaması, 100 adet Wistar Albino tipi dişi rat üzerinde gerçekleştirilmiştir. 10 rat TZP'nin elde edilişi sırasında kullanılmış olup, kalan 90 rat ise 5 gruba ayrılmıştır.

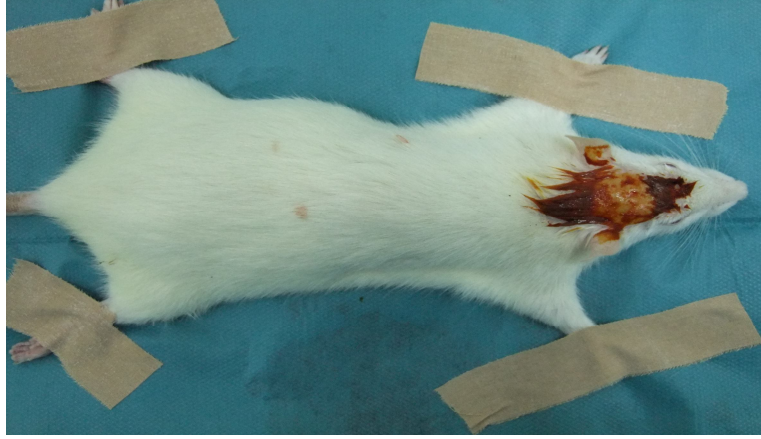
- I. Grup kontrol grubu olarak kullanılacaktır.
- II. Çalışma grubunda sadece bifazik kalsiyum fosfat seramik materyali,
- III. Çalışma grubunda bifazik kalsiyum fosfat seramiği ve trombosit zengin plazmanın kombinasyonu,
- IV. Çalışma grubunda bifazik kalsiyum fosfat seramiği ile mezenkimal kök hücre kombinasyonu ve
- V. Çalışma grubunda ise bifazik kalsiyum fosfat seramiği, trombosit zengin plazma ve mezenkimal kök hücre kombinasyonunun kullanılması planlanmıştır.

Her çalışma grubunda **21 rat** yer alacaktır. 1. grupta ise yalnızca **6 rat** değerlendirilecektir.

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 traş edilerek %10'luk 'povidon iodine' solusyonu ile antisepsi sağlandı (Resim 10, 11). Sonrasında orta hatta cerrahi bisturi yardımıyla longitüdinale bir cilt insizyonu yapıldı ve elevasyonlar ile frontal kemik ortaya çıkartıldı (Resim 12). Elevasyonları takiben özel olarak tasarlanmış 'trephen frez' ile kalvaryumun orta hattında 7 mm çapında dairesel tam kat kemik kesisi oluşturuldu (Resim 13, 14). İşlem sırasında duranın korunmasına özen gösterildi (Resim 15). Oluşturulan 7 mm çapında dairesel tam kat kemik defekti her deney grubu için farklı implantasyonlara tabi tutuldu. İşlem sonunda periost oluşturulan defekt üzerine tekrar örtülerek 6/0 Vicryl® ile, cilt insizyonu ise 5/0 ipek suture ile suture edildi (Resim 16,17).



**Resim 10:** Her grupta anestezi sağlandıktan sonra enseden alına kadar traşlanan ratın, çalışma masasına sabitlenmiş görünümü.



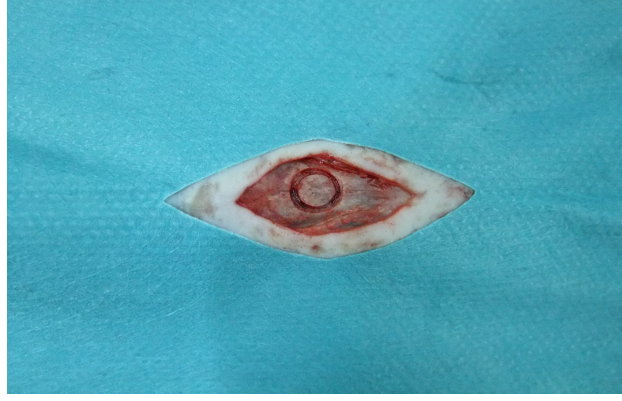
**Resim 11:** %10'luk 'povidon iodine' solusyonu ile cerrahi alanın antisepsisinin sağlanmış görünümü.



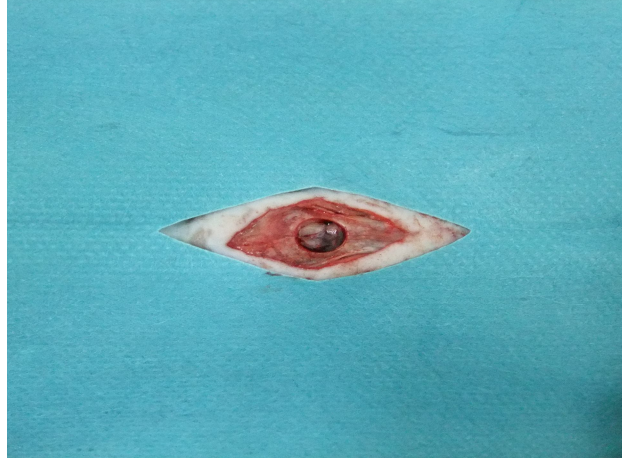
**Resim 12:** Orta hat longitudinal bir deri insizyonu yapılarak frontal kemiğin ortaya çıkartılmış görünümü.



**Resim 13:** A: 7 mm çapında özel olarak tasarlanmış trephen frez.  
B: Trephen frez takılmış angulduurva görünümü.



**Resim 14:** 7 mm çapında dairesel tam kat kemik kesisinin görünümü.



**Resim 15:** Dura korunarak oluşturulmuş, dairesel tam kat kemik defektinin görünümü.



**Resim 16:** İşlem sonunda 6/0 Vicryl® ile dikilen periost dokusunun görünümü.



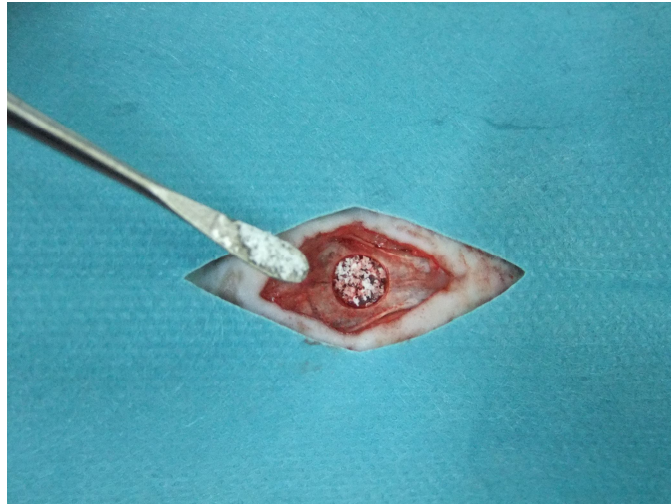
**Resim 17:** Cilt insizyonunun 5/0 ipek suture ile kapatılmış görünümü.

### **E. DENEY HAYVANLARININ GRUPLANDIRILMASI**

Araştırmamızda kullanılan denekler 5 gruba ayrıldı:

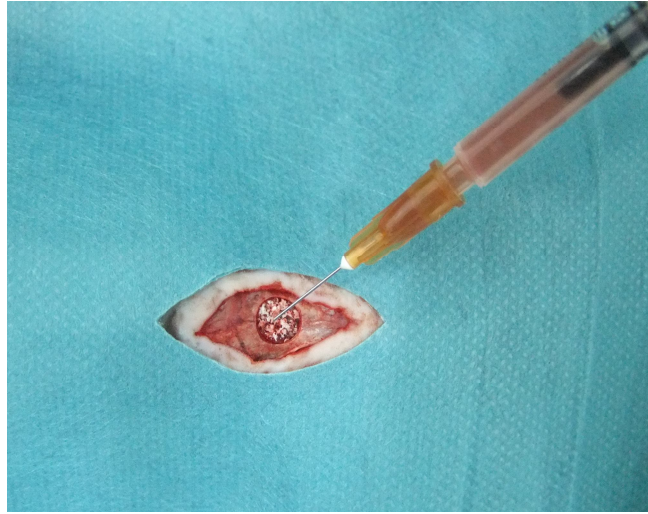
**Grup I (Kontrol grubu – 6 adet):** Oluşturulan tam kat kemik defektlerine ek bir işlem yapılmadı. Defekt boş bırakılarak periost 6/0 Vicryl® ile, cilt insizyonu ise 5/0 ipek ile suture edildi (Resim 16, 17).

**Grup II (Deney Grubu II – 21 adet):** Oluşturulan tam kat kemik defektlerine çapı kadar Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri (Straumann Bone Ceramic®) yerleştirildi (Resim 18). Greftle rekonstrükte edilen defekt, kollojen membran ile örtüldü. Periost, oluşturulan defekt üzerine örtülerek 6/0 Vicryl® ile, cilt insizyonu ise 5/0 ipek ile suture edildi (Resim 16,17).



**Resim 18:** Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri ile doldurulmuş kemik defektinin görünümü.

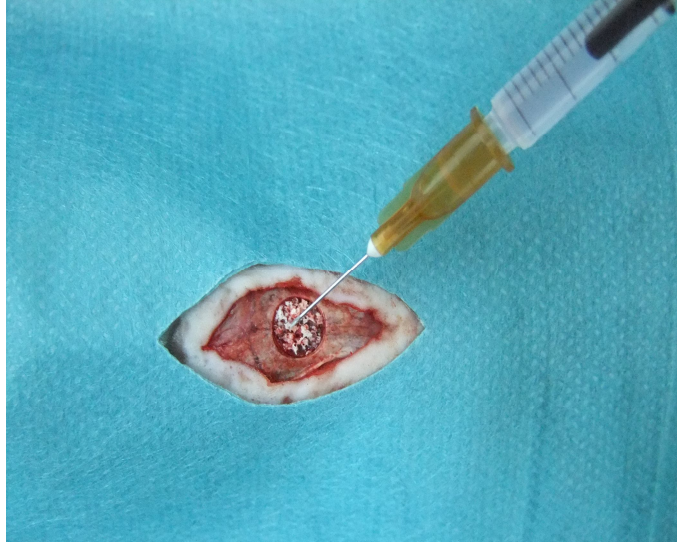
**Grup III (Deney Grubu III – 21 adet):** Oluşturulan tam kat kemik defektleri Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramikleri (Straumann® Bone Ceramic) ile dolduruldu. Önceden hazırlanmış olan TZP, insülin enjektörü yardımı ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verildi (Resim 19). Greft ve TZP ile doldurulan defektin üzeri kollojen membran ile örtüldü. Periost ve cilt insizyonları primer olarak sütüre edildi (Resim 16,17).



**Resim 19:** TZP'nın insülin enjektörü yardımı ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verilmesi

**Grup IV (Deney Grubu IV – 21 adet):** Oluşturulan tam kat kemik defekti Bifazik kalsiyum fosfat seramikleri (Straumann Bone Ceramic®) ile dolduruldu. Mezenkimal kök hücreler 0,5 ml'lik insülin enjektörü yardımı ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verildi (Resim 20). Greftle doldurulan defekt kollojen membran ile örtüldü. Periost ve cilt insizyonları primer olarak sütüre edildi (Resim 16,17).





**Resim 20:** Mezenkimal kök hücrelerin insülin enjektörü ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verilmesi

**Grup V (Deney Grubu V – 21 adet):** Oluşturulan tam kat kemik defekt çapı kadar Bifazik kalsiyum fosfat seramikleri (Straumann Bone Ceramic®) ile dolduruldu. Mezenkimal kök hücreler 0,5 ml'lik insülin enjektörü yardımı ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verildi (Resim 20). Önceden hazırlanmış olan TZP de, insülin enjektörü yardımı ile defekt alanındaki greft materyalinin üzerine verildi (Resim 19). Greftlerle doldurulan defekt, kollojen membran ile örtüldü. Periost ve cilt insizyonları primer olarak suture edildi (Resim 16,17).

## F. DENEYİN ÇALIŞMA SÜRESİ

Çalışmamızda 2. haftada yeni oluşacak kartilaj dokusunun saptanması; 8. haftada yeni kemik ve doku alanlarının değerlendirilmesi ve 12. haftada ise kullanılan materyallerin değerlendirilmesine ek olarak mezenkimal kök hücrenin yeni oluşacak kemik dokusuna etkisinin, kemik kalitesinin ve rejenerasyonun değerlendirilmesi planlandı.

## G.DENEYİN SONLANDIRILMASI

Deneyin 2. haftasında, her gruptaki ratların üçte biri (I.gruptan 2 adet; II., III., IV. ve V.gruptan 7'şer adet) ketamin-HCl (50 mg/kg-IM) anestezisi ile uyutulup, 2 cc intrakardiyak Lidokain HCL (Jetokain simplex®) enjeksiyonu yapılarak ötenazi sağlandı.

Aynı işlem deneyin 8. ve 12. haftasında da tekrarlandı.

## H. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME

Ötenaziyi takiben ense bölgesinden açılan horizontal kesi ile kalvaryum üzerindeki cilt tamamen kaldırıldı. Çalışma yapılan defekt alanı, etrafında sağlam kemik olacak şekilde kemik forsepsi ile bölgeden ayrılarak alındı. Alınan spesmen %10'luk formalin solüsyonuna konuldu. Dokular Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında histolojik incelemeler için Gomori Masson Trikrom üçlü boyama sistemi ile boyanırken; immunohistokimyasal incelemeler içinse osteonectin-osteopontin boyaları ile peroksidaz-antiperoksidaz yöntemiyle boyandı ve ışık mikroskopunda değerlendirildi.

### A. Gomori Masson Trikrom Boyama Protokolü

1. Dokular ksilolde deparafinize edildi.
2. Absolit alkolde 3-5 dakika bekletildi.
3. %95'lik alkolde 5 dakika bekletildi.
4. Distile suyla çalkalandı.
5. 56°C etüvde bouin solüsyonunda 1 saat bekletildi.
6. Çeşme suyunda iyice yıkandı.
7. Weigert hematoksileninde 10 dakika bekletildi.
8. Tekrar çeşme suyunda yıkandı.
9. Trikrom-Masson boyasında 15-20 dakika bırakıldı.
10. % 0,5 asetik asitli suda 2 defa diferansiye edildi.
11. % 95'lik alkolde 5 dakika bekletildi.

12. Absolit alkolde 5 dakika bekletildi.
13. Ksilolde şeffaflaştırıldı.
14. Entalenle kapatıldı.

## **B. İmmünohistokimyasal Boyama Protokolü**

### **1. Osteonektin İmmün Boyama Yöntemi**

Formalin fiksatif ile tespit edilen dokular, parafin bloklara alındıktan sonra 5µm kalınlığında kesitler elde edildi. Alınan kesitler bir gece 37C° lik etüvde bekletildi. Bu işlemin ardından, 58C° ye ayarlanmış etüve alınıp bir saat kadar da burada bekletildi. Ardından 2x15 dakika ksilolden geçirilip, 10'ar dakika, sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinde de rehidratasyonu sağlandı. 2x5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, antijen retrieval işlemi için önerilen EDTA (Merck,Germany) solüsyonuna alınıp, mikrodalga fırın içine konuldu. 3x5 dakika ışınlanmadan sonra fırından çıkarılan kesitler, oda sıcaklığında soğumaları için beklendi. Distile sudan geçirilen dokular, immunohistokimyal barına dizilip, kesitlerin üzerine 3x3 dakika PBS damlatıldı. Kesitlerin üzerindeki PBS alınıp, üzerine hidrojen peroksit blokaj solüsyonu (1ml %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 9ml metanol) damlatılıp, 20 dakika inkübe edildi. Ardından PBS ile 3x5 dakika yıkama yapıp, Ultra V Block (keçi, non-immun serum) solüsyonunda 10 dakika bekletildi. 1/50 dilüsyon ile hazırlanan primer antikor Osteonektin (Santa Cruz) damlatılıp bir gece +4C° de inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine sekonder antikor damlatılıp, 10 dakika kadar inkübe edildi. Daha sonra treptavidin-peroxidase damlatılıp 10 dakika beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Yıkanan kesitlerin üzerine DAB (Invitrogen) damlatılıp 12 dakika beklendi, reaksiyon mikroskop altında izlenerek, PBS ile durduruldu. Harris hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler entelan ile kapatılıp, Olympus BH-2 fotomikroskobunda değerlendirilerek, görüntülendi.

## 2. Osteopontin İmmün Boyama Yöntemi

Formalin fiksasyonu ile tespit edilen dokular, parafin bloklara alındıktan sonra 5µm kalınlığında kesitler elde edildi. Alınan kesitler bir gece 37C° lik etüvde bekletildi. Bu işlemin ardından, 58C° ye ayarlanmış etüve alınıp bir saat kadar da burada bekletildi. Ardından 2x15 dakika ksilolden geçirilip, 10'ar dakika sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinde de rehidratasyon sağlandı. 2x5 dakika distile sudan geçirildikten sonra, antijen retrieval işlemi için önerilen Citrate Buffer (pH:6.0, Sigma, Deutschland) solüsyonuna alınıp, mikrodalga fırın içine konuldu. Başlangıçta 7, daha sonra 5 dakika ışınlanmadan sonra fırından çıkarılan kesitler, oda sıcaklığında soğumaları için bekletildi. Distile sudan geçirilen dokular, immunohistokimyal barına dizilip, kesitlerin üzerine 3x3 dakika PBS damlatıldı. Kesitlerin üzerindeki PBS alınıp, üzerine Hidrojen peroksit blokaj solüsyonu (1ml %30 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 9ml metanol) damlatılıp 20 dakika inkübe edildi. Ardından PBS ile 3x5 dakika yıkama yapıp, Ultra V Block (keçi, non-immun serum) solüsyonunda 10 dakika bekletildi. 1/50 dilüsyon ile hazırlanan primer antikor osteopontin (Santa Cruz) damlatılıp bir gece +4C° de inkübasyona bırakıldı. Bu işlemin ardından PBS ile yıkanan kesitlerin üzerine sekonder antikor damlatılıp 10 dakika kadar inkübe edildi. Daha sonra treptavidin-peroxidase damlatılıp 10 dakika beklendikten sonra PBS ile yıkama yapıldı. Yıkanan kesitlerin üzerine DAB (Invitrogen,) damlatılıp 12 dakika beklendi, reaksiyon mikroskop altında izlenerek, PBS ile durduruldu. Harris hematoksilen ile zıt boyama yapıldıktan sonra kesitler entelan ile kapatılıp, Olympus BH-2 fotomikroskopunda değerlendirilerek, görüntülendi.

## I. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS 11.5 paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (sıklık dağılımları) yanısıra nitel verilerin karşılaştırmalarında da ki-kare (Chi Square) testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde osteosit yoğunluğu ve osteonektin-osteopontin boyanma pozitifliği açısından değerlendirilmiştir.

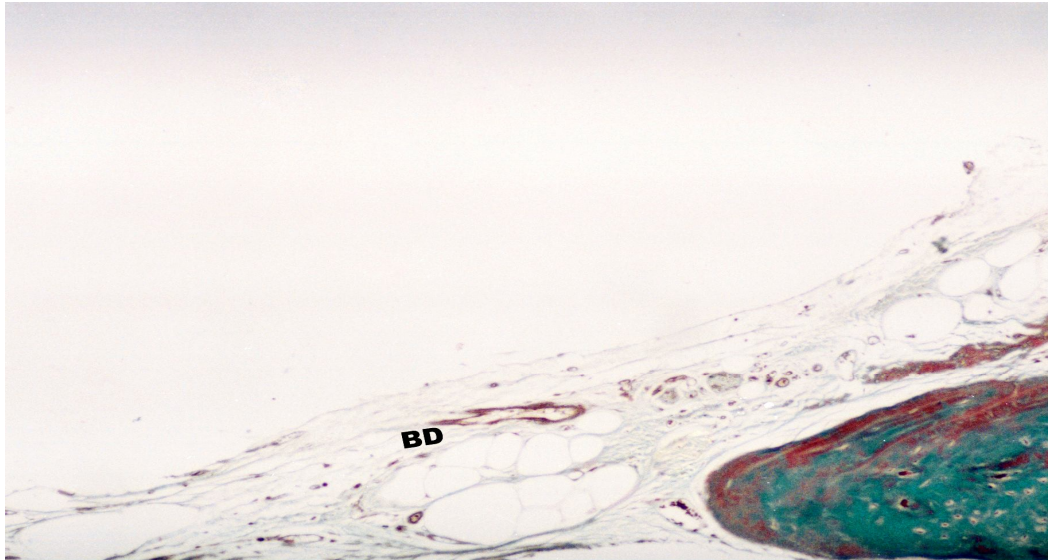
## 4. BULGULAR

### A) HİSTOLOJİK VE İMMÜNOHİSTOKİMYASAL BULGULAR

#### 2.HAFTA BULGULARI

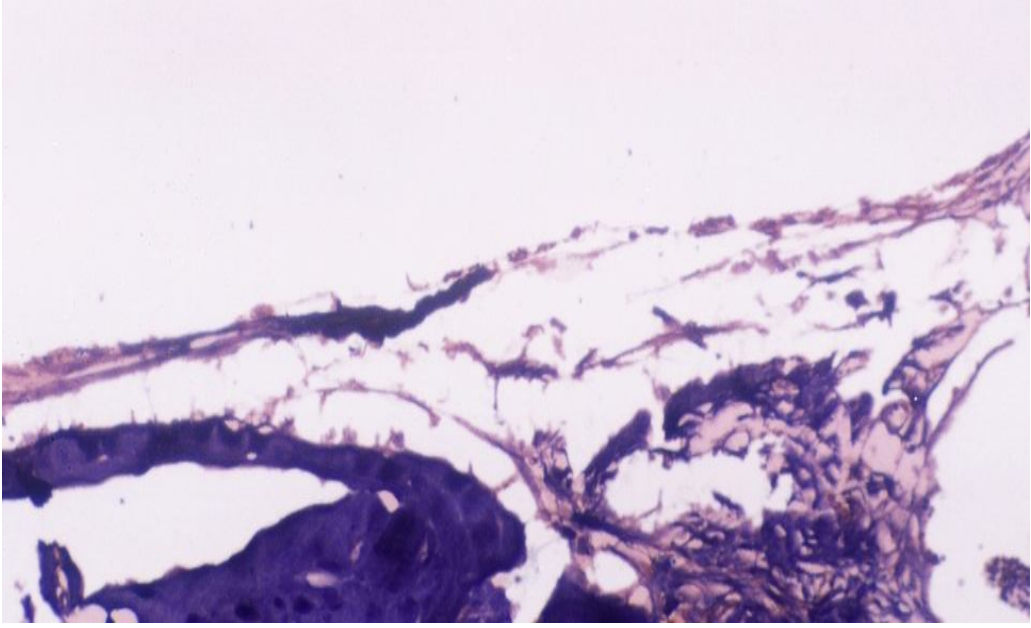
##### 1. Kontrol Grubu:

Bu grupta yapılan histolojik değerlendirmede, postoperatif 2. haftada defekt alanında vaskülarizasyon ve ince gevşek bağ dokusu izlenmiştir (Resim 21). İmmün boyamada kesitlerin negatif boyandığı görülmüştür. Osteoblastik aktivite izlenmemiştir. (Resim 22).



**Resim 21:** Kontrol grubunun 2. hafta histolojik görünümü. (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (BD: Bağ dokusu).

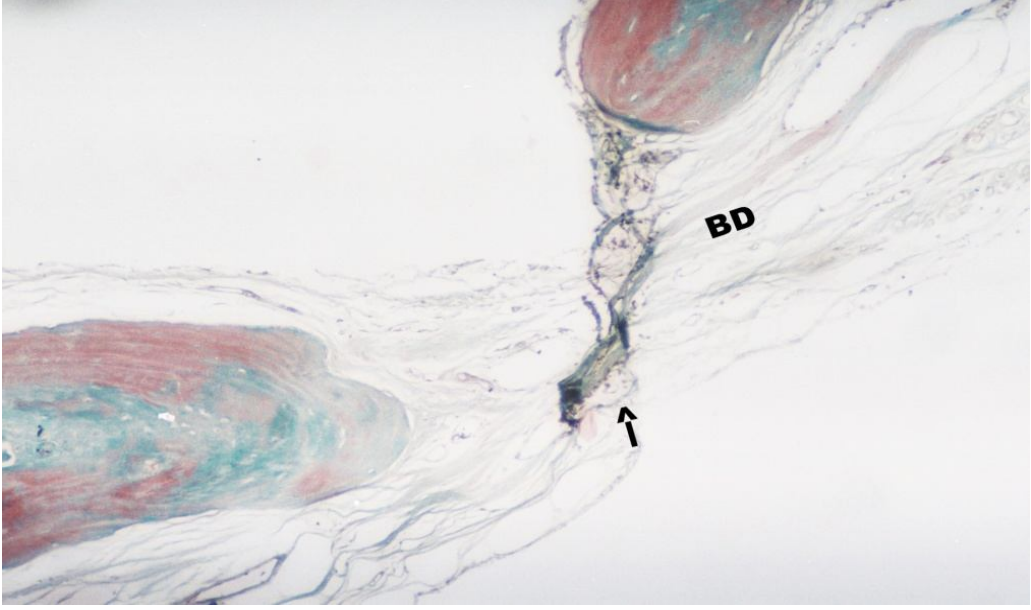
Kesitlerin osteonektin ve osteopontin immün boyamasına verdiği pozitif yanıt osteoblastik aktivitenin ve osteogenezisin oluştuğunu gösterirken; negatif yanıt ise bu aktivitenin başlamadığını ve dolayısıyla osteogenezisin henüz oluşmadığını göstermektedir.



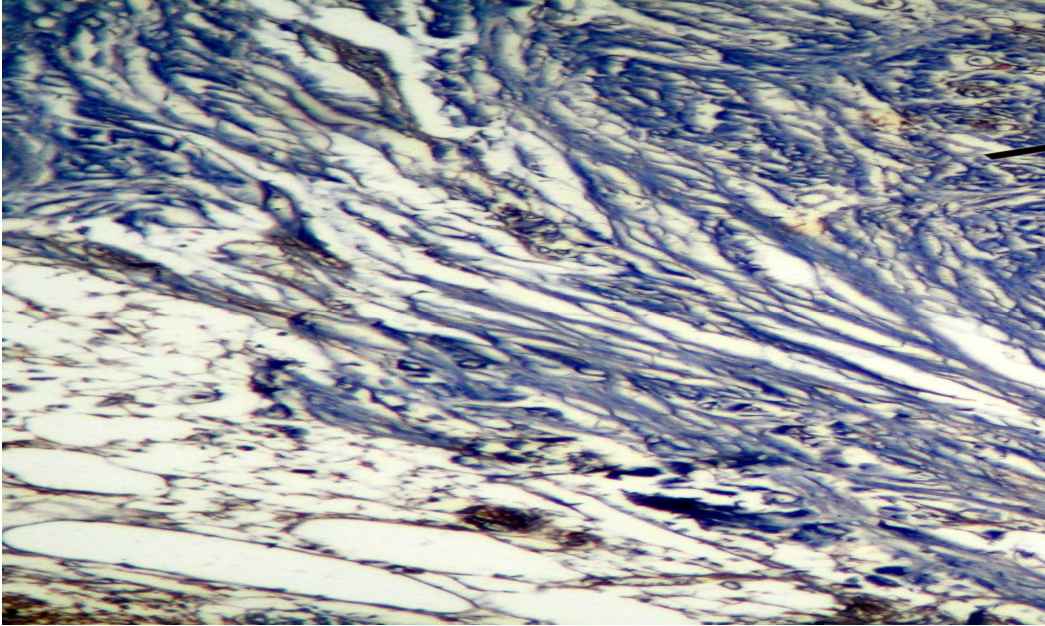
**Resim 22:** Kontrol grubunun 2. hafta İmmünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x)

## **2. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti Uygulanan Grup:**

Histolojik olarak postoperatif 2. haftada defekt alanında sıkı bağ dokusu ve minimal kemikleşme izlendi (Resim 23). İmmün boyamada kesitlerin negatif boyandığı ve osteoblastik aktivitenin ise henüz başlamadığı gözlemlendi (Resim 24).



**Resim 23:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 2. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (BD: Bağ dokusu, ok işareti: minimal kemikleşme alanı).

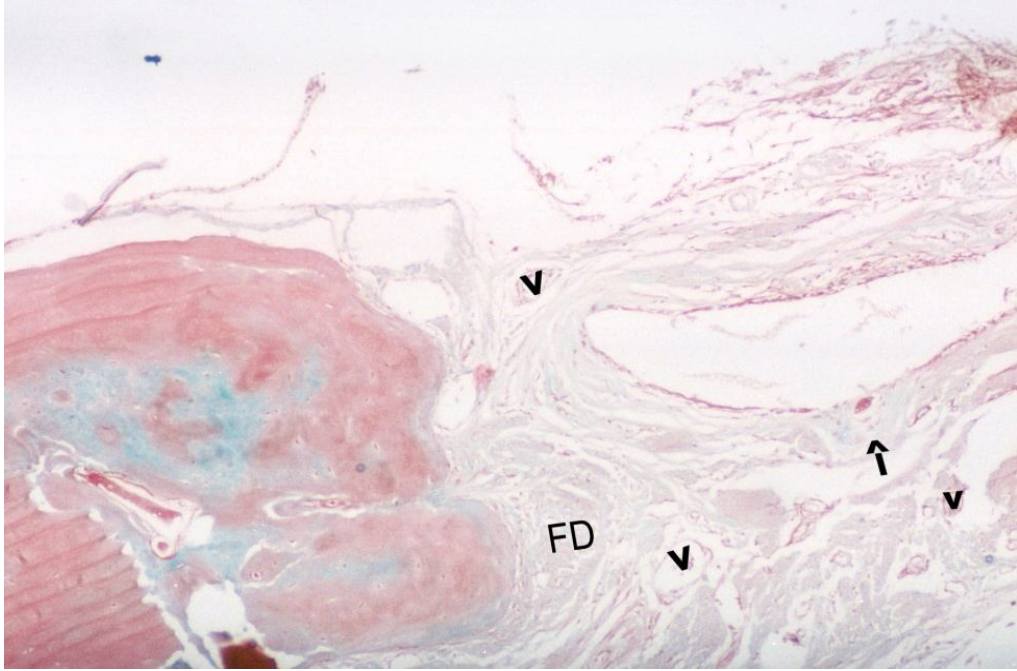


**Resim 24:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x).

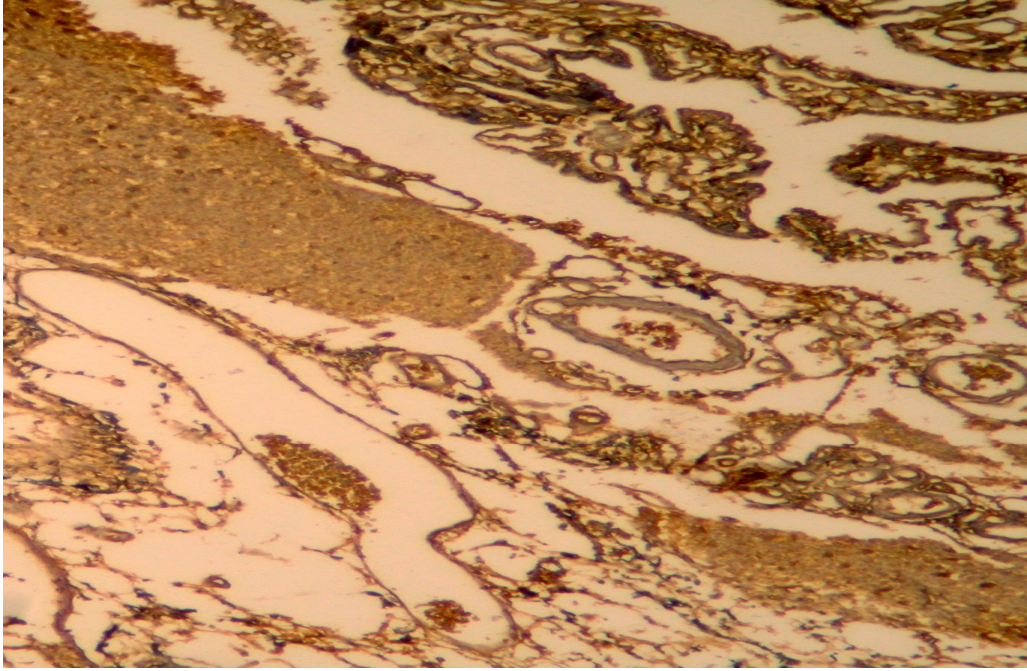


### 3. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti ve TZP uygulanan Grup:

Postoperatif 2. haftada genel olarak, zayıf bir osteogenezis potansiyelinin oluştuğu izlendi. Defektin kenarında fibröz doku gelişimi, orta alanlarda ise vaskülarizasyonda artış kaydedildi (Resim 25). İmmün boyamada ise 2. haftada pozitif alanlar tespit edilmemiş olup, yer yer vaskülarizasyon alanları izlenmiştir (Resim 26).



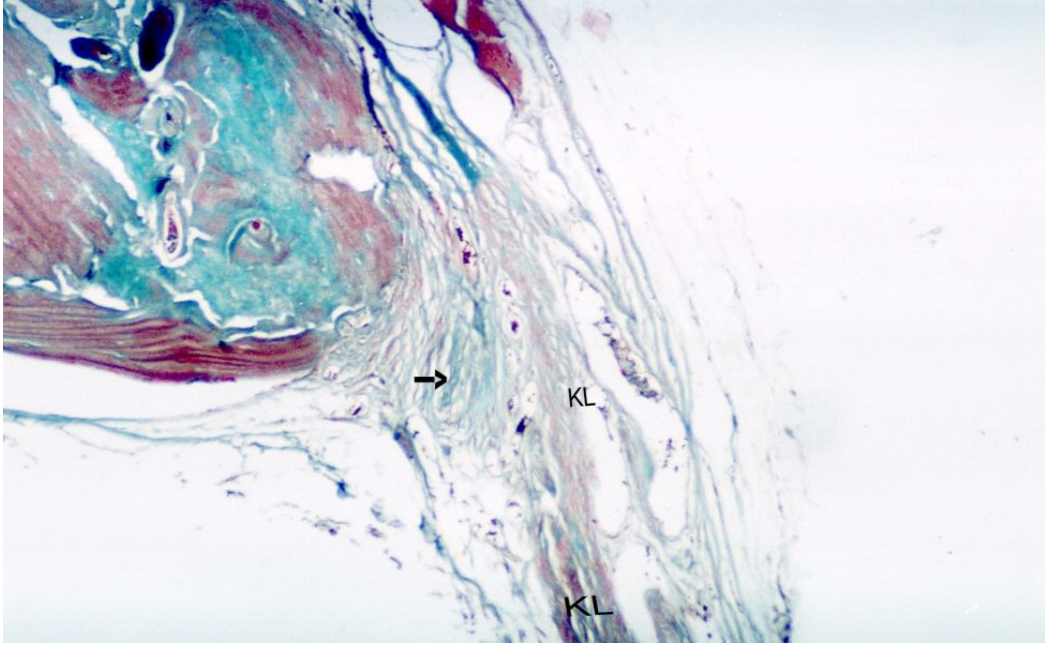
**Resim 25:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 2. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (FD: Fibröz doku, ok işareti: Kemik spikülleri, V: vaskülarizasyon).



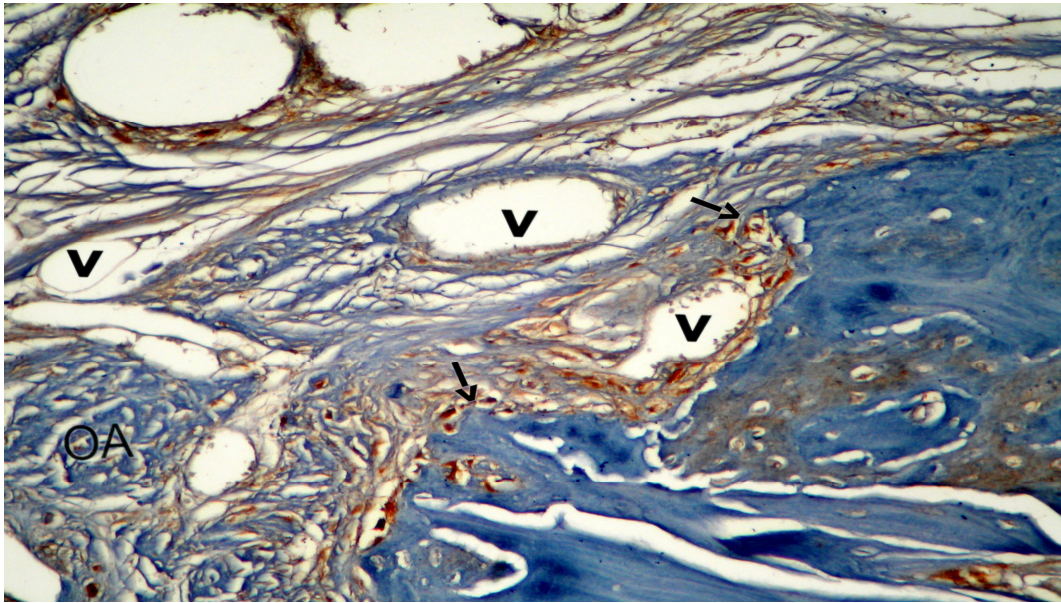
**Resim 26:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteopontin boyama, orijinal büyütme 200x).

#### **4. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulanan Grup**

Postoperatif 2. haftada alınan kalvaria kesitlerinde defekt alanına kaba kollajen lif demetlerinin hakim olduğu ve minimal kemikleşmenin şekillendiği izlenmiştir (Resim 27). İmmün boyamada pozitif boyanma ile karşılaşılmış olup, osteoblastik aktivite ve osteositlerin varlığı saptanmıştır. Ayrıca sık vaskülarizasyon alanları izlenmiştir (Resim 28).



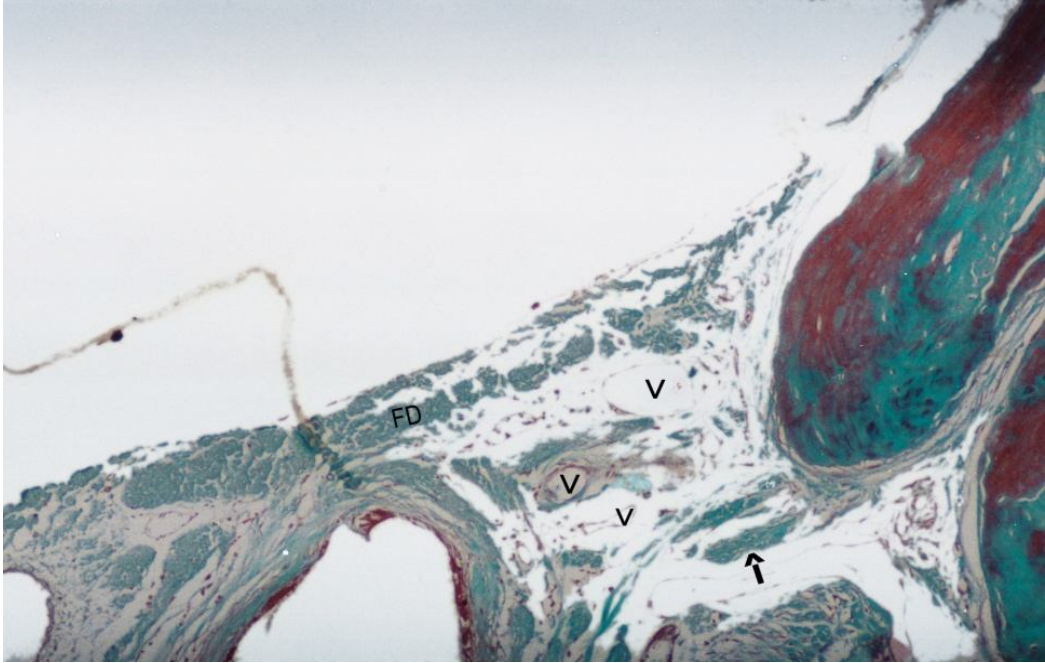
**Resim 27:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (KL: Kollajen fibril, ok işareti: Kemikleşme alanı).



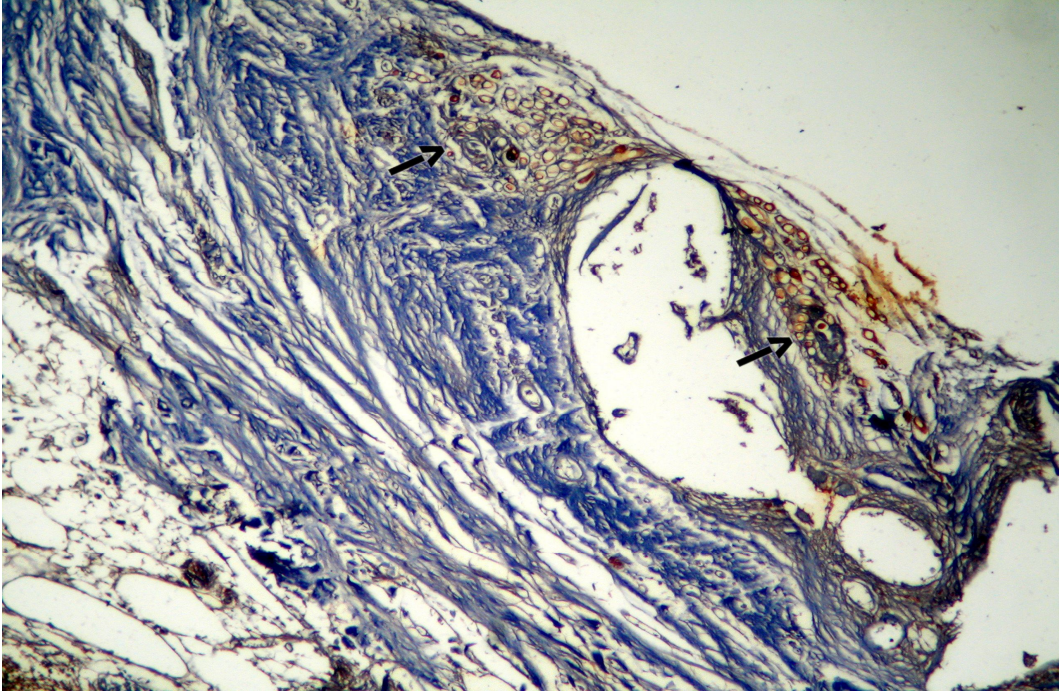
**Resim 28:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x) (V: Vaskülarizasyon, Ok işareti: Pozitif boyanan kemikleşme alanları, OA: Osteoblastik aktivite)

## 5. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti , TZP ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulanan Grup

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve mezenkimal kök hücre üçlü kombinasyonu uygulanan grubun postoperatif 2. haftada alınan doku kesitlerinde; greft alanının tamamen fibröz ve vaskülarize bağ dokuyla dolu olduğu izlenmiştir. Defekt kenarına yakın yerleşimli küçük kemikleşme odakları seçilmiştir (Resim 29). İmmünohistokimyasal değerlendirmelerde ise, osteoblastik aktivite alanları ve osteositlerin yoğunlaştığı bölgeler izlenmiştir. Kemikleşme alanları pozitif boyanmış olup, osteogenezisin başladığı saptanmıştır (Resim 30).



**Resim 29:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (FD: Fibröz doku, ok işareti: Kemik spikülleri, V: Vaskülarizasyon).

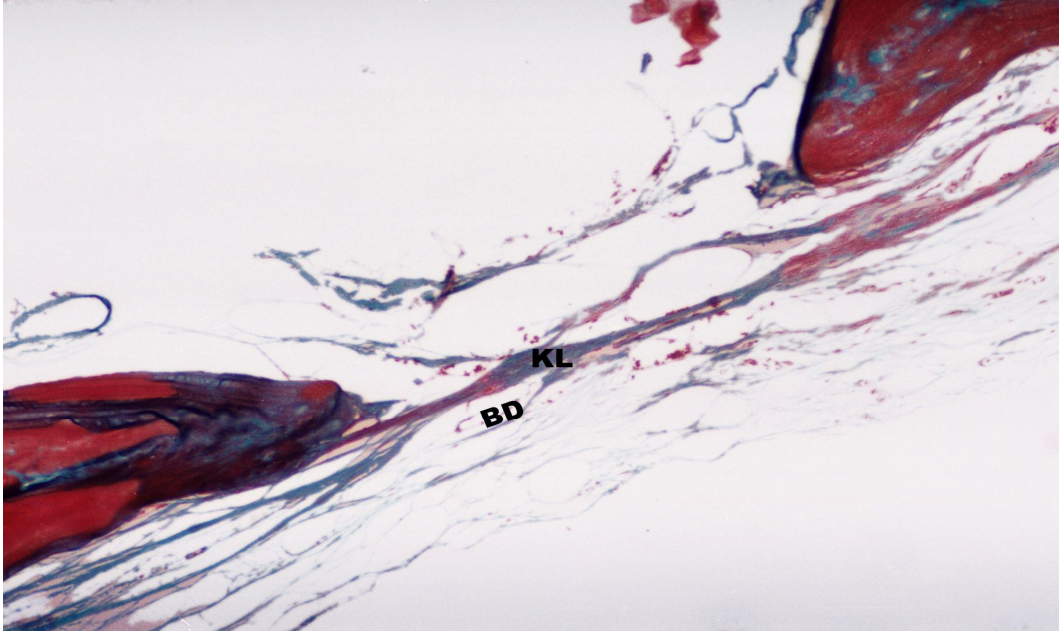


**Resim 30:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 2. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x) (Ok işareti: Pozitif boyanan kemikleşme alanı)

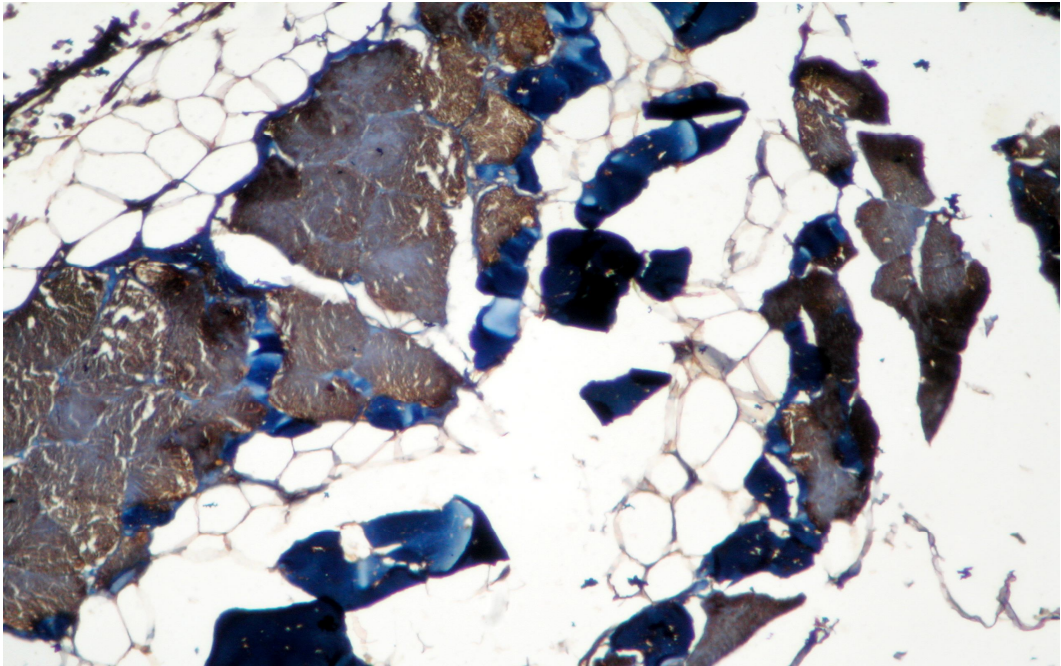
## 8.HAFTA BULGULARI

### 1.Kontrol Grubu:

8. haftada defekt alanında gevşek bağ dokusu içerisinde kalın kollajen lif demetleri hakim durumda izlenmiştir (Resim 37). İmmünohistokimyasal boyamada ise negatif sonuç alınmış ve herhangi bir osteoblastik aktivite ile karşılaşılmamıştır (Resim 38).



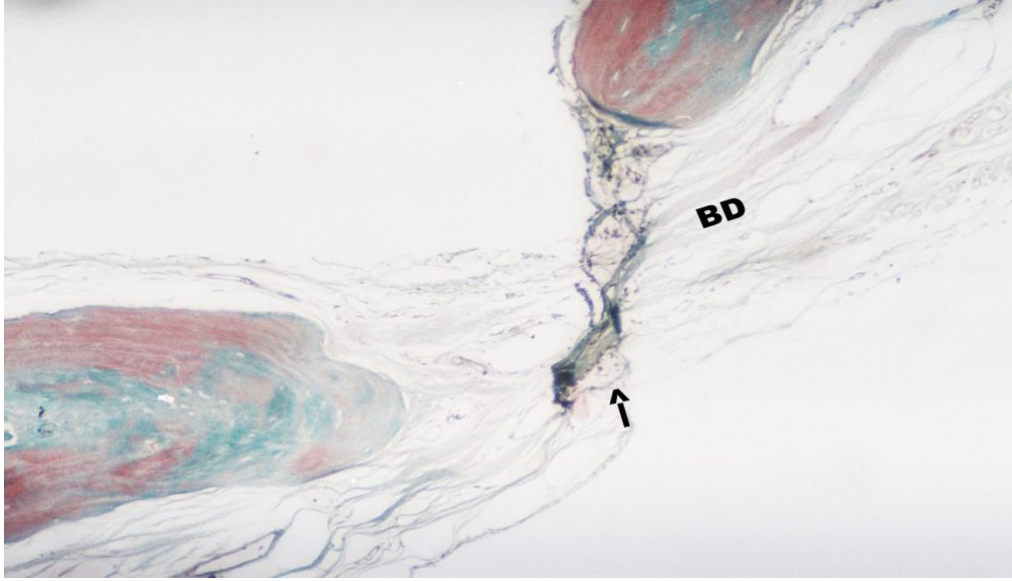
**Resim 31:** Kontrol grubu 8. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (BD: Bağ dokusu, KL: Kollajen lif).



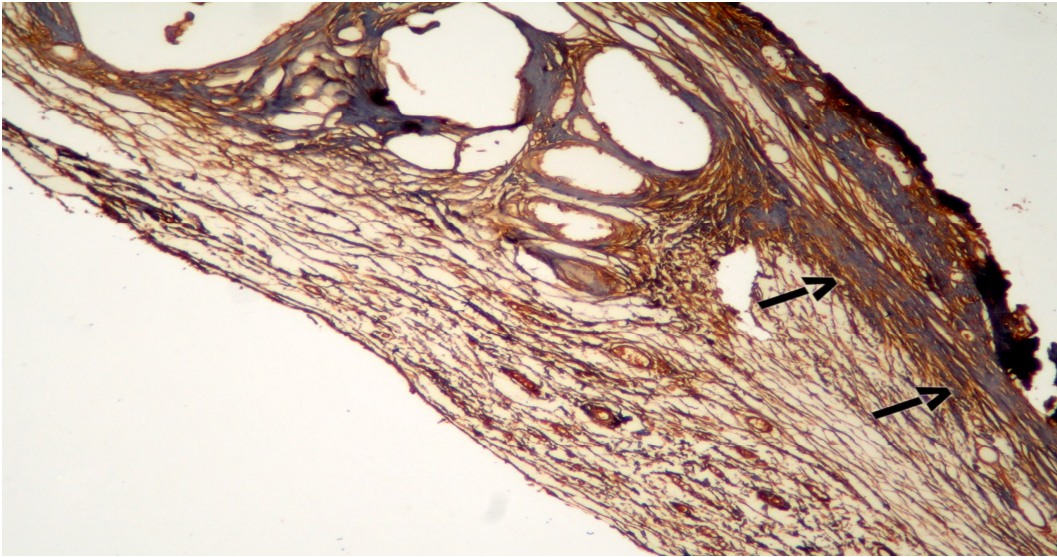
**Resim 32:** Kontrol grubunun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteopontin boyama, orijinal büyütme 200x)

## 2.Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti Grubu:

8. haftada yapılan histolojik değerlendirmede ileri derecede vaskularizasyon görüldü (Resim 33). İmmünohistokimyasal olarak vaskularizasyona ek olarak osteoblastik aktivitenin artış gösterdiği alanlar dikkati çekmiştir (Resim 34).



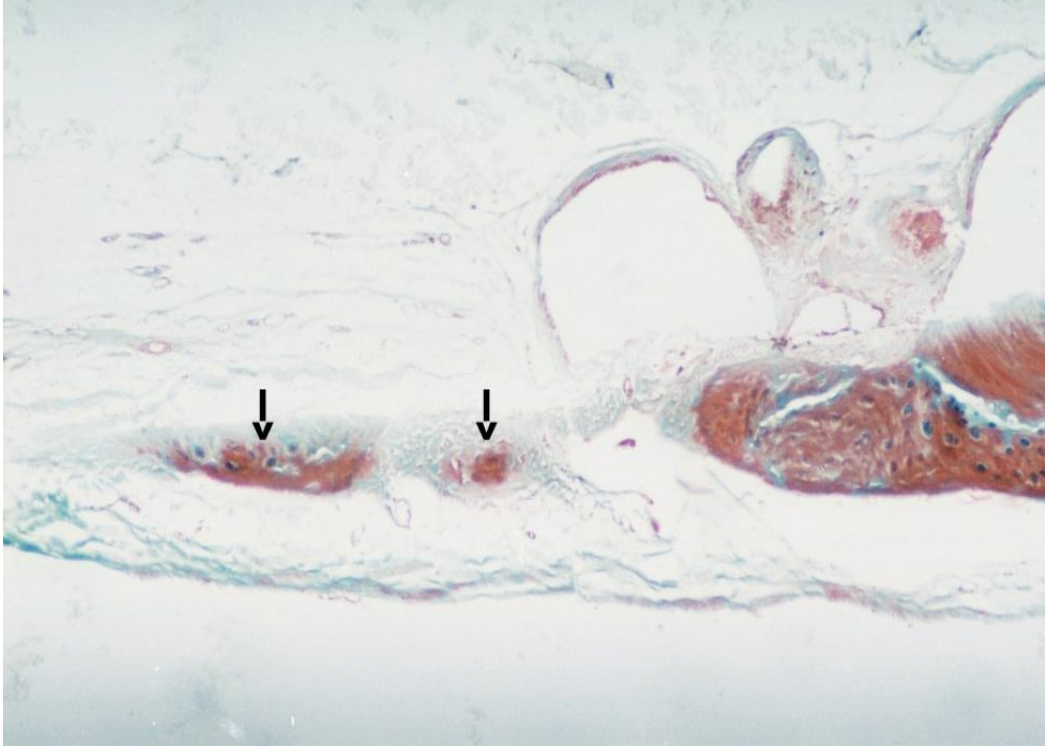
**Resim 33:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (BD: Bağ dokusu, ok işareti: minimal kemikleşme alanı).



**Resim 34:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü (İmmünohistokimyasal boyama, orijinal büyütme 200x) (Ok işareti: Osteoblastik aktivite)

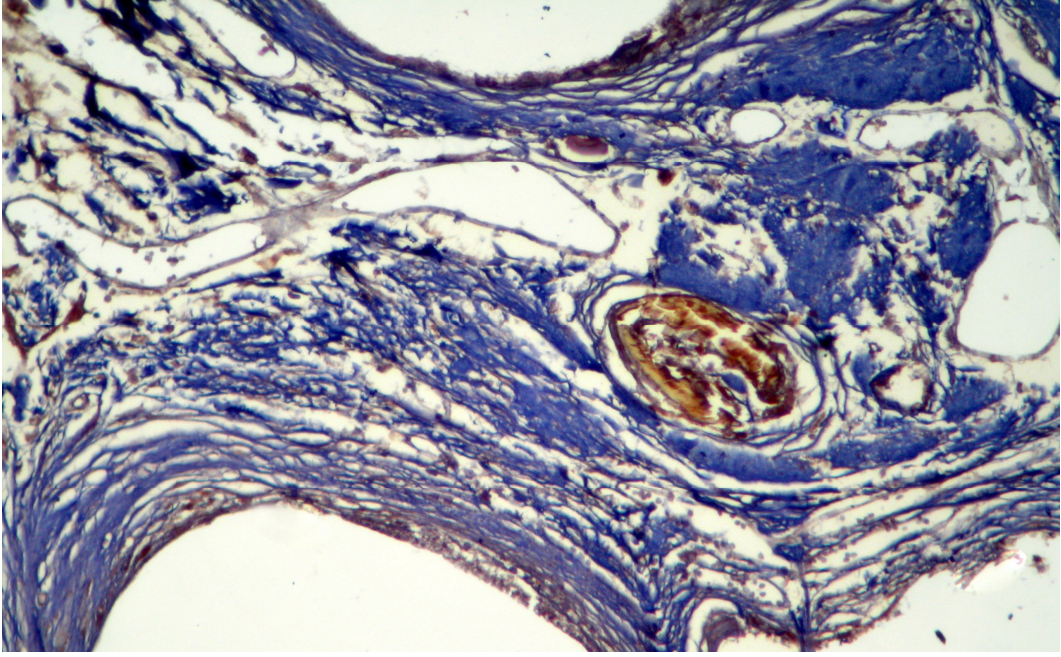
### 3. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti ve TZP Uygulanan Grup:

Bu grubun 8. haftasında elde edilen doku örneklerinde histolojik olarak defektin yer yer yeni kemik tarafından doldurulduğu görüldü (Resim 35). İmmün boyamada ise kemikleşme odaklarının oluştuğu ve aktivasyon gösterdikleri izlenmiştir (Resim 36).



**Resim 35:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft ve TZP uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (Ok işareti: Yeni kemik trabekülleri).

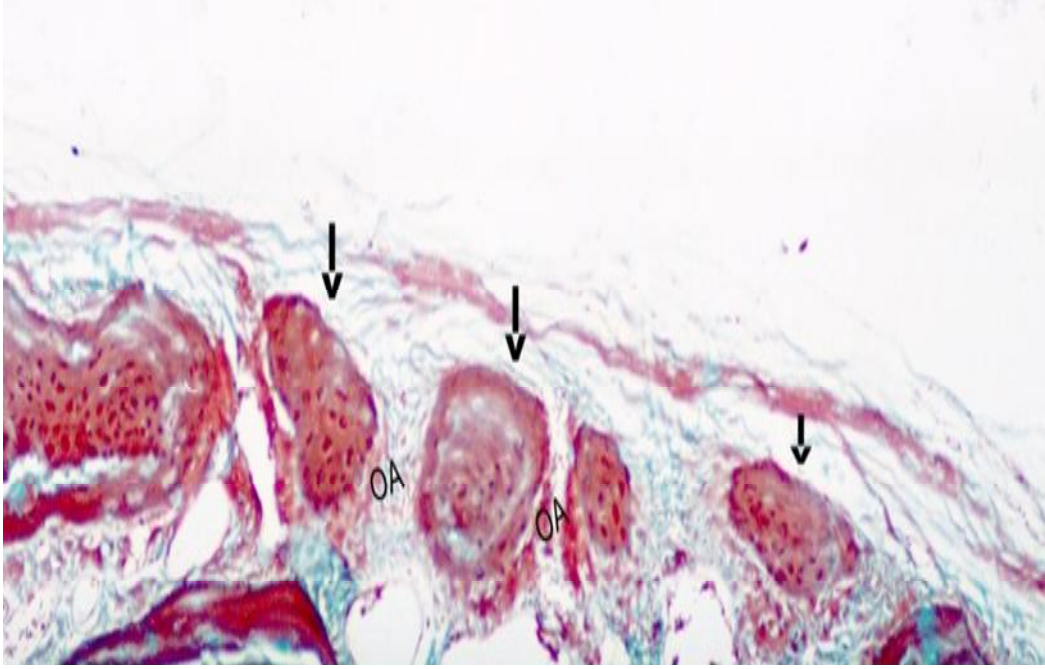




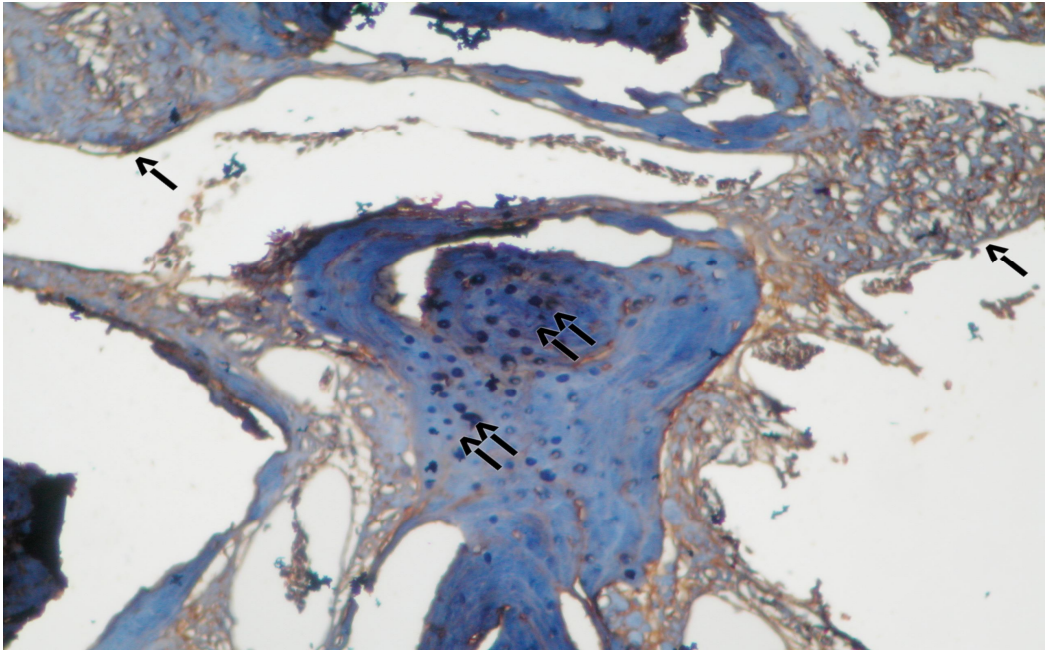
**Resim 36:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft ve TZP uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x).

#### **4. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulanan Grup**

Bu grubun 8. haftasında sakrifiye edilen kalvaria örneklerinde histolojik olarak, defektin periferinden santrale doğru ilerleyen osteosit içeren yeni kemik dokusu izlendi. Yeni oluşan kemiğin komşuluğunda osteoblast benzeri hücreler görüldü (Resim 37). İmmünohistokimyasal değerlendirmede ise, osteoblastik aktivite gösteren kemikleşme odaklarının oluştuğu ve bu odakların pozitif boyandığı izlendi (Resim 38).



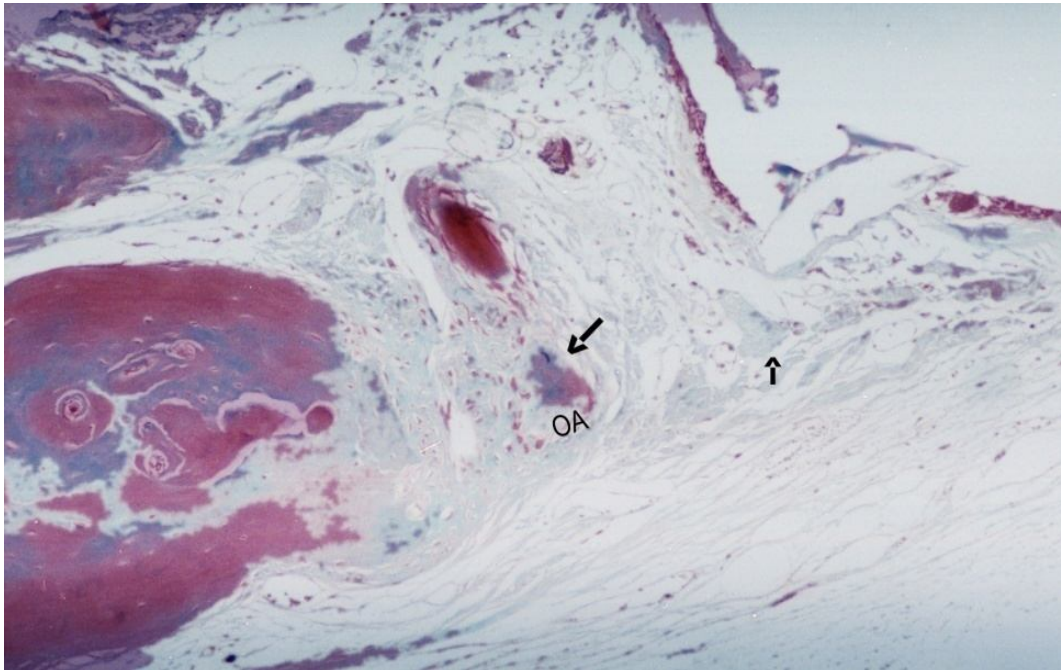
**Resim 37:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (Ok işaretleri: Yeni kemik trabekülleri, OA: Yoğun osteoblastik aktivite).



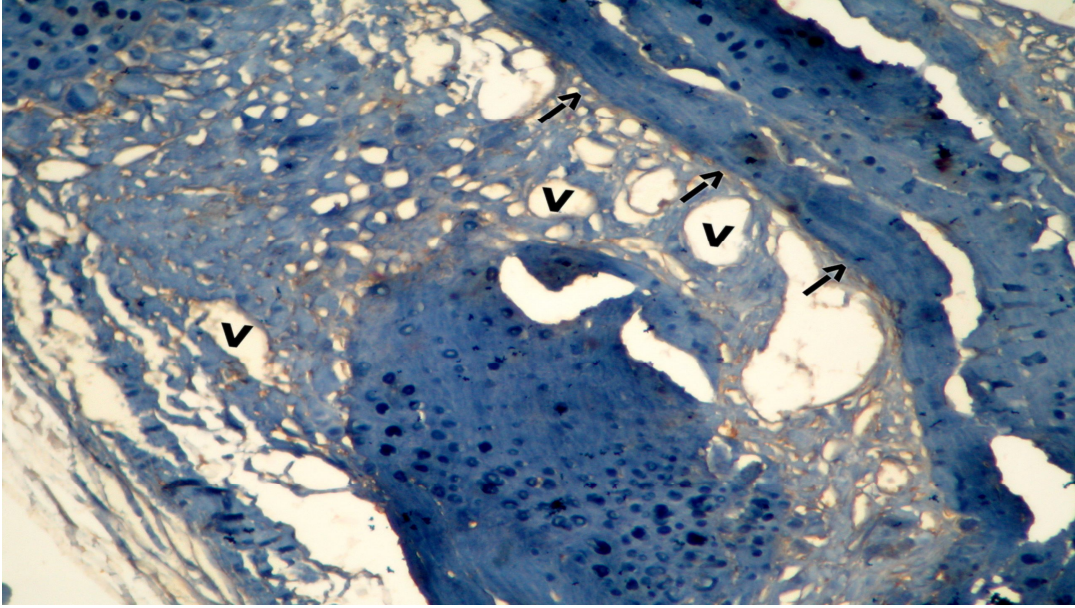
**Resim 38:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x) (Ok işaretleri: Osteoblastik aktivite alanı, çift ok: Osteosit alanı)

## 5. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Greft , TZP ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulanan Grup

Bu grubun histolojik incelemesinde, 8. haftadaki kesitlerde osteogenezisin periferden santrale doğru ilerlediği ve yüksek derecede osteoblastik aktivite olduğu tespit edildi. Yabancı cisim reaksiyonunun mevcut olmadığı ve greftin biyouyumluluğunun çok iyi olduğu izlendi (Resim 39). İmmün boyamada ise vaskülarizasyonun iyi derecede olduğu alanlar ve osteoblastik aktivite zenginliği gözlenmiştir (Resim 40).



**Resim 39:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (Ok işaretleri: kemik trabekülleri, OA: Yoğun osteoblastik aktivite).

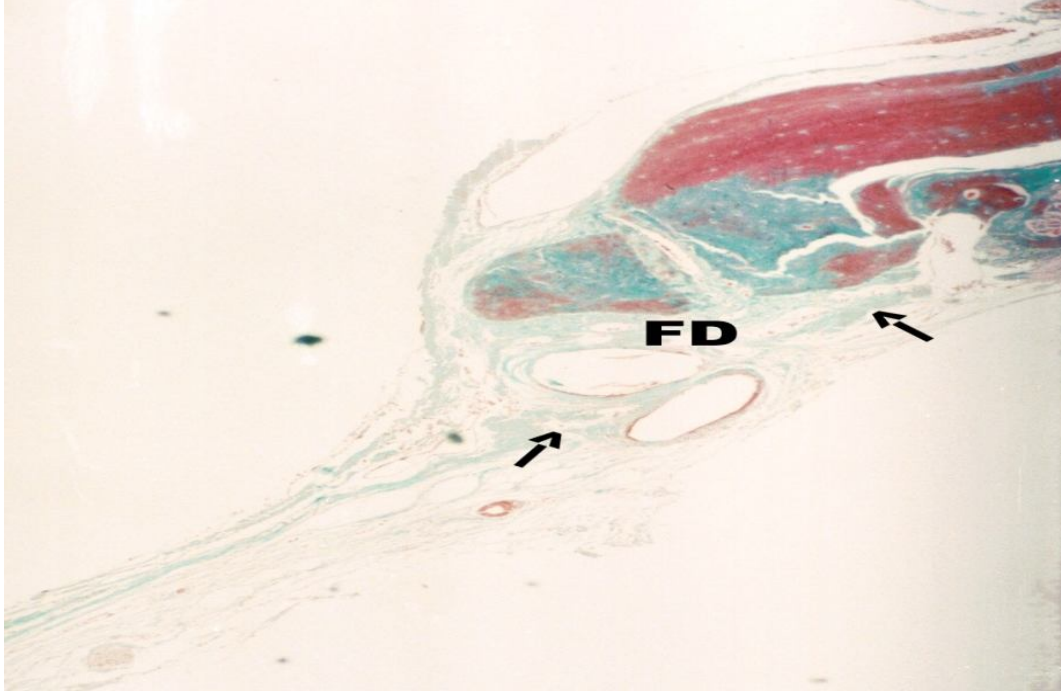


**Resim 40:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 8. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteopontin boyama, orijinal büyütme 200x) (Ok işaretleri: kemik trabekülleri, V: Vaskülarizasyon)

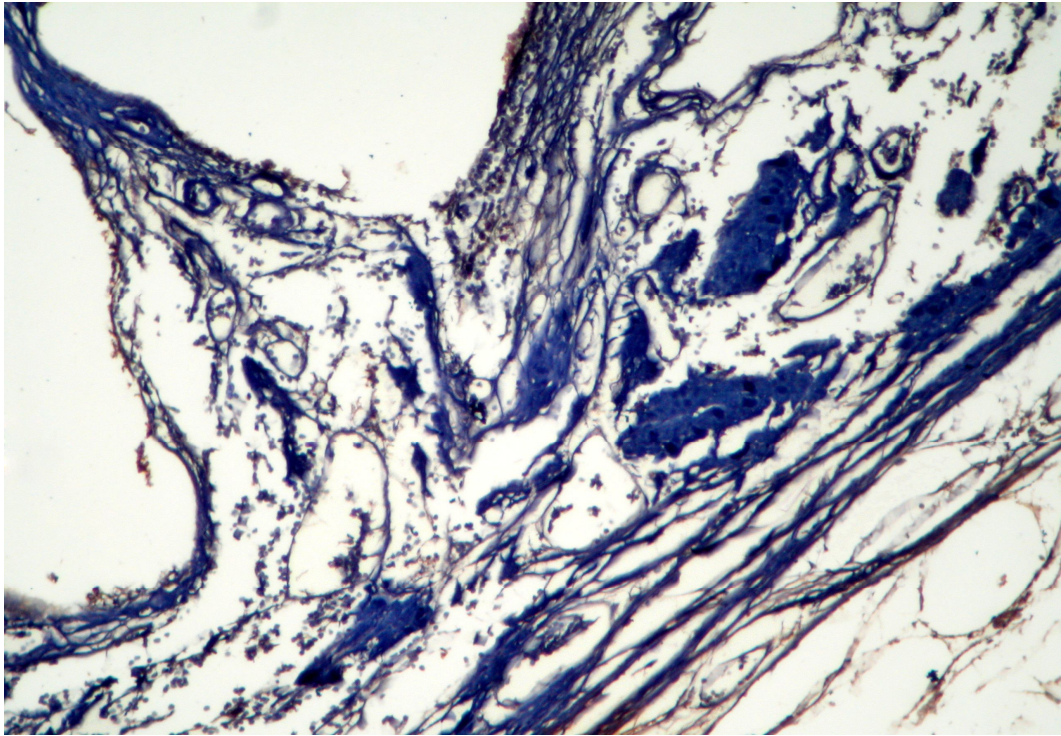
## 12.HAFTA BULGULARI

### 1.Kontrol Grubu:

Postoperatif 12. haftada osteoblastik aktivitede artışın yanısıra fibröz bağ dokusu izlendi. Kemikleşmenin, defekt kenarlarında minimal düzeyde başladığı gözlemlendi (Resim 41). Negatif boyanan immün boyamada ise yeni oluşan vaskülarize alanlar görülmüştür (Resim 42).



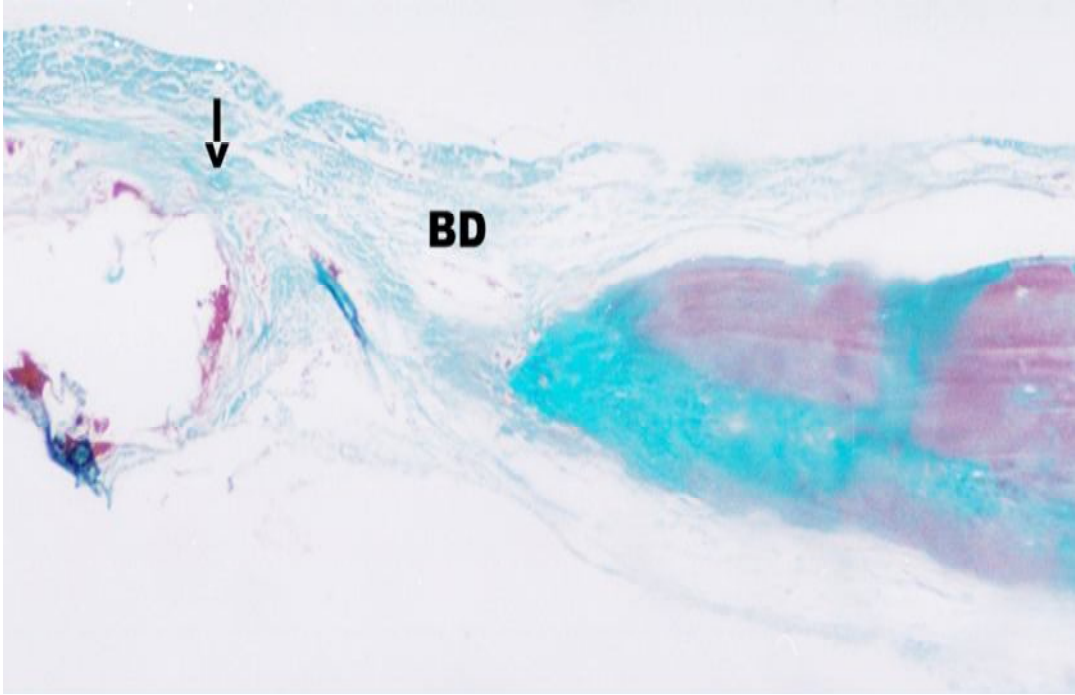
**Resim 41:** Kontrol grubunun 12. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (FD: Fibröz doku, ok işareti: Minimal kemikleşme alanı).



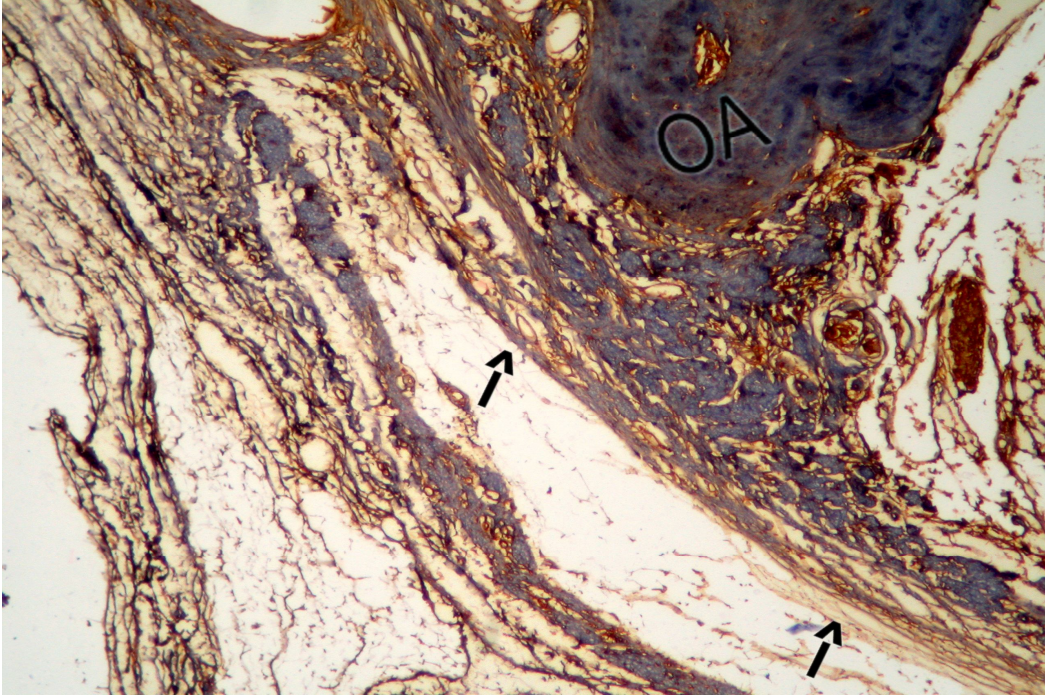
**Resim 42:** Kontrol grubunun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x)

## 2. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti Uygulanan Grup:

Bu grubun histolojik değerlendirmesinde 12. haftada sıkı dizilmiş kalın kollajen lif demetleri ve minimal kemikleşme izlenmiştir (Resim 43). İmmün boyamada ise oldukça pozitif boyanan osteoblastik aktivite alanları seçilmiştir (Resim 44).



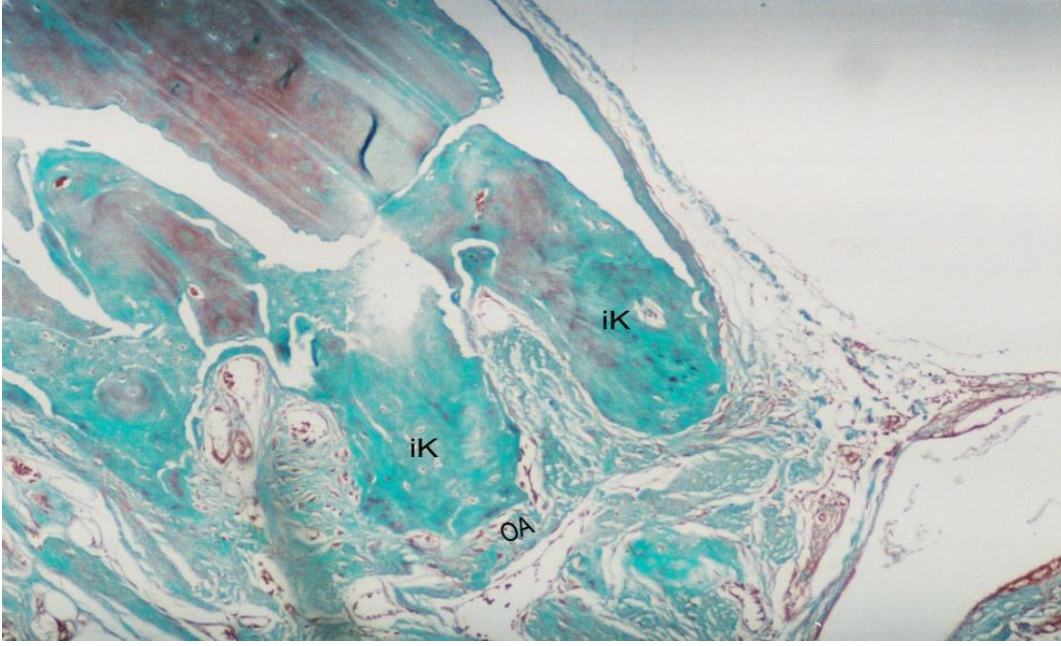
**Resim 43:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (BD: Bağ dokusu, ok işareti: kemik spikülleri).



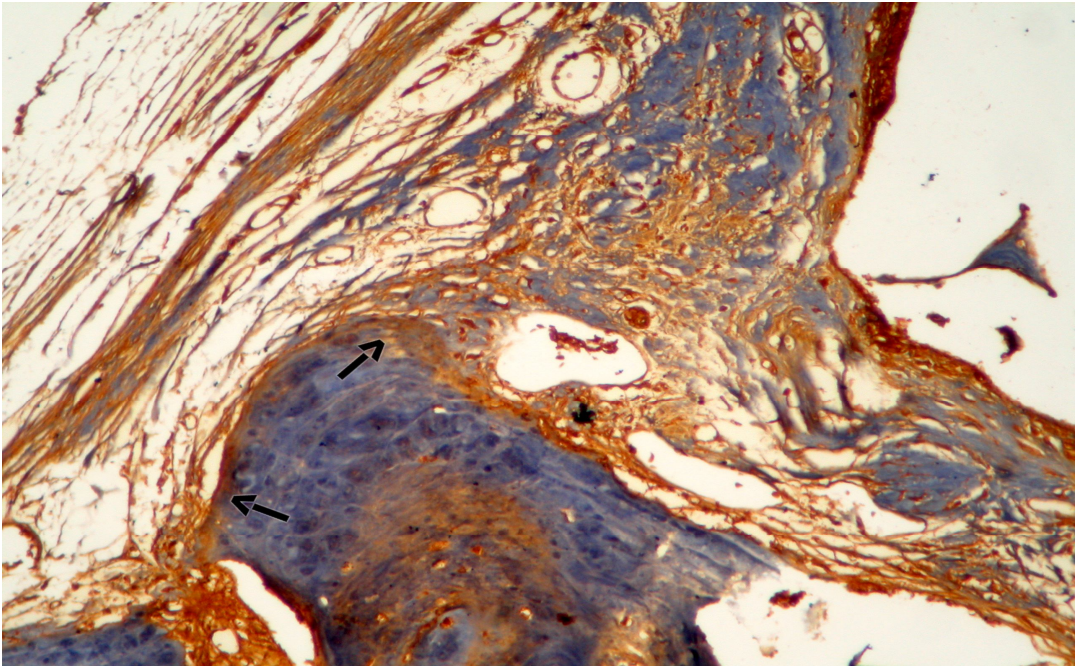
**Resim 44:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x) (OA: Osteoblastik aktivite, Ok işareti: Kollajen lifler)

### 3. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti ve TZP Uygulanan Grup:

Bu grupta histolojik olarak postoperatif 12. haftada, defekt alanının ikincil kemik trabekülleriyle dolduğu ve bu trabeküllerin etrafında ileri derecede osteoblastik aktivite geliştiği izlendi. Bu aktivitenin immün boyamada da 8. haftaya göre çok daha iyi olduğu ve osteogenezisin ideal olduğu gözlemlendi (Resim 45-46).



**Resim 45:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (İK: ikincil kemik trabekülleri, OA: yoğun osteoblastik aktivite).

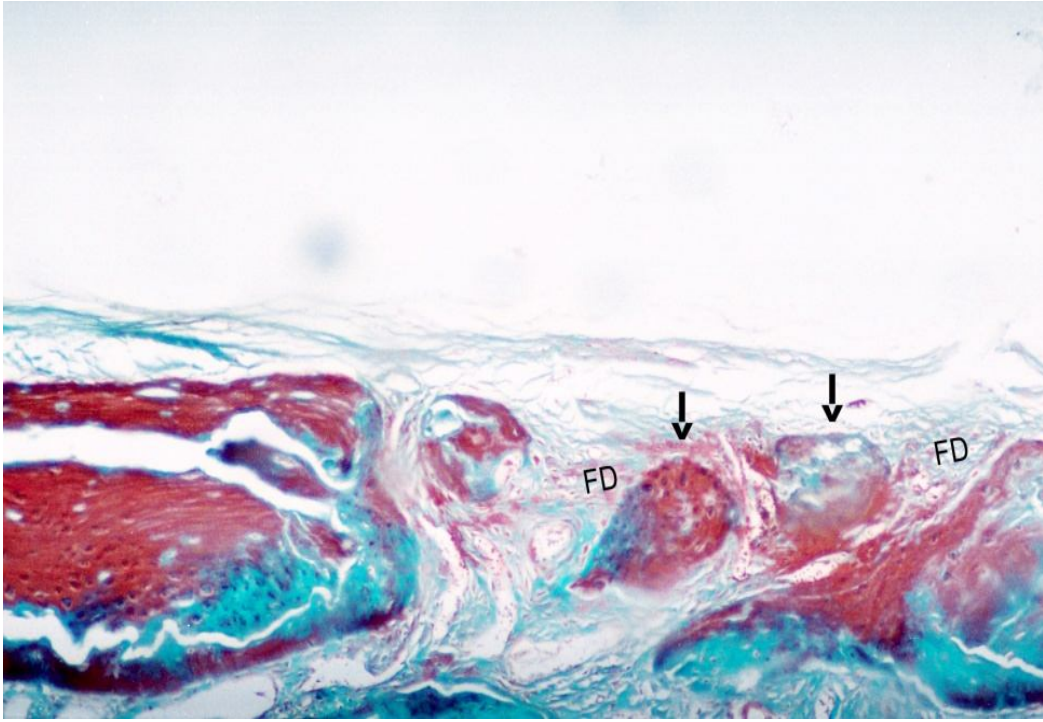


**Resim 46:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü (Ostenektin boyama, orijinal büyütme 200x) (Ok işareti: Osteogenezis aktif alanları).

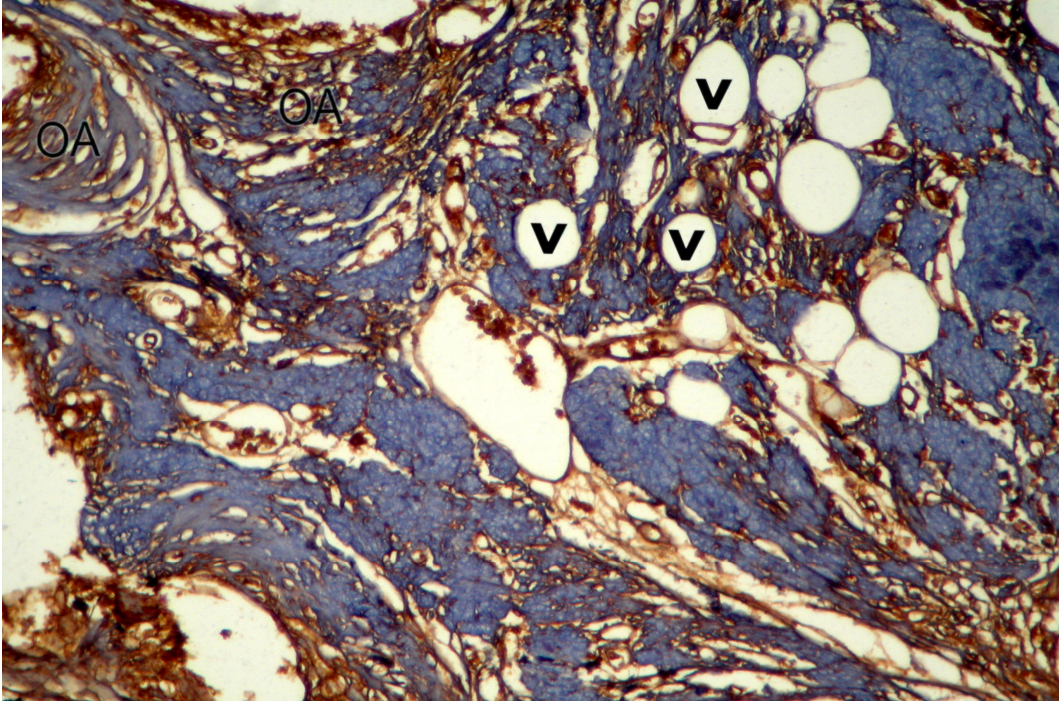


#### 4. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulanan Grup

Bu grubun 12. haftasında alınan kesitlerdeki histolojik değerlendirmede, yeni oluşan kemik trabeküllerinin defekt alanını doldurduğu, bu trabeküllerin birbirlerine yaklaştığı ve aralarındaki açıklıkların fibröz dokuyla dolduğu gözlenmiştir (Resim 47). Yeni oluşan kemik lameller yapıda trabeküllerden oluşmaktaydı. Bu dönemde yeni oluşan kemiğin, immün boyamada yüksek osteoblastik aktivite gösterdiği izlenmiştir (Resim 48).



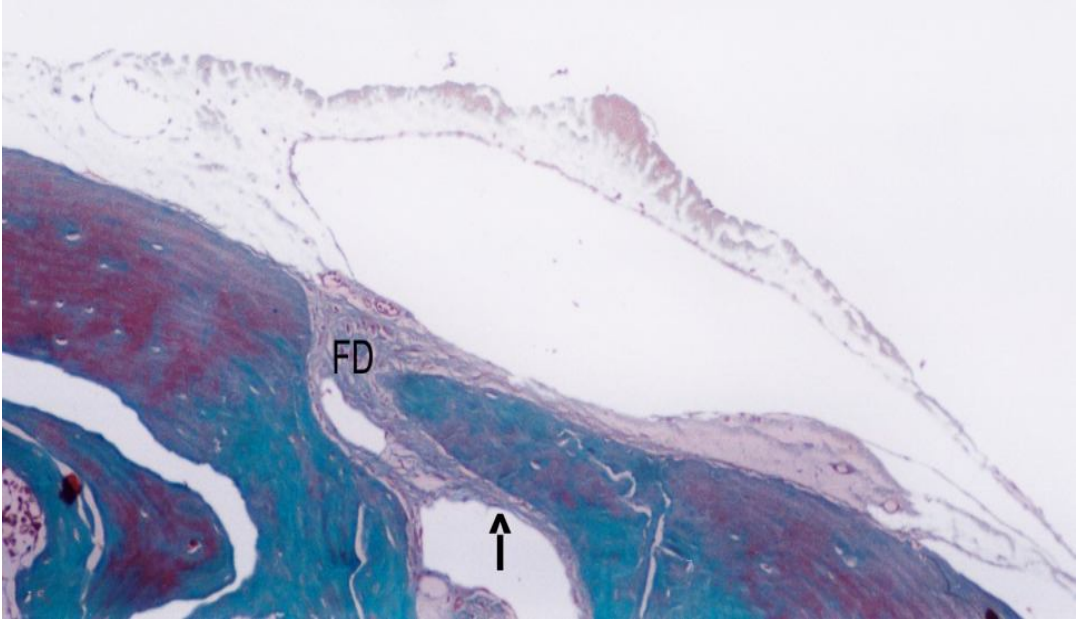
**Resim 47:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (Ok işareti: Kemik trabekülleri, FD: Fibröz bağ dokusu).



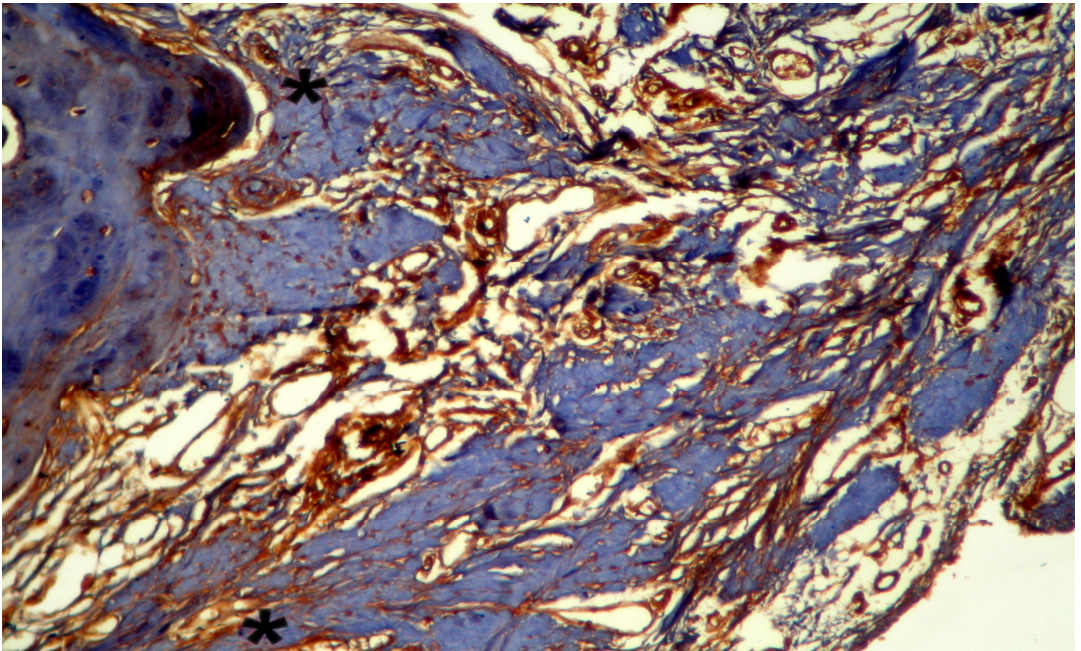
**Resim 48:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x) (OA:Osteoblastik aktivite, V: Vaskülarizasyon)

### 5. Bifazik Kalsiyum Fosfat Seramik Grefti , TZP ve Mezenkimal Kök Hücre Uygulanan Grup

Bu grubun histolojik değerlendirmesinde 12. haftada oluşan yeni kemik kalitesinin 2. ve 8. haftaya kıyasla daha iyi olduğu kaydedilmiştir (Resim 49). İmmünohistokimyasal incelemede de mükemmel derecede vaskülarizasyon gösteren defekt alanının trabeküler yapıya kavuştuğu ve osteogenezis odaklarının düzenli olduğu izlenmiştir (Resim 50).



**Resim 49:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta histolojik görünümü (Trikrom Masson boyama, orijinal büyütme 80x) (Ok işareti: kemik trabekülleri, FD: fibröz doku).



**Resim 50:** Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücre uygulanan grubun 12. hafta immünohistokimyasal görünümü (Osteonektin boyama, orijinal büyütme 200x) (Yıldız: Osteoblastik aktivite).

## B) İSTATİSTİKSEL BULGULAR

Kesitlerin osteonektin ve osteopontin boyamaya verdiği pozitif-negatif yanıt ve osteosit yoğunluğu kriter alınarak incelendi. Bu çalışmada istatistiksel analizler SPSS 11.5 paket programı ile yapılmıştır. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotların (sıklık dağılımları) kullanılmasının yanısıra, nitel verilerin karşılaştırmalarında da ki-kare (Chi-Square) testi kullanılmıştır. Sonuçlar, anlamlılık  $p < 0,05$  düzeyinde değerlendirilmiştir.

Toplamda kontrol grubunda 6 rat (% 6,7), greft grubunda 21 rat (% 23,3), greft+TZP grubunda 21 rat (% 23,3), greft+kök hücre grubunda 21 rat (% 23,3) ve greft+kök hücre+TZP grubunda 21 rat (% 23,3) değerlendirilmeye dahil edilmiştir (Tablo 4).

Gruplar	Sayı	%
Kontrol Grubu	6	6,7
Greft Grubu	21	23,3
Greft+TZP Grubu	21	23,3
Greft+Kök Hücre Grubu	21	23,3
Greft+Kök Hücre+TZP Grubu	21	23,3
Total	90	100,0

**Tablo 4:** Deney gruplarındaki denek sayıları ve toplam denek sayısına oranları

2. hafta, 8.hafta ve 12. haftada 30'ar rat (% 33,3) değerlendirmeye dahil edilerek toplam 90 rat (% 100) alışılmıştır (Tablo 5).

<b>Haftalar</b>	<b>Sayı</b>	<b>%</b>
2. Hafta	30	33,3
8. Hafta	30	33,3
12. Hafta	30	33,3
Total	90	100,0

**Tablo 5:** Haftalara göre denek sayıları ve toplama oranları

**İstatistiksel değerlendirmelerimiz 3 kritere göre yapılmıştır. Bunlar;**

- A- Osteopontin Enzim Ekspresyonu
- B- Osteonektin Enzim Ekspresyonu
- C- Osteosit Yoğunluğu

#### **A) OSTEOPONTİN ENZİM EKSPRESYONUNUN DEğERLENDİRMEĞ**

Osteopontin enzim ekspresyonları her grup için 2., 8. ve 12. haftalarda puanlanarak değerler elde edilmiştir. Osteopontin ile boyanan hücrenin varlığında: 1, Osteopontin ile boyanan hücrenin yokluğunda: 0 değeri kullanılmıştır (Tablo 6).

GRUPLAR	DERECELER	2.hafta osteopontin ile boyanan hücre	8.hafta osteopontin ile boyanan hücre	12.hafta osteopontin ile boyanan hücre
<b>1. GRUP KONTROL GRUBU</b>	<b>0</b>	7	7	7
	<b>1</b>	0	0	0
<b>2.GRUP GREFT GRUBU</b>	<b>0</b>	7	6	4
	<b>1</b>	0	1	3
<b>3.GRUP GREFT+TZP GRUBU</b>	<b>0</b>	7	6	2
	<b>1</b>	0	1	5
<b>4.GRUP GREFT+MKH GRUBU</b>	<b>0</b>	7	5	0
	<b>1</b>	0	2	7
<b>5.GRUP GREFT+TZP+MKH GRUBU</b>	<b>0</b>	6	4	0
	<b>1</b>	1	3	7

**Tablo 6.** Osteopontin ile boyanan hücrelerin derecelenmesi

(1): Osteopontin ile boyanan varlığı

(0): Osteopontin ile boyanan yokluğu

Yapılan bu istatistiksel değerlendirmede; kontrol grubunun her üç çalışma süresinde (2., 8. ve 12. haftalarda) yer alan 7'şer kesitinde osteopontin ile boyanan bir hücre olmadığı saptanmış ve bu da bize herhangi bir osteoblastik aktivitenin henüz başlamadığını göstermiştir.

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan 2. grupta ise erken dönem olan 2. haftada hiçbir hücre osteopontin ile boyanmazken; 8. haftada 1 kesitte, 12. haftada ise 3 kesitte boyanan hücre varlığı saptanmıştır. Bu da, iyileşme süresinin ilerlemesine bağlı olarak osteogenezisin yavaş yavaş başladığını göstermektedir.

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP'nin birlikte uygulandığı 3. grupta da 2. ve 8. hafta bulguları, sadece bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan 2. gruba benzerlik gösterse de, 12. haftada farklı olarak

osteopontinle boyanan hücre kesit sayısı 5 olup, bu da yüksek bir oran olarak değerlendirilmiştir. Bu durum, grefte TZP ilavesiyle osteoblastik aktivitenin sürenin ilerlemesine paralel olarak arttığı ve osteogenezisin gerçekleştiği şeklinde yorumlanmıştır.

Greft ve mezenkimal kök hücrenin birlikte uygulandığı 4. grupta ise, erken dönem olan 2. haftada osteopontin ile boyanan hücre olmadığı yani osteoblastik aktivitenin başlamadığı izlenirken; 8. haftada boyama olan kesit sayısının arttığı, ancak 12. haftada ise tüm kesitlerin boyamaya pozitif yanıt gösterdiği saptanmıştır. Bu durum, osteokondüktif etkili grefte mezenkimal kök hücre ilavesiyle osteogenezisin oldukça arttığını göstermekle beraber, mezenkimal kök hücrenin osteoblastik aktiviteyi yükselttiğini gösteren önemli bir materyal olduğu konusunda güçlü bir bulgudur.

Greft+TZP ve mezenkimal kök hücrenin birlikte uygulandığı 5. grupta, erken dönem olan 2. haftada osteopontinle boyanan hücrelerin varlığı sadece 1 kesitte saptanırken, 8. haftada 3 kesitte ve 12. haftada ise tüm kesitlerde izlenmiştir. Bu da iyileşme sürecinin erken döneminde bile osteoblastik aktivitenin ve osteogenezisin başladığını, ilerleyen sürede ise ideal bir osteogenezisin elde edildiğini göstermektedir. Düzenli sıralanmış kemik yapısının ve osteogenezisin elde edilmesi, bu kombinasyonun ideal bir karışım olduğu yönünde önemli bir bulgu olarak yorumlanmıştır.

Ki-kare (Chi-Square) testi kullanılarak 2., 8. ve 12. hafta deney gruplarının osteopontin enzim ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Bunun sonucu olarakta, deney gruplarının haftalara göre birbirleri arasında anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p < 0.05$ ) (Tablo 7).

Haftalar	Osteopontin				Ki-kare	P değeri
	Boyama Yok		Boyama Var			
	Sayı	%	Sayı	%		
2 Hafta	29	96,7	1	3,3	5,2	<b>0,023</b>
8 Hafta	23	76,7	7	23,3		
2 Hafta	29	96,7	1	3,3	31,1	<b>0,000</b>
12 Hafta	8	26,7	22	73,3		
8 Hafta	23	76,7	7	23,3	15,0	<b>0,000</b>
12 Hafta	8	26,7	22	73,3		
2 Hafta	29	96,7	1	3,3	35,1	<b>0,000</b>
8 Hafta	23	76,7	7	23,3		
12 Hafta	8	26,7	22	73,3		

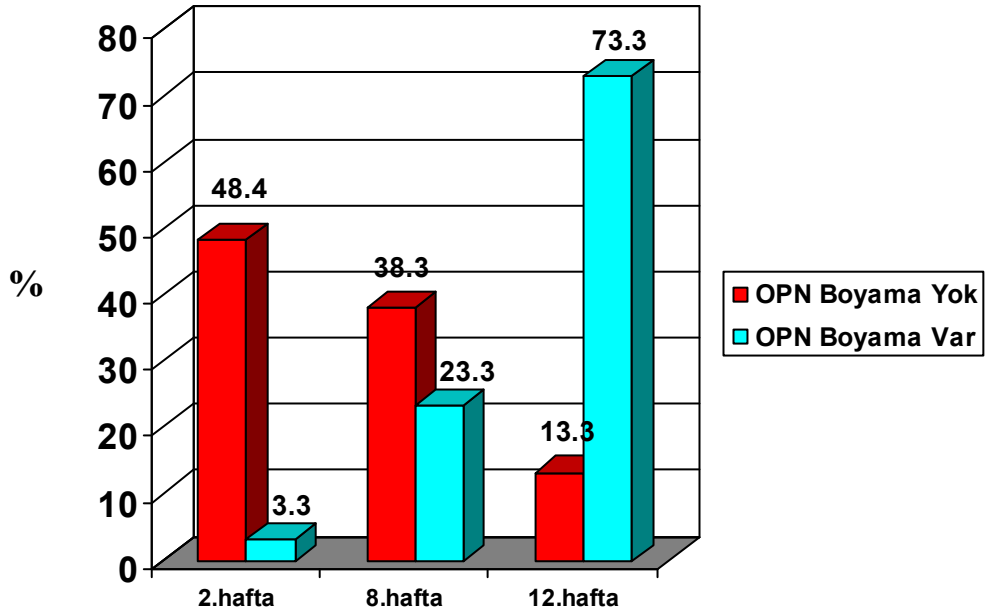
$p < 0,05$

**Tablo 7:** Haftalara göre osteopontin ile boyanan denek sayıları ve oranları

Osteopontin ekspresyonu 2. haftada çok az oranda (% 3.3) olurken, 8. haftada bu oran artmış (% 23.3), 12. haftada ise ciddi bir farklılık yaratmıştır (% 73,3). Böylece iyileşme süresi boyunca uygulanan kesit alınma zamanları arasında oluşan osteogenezise bağlı olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Grafik 1).

Bu durum iyileşme süresinin ilerlemesine paralel olarak osteogenezisin arttığı ve osteopontin ile boyanmaya pozitif yanıt verdiği şeklinde yorumlanabilir. 2. haftada pozitif boyanma minimal iken, 12. haftada bu oran pik yaparak %73,3'e kadar yükselmiştir.





**Grafik 1:** Bütün gruplarda haftalara göre osteopontin ekspresyonu yüzde oranının kıyaslaması.

Gruplar arası Ki-kare testi uygulanmış ve osteopontin boyama pozitifliğine göre farklılık değerleri elde edilmiştir (Tablo 8). Bütün gruplar ikili olarak birbiriyle kıyaslandığında 'p' değerleri hesaplanarak, farklılıklar ortaya konulmuştur. Bu değerler dikkate alındığında; Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu ile Greft grubunun kıyaslamasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,024$ ).

Bu durum, osteokondüktif etkili grefte TZP ve mezenkimal kök hücrelerin eklenmesinin osteoindüksiyonu sağladığı ve osteogenezisi anlamlı bir oranda arttırdığı şeklinde yorumlanmıştır.

Osteopontin		Boyama Var		Ki kare	p değeri
		Sayı	%		
1	Greft Grubu Greft+TZP Grubu	4	19,0	X=0,53	0,47
		6	28,6		
2	Greft Grubu Greft+Kök Hücre Grubu	4	19,0	X=2,79	0,090
		9	42,9		
3	Greft Grubu Greft+Kök Hücre+TZP Grubu	4	19,0	X=5,08	<b><u>0,024</u></b>
		11	52,4		
4	Greft+TZP Grubu Greft+Kök Hücre Grubu	6	28,6	X=0,93	0,33
		9	42,9		
5	Greft+TZP Grubu Greft+Kök Hücre+TZP Grubu	6	28,6	X=2,47	0,12
		11	52,4		
6	Greft+Kök Hücre Grubu Greft+Kök Hücre+TZP Grubu	9	42,9	X=0,38	0,54
		11	52,4		

p<0,05

**Tablo 8:** Grupların osteopontin boyama pozitifliğine göre ikili kıyaslamaları.

Bu istatistiksel değerler göz önüne alındığında gruplar arası kıyaslamada, en iyi osteopontin ile pozitif boyanan grubun Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu olduğu (%52,4), bunu sırasıyla Greft+ Mezenkimal kök hücre grubu (%42,9) ile Greft+TZP grubunun (%28,6) takip ettiği ve son olarak sadece Greft uygulanan grubun (%19,0) izlediği görülmüştür.

## B) OSTEONEKTİN ENZİM EKSPRESYONUNUN DEĞERLENDİRMESİ

Osteonektin enzim ekspresyonları her grup için 2., 8. ve 12. haftalarda puanlanarak değerler elde edilmiştir. Osteonektin ile boyanan hücrenin varlığı: 1, Osteonektin ile boyanan hücrenin yokluğu: 0 değeri ile ifade edilmiştir (Tablo 9).

GRUPLAR	DERECELER	2.Hafta osteonektin ile boyanan hücre	8.Hafta osteonektin ile boyanan hücre	12.Hafta osteonektin ile boyanan hücre
<b>1.GRUP KONTROL GRUBU</b>	<b>0</b>	7	7	7
	<b>1</b>	0	0	0
<b>2.GRUP GREFT GRUBU</b>	<b>0</b>	7	6	3
	<b>1</b>	0	1	4
<b>3.GRUP GREFT+TZP GRUBU</b>	<b>0</b>	7	5	2
	<b>1</b>	0	2	5
<b>4.GRUP GREFT+MKH GRUBU</b>	<b>0</b>	6	3	0
	<b>1</b>	1	4	7
<b>5.GRUP GREFT+TZP+ MKH GRUBU</b>	<b>0</b>	5	2	0
	<b>1</b>	2	5	7

**Tablo 9.** Osteonektin ile boyanan hücre derecelenmesi;  
 (0): Osteonektin ile boyanan hücrenin mevcut olması  
 (1): Osteonektin ile boyanan hücrenin olmaması

Osteonektin ekspresyonu derecelendirilmesine göre yapılan istatistiksel değerlendirmede kontrol grubunun her üç çalışma süresinde (2., 8. ve 12. haftalarda) yer alan 7'şer kesitinde osteonektin ile hiçbir kesitin pozitif boyanmadığı saptanmış ve bu da bize herhangi bir osteoblastik aktivitenin başlamadığını göstermiştir.

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan 2. grupta ise erken dönem olan 2. haftada hiçbir hücre osteonektin ile boyanmazken; 8. haftada 1 kesitte, 12. haftada ise 4 kesitte boyanan hücre varlığı saptanmıştır. Bu da iyileşme sürecinin ilerlemesine bağlı olarak osteogenezisin başladığını göstermektedir.

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP'nin birlikte uygulandığı 3. grupta da 2. ve 8. hafta bulguları, sadece Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan 2. gruba benzerlik gösterse de, 12. haftada farklı olarak

osteonektinle boyanan hücre varlığının olduğu kesit sayısı 5 olup, bu da yüksek bir oran olarak değerlendirilmiştir. Bu durum, grefte TZP ilavesiyle osteoblastik aktivitenin sürenin ilerlemesine paralel olarak arttığı ve osteogenezisin başladığı şeklinde yorumlanmıştır.

Greft ve mezenkimal kök hücrenin birlikte uygulandığı 4. grupta ise erken dönem olan 2. haftada osteonektin ile boyanan hücrenin yalnızca bir kesitte olduğu izlenirken, 8. haftada boyama olan kesit sayısının arttığı, ancak 12. haftada ise tüm kesitlerin boyamaya pozitif yanıt gösterdiği saptandı. Bu durum osteokondüktif etkili grefte mezenkimal kök hücre ilavesiyle osteogenezisin oldukça arttığını göstermekle beraber, mezenkimal kök hücrenin osteoblastik aktiviteyi yükselttiğini gösteren önemli bir materyal olduğu şeklinde yorumlanmıştır.

Greft+TZP ve mezenkimal kök hücrenin birlikte uygulandığı 5. grupta, erken dönem olan 2. haftada osteonektinle boyanan hücrelerin varlığı sadece 2 kesitte saptanırken, 8. haftada 5 kesitte ve 12. haftada ise tüm kesitlerde izlenmiştir. Bu da sürenin erken döneminde bile osteogenezisin başladığını ve ilerleyen sürede ise ideal bir osteogenezisin elde edildiğini göstermiştir. Düzenli sıralanmış kemik yapısının ve osteogenezisin elde edilmesi, bu kombinasyonun ideal bir karışım olduğu yönünde önemli bir bulgu olarak yorumlanmıştır.

Hem mezenkimal kök hücrenin greftle birlikte uygulandığı 4. grupta, hem de mezenkimal kök hücrenin greft ve TZP ile birlikte uygulandığı 5. grupta ideal bir osteogenezisin elde edilmesi, düzenli bir kemik yapının oluşması ve erken dönemde osteoblastik aktivitenin başlaması gibi kriterler gözönüne alındığında **“bu kombinasyonun osteokondüktif özelliğinin yanısıra osteoindüktif bir özelliği olduğu”** şeklinde yorumlanmış ve bu özellikler histolojik ve immünohistokimyasal olarak gözlenmiştir.

Ki-kare testi kullanılarak 2., 8. ve 12. hafta deney gruplarının osteonektin enzim ekspresyonları karşılaştırılmıştır. Bunun sonucu olarak, deney süresi boyunca haftalara göre birbirleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmuştur ( $p < 0.05$ ) (Tablo 10). 2. ve 8. haftalar arası kıyaslamada farklılık anlamlı iken ( $p = 0.023$ ), diğer tüm kıyaslamalarda bu anlamlılık derecesinin

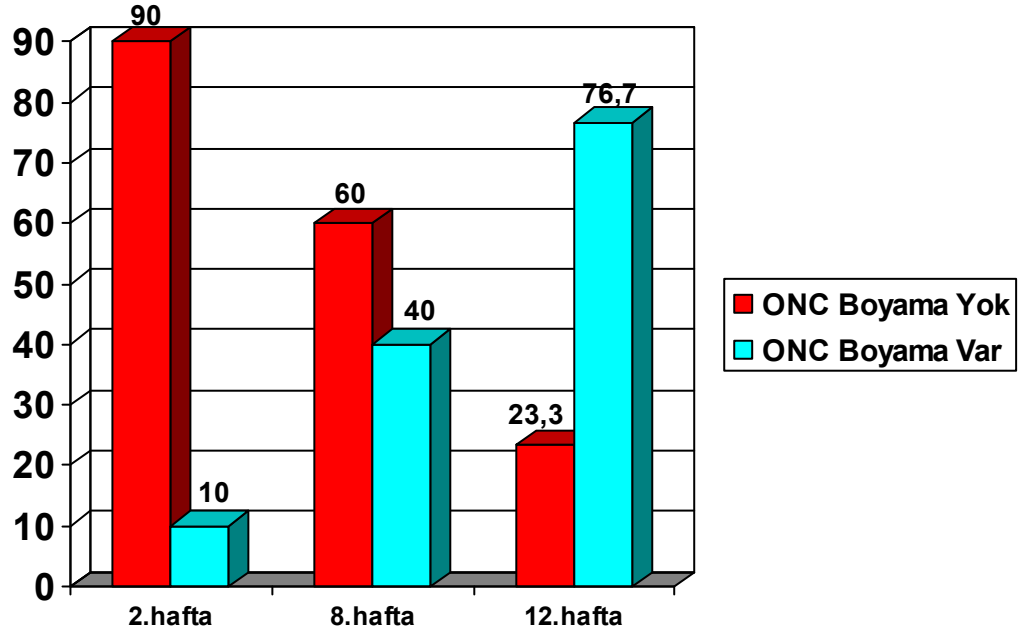
daha fazla olduğu saptanmıştır ( $p=0.000$ ). Bu istatistiksel anlamlılıkların, iyileşme süresinin ilerlemesine paralel olarak osteonezisin ve osteoblastik aktivitenin artışına bağlı olduğu düşünülmüştür.

Haftalar	Osteonektin				Ki-kare	P değeri
	Boyama Yok		Boyama Var			
	Sayı	%	Sayı	%		
2 Hafta 8 Hafta	27 18	90,0 60,0	3 12	10,0 40,0	7,2	<b>0,007</b>
2 Hafta 12 Hafta	27 7	90,0 23,3	3 23	10,0 76,7	27,1	<b>0,000</b>
8 Hafta 12 Hafta	18 7	60,0 23,3	12 23	40,0 76,7	8,3	<b>0,004</b>
2 Hafta 8 Hafta 12 Hafta	27 18 7	90,0 60,0 23,3	3 12 23	10,0 40,0 76,7	27,4	<b>0,000</b>

$p < 0,05$

**Tablo 10:** Haftalara göre osteonektin ile boyanan denek sayıları ve oranları.

Osteonektin ekspresyonu 2. haftada çok az oranda (% 10) olurken, 8. haftada bu oran artmış (% 40), 12. haftada ise ciddi bir fark yaratmıştır (% 76.7). Böylece deney süresi boyunca uygulanan kesit alınma zamanları arasında oluşan osteogenezise bağlı olarak anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir (Grafik 2).



**Grafik 2:** Bütün gruplarda haftalara göre osteonektin ekspresyonu yüzde oranının kıyaslaması.

Gruplar arası Ki-kare testi uygulanarak osteonektin boyama pozitifliğine göre farklılık değerleri elde edilmiştir. Bütün gruplar ikili olarak birbiriyle kıyaslandığında 'p' değerleri hesaplanarak farklılıklar ortaya konulmuştur (Tablo 11).

Osteonektin		Boyama Var		Ki kare	p değeri
		Sayı	%		
1	Greft Grubu Greft+TZP Grubu	5	23,8	X=0,47	0,50
		7	33,3		
2	Greft Grubu Greft+Kök Hücre Grubu	5	23,8	X=4,84	<b><u>0,028</u></b>
		12	57,1		
3	Greft Grubu Greft+Kök Hücre+TZP Grubu	5	23,8	X=7,78	<b><u>0,005</u></b>
		14	66,7		
4	Greft+TZP Grubu Greft+Kök Hücre Grubu	7	33,3	X=2,40	0,12
		12	57,1		
5	Greft+TZP Grubu Greft+Kök Hücre+TZP Grubu	7	33,3	X=4,67	<b><u>0,031</u></b>
		14	66,7		
6	Greft+Kök Hücre Grubu Greft+Kök Hücre+TZP Grubu	12	57,1	X=0,40	0,53
		14	66,7		

p<0,05

**Tablo 11:** Grupların osteonektin boyama durumlarına göre kıyaslanmaları.

Bu değerler dikkate alınarak gruplar arası kıyaslamalar yapılmıştır. Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu ile Greft grubu arasında osteonektin boyanma pozitifliğine göre anlamlı bir farklılık saptanmıştır (3. grup, p=0,005). Aynı şekilde istatistiksel olarak Greft grubu ile Greft+Mezenkimal kök hücre grubu arasında (2. grup, p=0,028) ve Greft+TZP grubu ile Greft+Mezenkimal kök hücre+TZP grubu arasında (5. grup, p=0,031) anlamlı farklılık bulunmuştur.

İstatistiksel değerlendirme sonucu Greft grubu ile Greft+Mezenkimal kök hücre grupları arasındaki değerlerin anlamlı çıkması ve yaklaşık 2 katı kadar bir fark yaratmış olması, bize Mezenkimal kök hücrenin osteogenezis üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermektedir. Özellikle kemik defektlerinde grefte ilave edilen Mezenkimal kök hücrelerin iyileşmeyi 2

katına kadar arttırması oldukça önemli bir bulgu olup, ideal bir materyalin elde edilmesi hedefimize yaklaştığımız kanısı da uyanmıştır.

Üstelik bu materyale TZP ilavesinin olayı bir derece üst seviyeye çıkarması da, bu ürünün seçilebilecek bir materyal olduğunu düşündürse de bu durum “iyileşme açısından tercih hekime bırakılmalıdır” şeklinde yorumlanmıştır.

Bu istatistiksel değerler göz önüne alındığında gruplar arası kıyaslamada, en iyi osteonektin ile pozitif boyanan grubun Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu olduğu (%66,7), bunu sırasıyla Greft+ Mezenkimal kök hücre grubunun (%57,1), Greft+TZP (%33,3) grubunun ve son olarak sadece Greft uygulanan grubun (%23,8) izlediği saptanmıştır (Tablo 11).

### **C) OSTEOSİT YOĞUNLUĞUNUN DEĞERLENDİRMESİ**

İncelenen kesitlerde osteosit hücreleri de incelenmiş ve bulunduğu alanda yoğunlukları değerlendirilmiştir. Bu yoğunluk değerleri, kontrol grubuna göre kıyaslanmış, 2., 8. ve 12. haftalarda yüzde olarak puanlandırılmıştır. Kontrol grubundan %10 daha fazla osteosit yoğunluğunun olması (1) ile, Kontrol grubundan %20 daha fazla osteosit yoğunluğunun olması (2) ile, Kontrol grubundan %30 daha fazla osteosit yoğunluğunun olması ise (3) ile ifade edilmiştir (Tablo 12).



GRUPLAR	DERECELER	2.Hafta osteosit yoğunluğu (n)	8.Hafta osteosit yoğunluğu (n)	12.Hafta osteosit yoğunluğu (n)
Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft grubu	0	5	2	0
	1	1	3	2
	2	1	2	3
	3	0	0	2
Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft + TZP grubu	0	6	3	0
	1	1	3	4
	2	0	1	2
	3	0	0	1
Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft + Mezenkimal kök hücre grubu	0	3	2	0
	1	2	1	0
	2	2	1	3
	3	0	3	4
Bifazik kalsiyum fosfat seramik greft + TZP + Mezenkimal kök hücre grubu	0	3	1	0
	1	1	2	0
	2	2	2	1
	3	1	2	6

**Tablo 12.** Osteosit yoğunluğunun kontrol grubuna göre derecelendirilmesi  
(1): Kontrol grubundan %10 daha fazla osteosit yoğunluğunun olması  
(2): Kontrol grubundan %20 daha fazla osteosit yoğunluğunun olması  
(3): Kontrol grubundan %30 daha fazla osteosit yoğunluğunun olması  
n=7 (Her gruptaki kalvaryum kesit sayısı)

Yapılan bu değerlendirme tablosunda; Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti uygulanan grubun osteosit yoğunluğunun, kontrol grubuna oranla 2. haftada önemli bir farklılık göstermediği, 8. ve 12. haftalarda ise benzer şekilde %10-20 arasında olduğu izlenmiştir.

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve TZP uygulanan grupta ise osteosit yoğunluk oranının, sadece bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti

uygulanan gruba benzerlik gösterdiği ve %10-20 arasında olduğu görülmüştür.

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve mezenkimal kök hücre uygulanan grupta ise, osteosit yoğunluğunun 2. ve 8. haftalarda her aralıkta olmasının yanısıra, 12. haftada yükselerek tüm kesitlerde %30 oranında bir yoğunluk gösterdiği saptanmıştır.

Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve Mezenkimal kök hücrenin birlikte uygulandığı son grupta ise; osteosit yoğunluğunun 2. haftada her aralıkta görüldüğü, 8. haftada bu yoğunluğun giderek arttığı ve 12. haftada ise bu yoğunluğu %30 oranında olduğu izlenmiştir (Tablo 12).

Bu bulgular bize Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti, TZP ve mezenkimal kök hücrenin kombine kullanımının, osteosit yoğunluğunu kontrol grubuna kıyasla oldukça arttırdığını (%30) ve bu kombinasyonun osteogenezis için ideal olduğu sonucunu göstermiştir.

Toplamda hiç osteosit olmayan 31 kesit (% 34,4), kontrol grubundan %10 fazla olan 20 kesit (% 22,2), kontrol grubundan %20 fazla olan 20 kesit (% 22,2) ve kontrol grubundan %30 fazla olan 19 kesit (% 21,1) olduğu tespit edilmiştir (Tablo 13).

Osteosit Yoğunluğu	Sayı	%
Hiç Osteosit Yok	31	34,4
% 10'dan Fazla	20	22,2
% 20'den Fazla	20	22,2
% 30'dan Fazla	19	21,1
Total	90	100,0

**Tablo 13:** Osteosit yoğunluğu derecelendirilmesinin toplam kesit sayısına göre dağılımı.

Haftalara göre tüm gruplarda osteosit yoğunluğunun, kontrol grubundan %10 daha fazla 8. haftada gerçekleştiği (%30.0) ve %20 ile %30 arasındaki yoğunluğun ise 12. haftada olduğu saptanmıştır (%43.3) (Tablo 14).

Haftalar	Osteosit Yoğunluğu								Ki-Kare	P Değeri
	Hiç Osteosit Yok		% 10'dan Fazla		% 20'den Fazla		% 30'dan Fazla			
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%		
2. Hafta	19	%63,3	5	%16,7	5	%16,7	1	%3,3	6,7	0,082
8. Hafta	10	%33,3	9	%30,0	6	%20,0	5	%16,7		
2. Hafta	19	%63,3	5	%16,7	5	%16,7	1	%3,3	25,3	0,000
12. Hafta	2	%6,7	6	%20,0	9	%30,0	13	%43,3		
8. Hafta	10	%33,3	9	%30,0	6	%20,0	5	%16,7	10,1	0,018
12. Hafta	19	%6,7	6	%20,0	9	%30,0	13	%43,3		
2. Hafta	2	%63,3	5	%16,7	5	%16,7	1	%3,3	28,4	0,000
8. Hafta	10	%33,3	9	%30,0	6	%20,0	5	%16,7		
12. Hafta	19	%6,7	6	%20,0	9	%30,0	13	%43,3		

p<0,05

**Tablo 14:** Haftalara göre osteosit yoğunluğu derecelendirilmesinin toplam kesit sayısına göre dağılımı.

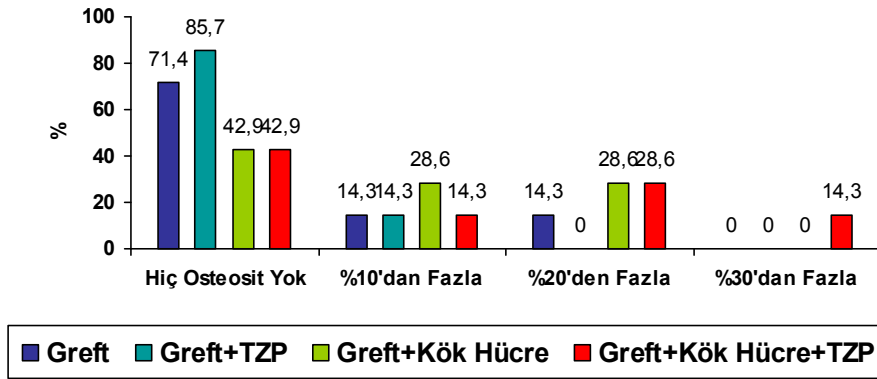
Deney süresince kesitlerin alındığı haftalara göre osteosit yoğunluğu incelendiğinde, tüm haftalar için arzu edilen 3 değeri (kontrol grubundan % 30 daha fazla osteosit yoğunluğu), sürenin ilerlemesine paralel olarak artış göstermektedir. Bu değer 2. haftada 1 kesitte (% 3.3), 8. haftada 5 kesitte (%16.7) ve 12. haftada ise 13 kesitte (% 43.3) görülerek, anlamlı farklılıklar saptanmıştır (Tablo 14).

2. haftada osteosit yoğunluğu oranı gruplar arası kıyaslanmış ve kontrol grubuna oranla %10'dan fazla yoğunluğun Greft+Mezenkimal kök hücre grubunda olduğu saptanmıştır (%28,6). Bunu %20 yoğunluk oranında Greft+Mezenkimal kök hücre grubu ile Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubunun izlediği (%28,6); %30 yoğunluk oranının ise sadece Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubunda gerçekleştiği görülmüştür (%14,3) (Grafik 3).

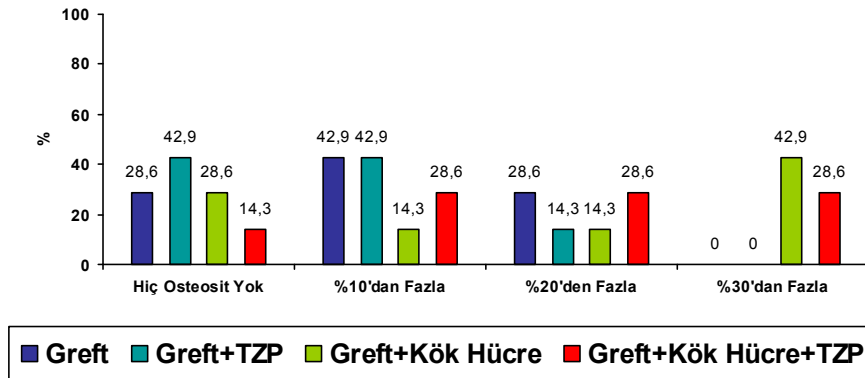
8. haftadaki osteosit yoğunluğu oranı gruplar arası kıyaslanmış ve kontrol grubuna oranla %10'dan fazla yoğunluğun sadece Greft grubu ile Greft+TZP grubunda olduğu görülmüştür (%42,9). Bunu %20 yoğunluk oranı ile sadece Greft uygulanan grup ile Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre uygulanan grubunun izlediği (%28,6); %30 yoğunluk oranını ise Greft+Mezenkimal kök hücre grubunun en fazla gösterdiği saptanmıştır (%42,9) (Grafik 3).

12. haftadaki osteosit yoğunluğu oranı gruplar arası kıyaslandığında kontrol grubuna oranla %10'dan fazla yoğunluğun Greft+TZP grubunda olduğu görülmüştür (%57,1). %20'den fazla yoğunluğun sadece Greft uygulanan grup ile Greft+Mezenkimal kök hücre grubunda görüldüğü (%42,9); %30'dan fazla osteosit yoğunluğunun ise en fazla Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubunda gerçekleştiği saptanmıştır (%85,7)(Grafik 3).

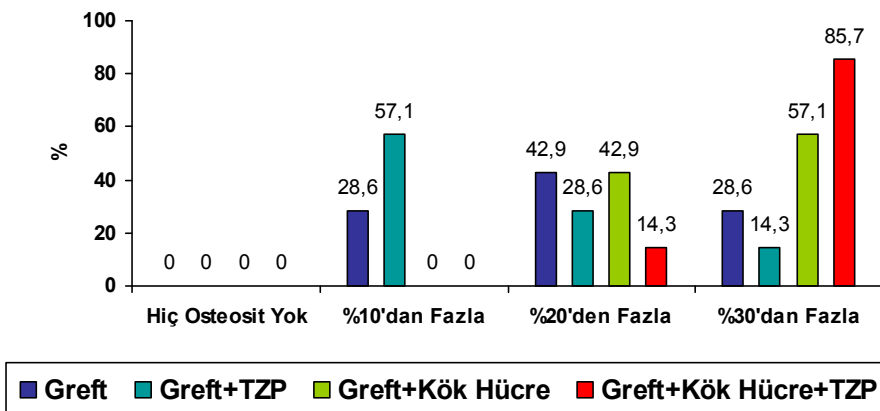
2. haftada Gruplararası Osteosit Yoğunluğu Oranları



8. haftada Gruplararası Osteosit Yoğunluğu Oranları

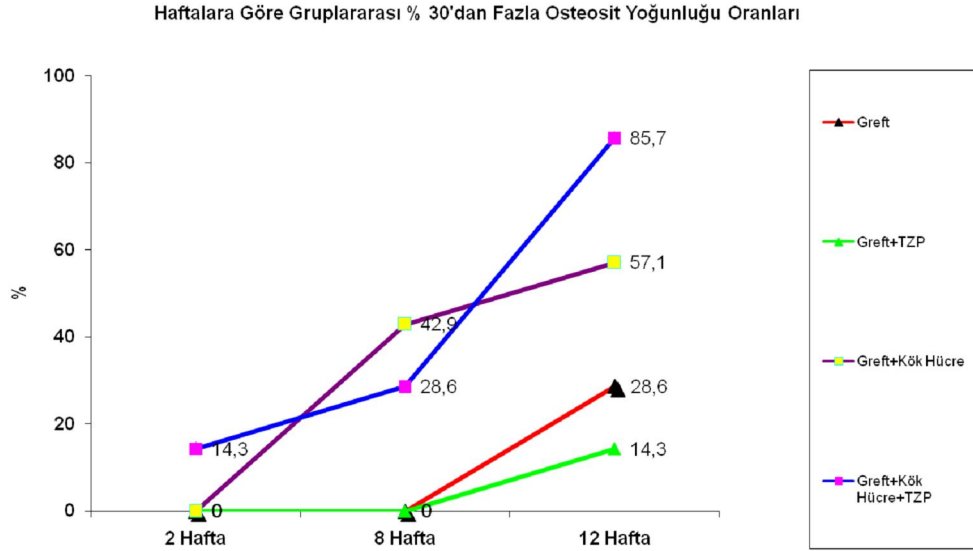


12. haftada Gruplararası Osteosit Yoğunluğu Oranları



**Grafik 3:** 2., 8. ve 12. haftalarda osteosit yoğunluğunun gruplar arası karşılaştırılması.

Osteosit yoğunluğunun %30'dan fazla olduğu 12. haftada en iyi değer Greft+Mezenkimal kök hücre+TZP grubunda gerçekleşmiştir (%85,7). Bunu sırasıyla Greft+Mezenkimal kök hücre grubu (%57,1), Greft grubu (%28,6) ve son olarak Greft+TZP (%14,3) grubunun izlediği saptanmıştır (Grafik 3,4).



**Grafik 4:** Haftalara göre %30'dan fazla osteosit yoğunluğu oranlarının karşılaştırılması

2. hafta için Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre uygulanan grup (% 14,3) hariç; diğer gruplarda '3' derecesinde osteosit yoğunluğu görülmemiştir (Grafik 3). Bu da erken dönem için osteosit artışının en iyi olduğu grubun Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu olduğunu göstermektedir. 8. haftada Greft+Mezenkimal kök hücre grubu en yüksek oranda (%42.9), 3. derece osteosit yoğunluğu göstermiştir. Bu grubu, Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu izlemiştir (%28.6). Diğer gruplarda 8. haftada '3' derecesinde osteosit yoğunluğu gösteren kesit tespit edilmemiştir (Grafik 3).

Bu grafiklerden de anlaşıldığı üzere mezenkimal kök hücre uygulanan gruplarda, hem erken dönemde osteosit yoğunluğunun arttığı ve osteoblastik aktiviteyi başlattığı görülmüş, hem de sonraki iyileşme dönemlerinde osteogenezisin hızlı ve kaliteli bir şekilde gerçekleştiği gözlenmiştir.

## 6. TARTIŞMA

Kranial kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda 19. yüzyıldan günümüze kadar otojen greftler, sentetik, yarı sentetik ve alloplastik materyaller kullanılmıştır. Kemik dokunun iyileşmesi ile ilgilenen araştırmacılar uzun yıllar boyunca, kırık iyileşmesini hızlandıracak, kemik defektlerinin kendiliğinden ve hızlı bir biçimde rejenerasyonunu sağlayacak yöntemler üzerinde çalışmışlardır. Daha büyük defektlerde ise, rekonstrüksiyon amacıyla kullanılan kemik grefti veya kemik benzeri alloplastik maddelerin daha hızlı ve daha az komplikasyonla osteointegrasyona yardımcı olacak yöntemleri ve kombinasyonları üzerinde çalışmışlardır. Bazı başarılı sonuçlar bildirilmesine karşın, bu çalışmaların kliniğe yansımaları beklenen düzeyde olmamıştır<sup>218</sup>.

Deney hayvanlarında kraniumdaki defektlerin rejeneratif kapasitelerinin insanlardakinden daha iyi olduğu bilinmektedir. Kranium, morfolojik ve embriyolojik açıdan bir membran prosesinden gelişim gösterir ve bu nedenle de yüz bölgesinde yer alan membranöz yolla gelişmiş diğer kemiklerle benzerlik gösterir. Anatomik olarak kranium iki kortikal tabaka içerir ve bu açıdan mandibulaya benzerlik gösterir. Fizyolojik olarak da kraniumun kortikal kemiği, atrofik bir mandibulaya benzerlik gösterir<sup>219</sup>. **Bu nedenden dolayı bizde literatürlerle uyumlu olarak matür Wistar Albino ratların kranial bölgelerinde çalışmamızı gerçekleştirmeyi planladık.**

Sıçanlarda kritik büyüklükteki kemik defektinin boyutu konusunda net bir fikir birliği yoktur. Çoğu araştırmacı 8 mm'yi kabul ederken, bir kısmı da 6 mm ve hatta 4 mm'yi kritik boyut kemik defekti olarak kabul etmiştir<sup>3,34,210,211,214,220</sup>. Bizim çalışmamızda ise 7 mm'lik tam kat kemik defekti yaratılarak, kritik büyüklükteki kranial kemik defekti oluşturulmuştur.

Kranial kemik defektinin iyileşmesi sırasında ölü boşluğu çevreleyen dokuların sağlıklı olması gerekmektedir. Kraniumda periosteum ve özellikle dura bu olayda önemlidir<sup>221</sup>. Yeni oluşan kemik çevreden merkeze doğru (sentripedal) oluşmaktadır<sup>221</sup>. Etraftaki kemik doku, dura ve periosteum olmaksızın yetersiz yeni damarlanma ve kemikleşme gösterir. Diğer iskelet

yapılarının aksine, kranial kemiklerinin iyileşmesinde periosteumun daha az bir önemi vardır<sup>221,222</sup>. Ancak dura ile periosteumun karşılıklı etkileşiminin de önemli olduğu bildirilmiştir<sup>222</sup>. **Bu çalışmada kemik defekti oluşturulurken dura ve altındaki sagittal sinüs korunmuş ve kesilen periosteum, defekt üzerine getirilerek onarılmıştır. İçeride kalan ölü boşlukta yumuşak doku büyümesi ve fibroblastik aktivite, greft ve membran kullanılarak en aza indirgenmiş ve implante edilen materyallerin çevre dokulara migrasyonu önlenmiştir.**

Kemik metabolizmasının bazı kimyasal, elektriksel ve mekaniksel uyarılar ile kontrol edildiği; kemik iyileşmesi sırasında trombosit, makrofaj ve fibroblastlardan büyüme faktörü olarak bazı peptidlerin salgılandığı bilinmektedir. Bu proteinler kemik iyileşmesi sırasındaki karmaşık trafiği düzenleyerek; migrasyon, proliferasyon ve diferansiyasyon ile rezorbsiyon arasındaki hassas dengeyi lokal olarak sağlamaktadırlar. Aynı zamanda bugüne kadar yapılan çalışmalarda, kemik iyileşmesinde rol alan birçok kemik uyarıcı faktör tanımlanmıştır<sup>218</sup>.

Yakın zamanlara kadar otogreft alternatif olarak, en sık allogreftler tercih edilmekteydi. Ancak mevcut hastalık transfer riski, yabancı cisim reaksiyonu gibi riskleri ortadan kaldırmak için uygulanan işlemlerin osteojenik özellikleri zayıflatmasından dolayı allogreftlerin kullanımı kısıtlanmıştır<sup>223,224</sup>.

Kemik, sağlamlık ve katılığını organik bileşiklerinden; esneklik, sürekli kemik yapımı ve tamir yeteneğini ise inorganik bileşenlerinden alan bir yapıdır<sup>225</sup>. Sert doku defekt bölgelerinde uygulandıkları alanlarda uzun süre fiziksel yapılarını koruyan ve son yıllarda kemik grefti materyali olarak önemi artan  $\beta$ -trikalsiyum fosfat esaslı greft malzemeleri, klinikte yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Bu materyal özellikle maksillofasiyal cerrahi, travmatoloji ve el cerrahisinde kullanım alanları bulmuştur. Saf  $\beta$ -trikalsiyum fosfatın maksillofasiyal cerrahideki tedavi modelleri içerisinde büyük kist kavitelerinin doldurulması, preprotetik cerrahi, sinüs lifting, kemik ogmentasyonları, implant cerrahisi ve periodontal lezyonlar bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda,  $\beta$ -trikalsiyum fosfatın tam olarak rezorbsiyonunun 12-18 ay arasında olduğu gösterilmiştir. Bu süre içerisinde fonksiyonel ve anatomik



olarak orijinal kemikle yer değiştirdiği görülmüştür<sup>226</sup>. Kemik greft uygulamalarında, rezorbsiyon hız ve mekanizmasının anlaşılması büyük önem taşımaktadır. Uygulanacak olan materyal yeni kemik yapımında osteoindüktif ve osteokondüktif etki gösterirken, zaman içerisinde ortamdan tamamen uzaklaşarak yeni kemikle yer değiştirilebilmelidir. Kullanılan değişik özellikleri greft malzemelerinin incelendiği klinik ve deneysel çalışmalarda, farklı miktarlarda yeni kemik yapımı gösterilmiştir. Greft malzemesinin ortamda 6–42 ay süreyle varlığını koruduğunu gösteren çeşitli çalışmalar literatürde bulunmaktadır<sup>227</sup>.

Travma veya konjenital nedenlerle oluşmuş kemik defektlerinde ve dentofasiyal deformiteler nedeniyle gerçekleştirilen osteotomi alanlarında, sıklıkla kemik grefti ile rekonstrüksiyonlar yapılmıştır<sup>228</sup>. Defekt alanları spontan iyileşmeye bırakıldığında, fibrotik yapının g ile bölgede fibröz doku oluşumu başlar. Bu Şekilde gerçekleşen fibrotik iyileşmeyle birlikte klinik olarak kaynamama (non-union) ve enkapsülasyon gibi komplikasyonlar da oluşabilmektedir. Bundan kaçınmak ve, kemik hücrelerinin bölgede rejenerasyonunu sağlamak amacıyla defektlerin greft materyali ile rekonstrüksiyonuna ihtiyaç vardır<sup>229</sup>.

Walsh ve arkadaşları greft uygulamasının önemini belirttikleri çalışmalarında, koyun femurunda oluşturdukları defektlerin bir grubuna otojen greft uygulamışlar, diğer gruba ise bir Şey uygulamadan spontan iyileşmeye bırakmışlardır. Spontan iyileşmeye bıraktıkları grupta fibrotik olarak iyileşme gözlerken, otojen greft uyguladıkları defektlerde ise sağlıklı kansellöz kemiğe benzer kemik dokusunun oluştuğunu belirtmişlerdir<sup>99</sup>.

Alternatif bulma amacıyla son yıllardaki araştırmalarda, sentetik materyallerde büyük gelişmeler yaşanmıştır. Bu araştırmaların öncesinde sentetik materyaller, otogreft ve allogreftlere göre çok sık tercih edilmemekteydi. Dünya çapında tüm greftler içinde sentetik greft kullanımı, sadece %10 oranlarıyla sınırlıydı. Bu sınırlı kullanımlarının nedeni, tahmin edilemeyen rezorbsiyon süreleri, Őekillendirmedeki zorluk, yabancı cisim reaksiyonu oluşturması ile yetersiz klinik ve deneysel çalışmalardı. Bu komplikasyonlar; mevcut sentetik materyallerin modifiye edilmesi, yeni

sentetik materyallerin elde edilmesi ve bu konuda yapılan araştırmaların sayısının artması ile oldukça azalmıştır. Sentetik materyaller ile ilgili çalışmalar arttıkça, otogreftlere ve allogreftlere olan üstünlükleri ortaya çıkmış ve kullanımları yaygınlaşmıştır<sup>230,231</sup>.

Ruhaimi isimli araştırmacı ise kalsiyum sülfat ile yaptığı deneysel çalışmasında, kalsiyum sülfatı diğer greft materyalleri ile ¼ oranında karıştırmış ve sonuç olarak kalsiyum sülfatın osteogenezisi kolaylaştırdığını ve kombinasyon içinde yer alan kalsiyum sülfatın kemik ile greft arasındaki fiziksel atamanı arttırdığını rapor etmiştir<sup>232</sup>.

İdeal greft materyaline ulaşma çabaları, sentetik greft materyalleri grubu içinde yer alan Hidroksilapatit ve  $\beta$ -trikalsiyum fosfat üzerinde çalışmalar yapılmasına neden olmuştur. Bifazik kalsiyum fosfat seramikleri; Hidroksilapatit ve  $\beta$ -trikalsiyum fosfat karışımlarından elde edilmiştir. En büyük özellikleri, matrisinin mikro yapılarıdır. Bu mikro yapı, bir ađ oluşturacakları zaman hücresel ve vasküler penetrasyona daha çok izin verir. Böylece porlar arasında kemik oluşumu sağlanmış olur<sup>233,234</sup>. **alışmamızda kullandığımız bifazik kalsiyum fosfat seramik greft materyalinin por büyüklüğü 100-500  $\mu$ m'dir. Bu por büyüklüğü optimal hücresel penetrasyonu ve vaskülarizasyonu desteklemektedir. Bu da implantın kemiğe integrasyonunu güçlendiren önemli bir faktördür.**

Çalışmamızda kullandığımız  $\beta$ -TCP/HA materyali de, ideal grefte ulaşmak amacıyla üretilmiş bir kombinasyondur. Bu karışımda kullanılan her iki greft materyali daha önce tek başlarına defalarca kullanılmış olup, olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak özellikle  $\beta$ -TCP'ın yerleştirildiği defekte kırılğan özellik göstermesi, kuvvetlere karşı koyamaması ve HA'in de rezorbe olmayıp uzun zaman defekt bölgesinde kalması çeşitli komplikasyonlara neden olmuştur. Bu komplikasyonları ortadan kaldırmak için, iki greft materyali biraraya getirilip değişik oranlarda kombine edilmiş ve kemik defektlerinde kullanılmaya başlanmıştır<sup>235</sup>.

Daculsi ve arkadaşları farklı  $\beta$ -TCP/HA oranlarını (15/85, 35/65, 85/15) karşılaştırdıkları deneysel çalışmalarında, bu farklı oranların greft materyalinin sadece rezorbsiyon süresine etkili olduğunu rapor etmişlerdir<sup>118</sup>.

Bu oranda artan  $\beta$ -TCP daha hızlı bir rezorbsiyonu gerçekleştirirken, artan HA oranı ise daha uzun süren bir rezorbsiyon zamanını göstermektedir.  $\beta$ -TCP tek başına kullanıldığında HA'e göre daha kolay rezorbe olup, daha çabuk ortamdan elimine edilmektedir. Yapılan farklı araştırmalarda TCP ve HA kombinasyonundan oluşan bifazik kalsiyum fosfatın ise, periodontal defektlerin tamirinde her iki seramik materyalden de daha etkili olduğu bildirilmiştir<sup>236</sup>.

Farina isimli araştırmacı ve arkadaşları, 6 köpeğin tüm premolarlarını çekerek, 3 ay sonra sağ bölgeye %85 HA + %15  $\beta$ -TCP (BCP1), sol bölgeye %15 HA+ %85  $\beta$ -TCP (BCP2) uygulamışlar ve 4., 12., 26. hafta sonra histolojik incelemeye almışlardır<sup>237</sup>. Yapılan bu çalışmada daha erken ve daha kaliteli kemik oluşumunun BCP2' de gerçekleştiği ve fosfat aşamasının rezorbe olarak, bu alanlara kemik göçünün hem BCP2' de, hem de BCP1'de gözlemlendiği rapor edilmiştir. Her iki aşama değerlendirildiğinde; BCP2'nin BCP1'den daha hızlı bir kemik rejenerasyonu oluşturduğu görülmüştür. Araştırmacılar bileşiklerin değişik oranlarda kullanılmasıyla, osteoindüktif potansiyelin arttığı kanısına varmışlardır<sup>238,239</sup>. **Bizim kullandığımız bifazik kalsiyum fosfat seramiğinin içeriği % 60 HA + % 40  $\beta$ - TCP'dir. HA'in rezorbsiyon hızını arttırmak için,  $\beta$ -TCP bileşiği ile kombine edilmiştir. Bu karışım ile HA'in daha erken rezorbe olarak, daha hızlı ve daha kaliteli bir kemik yapımının elde edilmesi hedeflenmiştir.**

**Rezorbsiyon hızı yeni oluşan kemik hızına ne kadar yakın olursa, kemikleşme ve bölgeye hücre göçü de o oranda başarılı olacaktır. Hem Farina'nın yaptığı çalışmada, hem de bizim yaptığımız çalışmada greft uyguladığımız gruplarda daha erken iyileşme başladığını görmekteyiz. Aynı zamanda 8. hafta kemik oluşum alanı değerlendirildiğinde, greft uyguladığımız gruplarda biyomateryal uygulanmayan gruplara oranla daha fazla kemik oluşum alanı gözlemledik.**

Gosain isimli araştırmacı ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışmada, 10 adet yetişkin koyunda fasiyal kontur ogmentasyonunda, otojen kalvarial kemik ile HA ve  $\beta$ -TCP/HA (40/60) karışımı kullanmışlardır. Sonuçta; otojen kemik greftinin 1 yıla yakın dönemde önemli oranda rezorbe olarak fasiyal

konturun bozulmasına yol açtığını, HA ve  $\beta$ -TCP seramiklerinin ise oldukça sınırlı düzeyde rezorbsiyon göstererek görevlerini tam anlamıyla yaptıklarını rapor etmişlerdir<sup>240</sup>.

Bucholz ve arkadaşları tarafından yapılan başka bir çalışmada ise, 40 olgu serisinde metafizial defektlerde HA ve kansellöz otogreft uygulanmış ve takiplerinde osteogenezis açısından radyolojik ve klinik bir farklılık saptanmadığı bildirilmiştir<sup>117</sup>.

Grimes ve arkadaşları 2 yıl boyunca kliniklerine başvuran benign tümör, düşük evreli kondrosarkomlar ve tümör benzeri lezyonu olan 30 hastaya, lezyonları çıkarıldıktan sonra defekt bölgesine bifazik kalsiyum fosfat ( $\beta$ -TCP/HA) içeriğini uygulamışlar ve 2 yıl boyunca hastaları takip etmişlerdir. Hastaların sadece 6'sında komplikasyon gözlendiğini, komplikasyonların greftle ilişkili olmadığını, 28 hastanın günlük aktivitelerine tam anlamıyla geri döndüklerini belirtmişlerdir. Aynı zamanda bifazik kalsiyum fosfatı, kemik grefti olarak tümör benzeri lezyonların eksizyonu sonrası uygulamasını otojen greft uygulamasına göre daha etkili bulduklarını belirten araştırmacılar, komplikasyon oranını da otojen greftlerin komplikasyonuna göre oldukça düşük bulmuşlardır<sup>241</sup>.

Xie ve arkadaşları ise, 1993-2002 yılları arasında  $\beta$ -TCP/HA ile spinal füzyon uyguladıkları 20 hastadan, yaklaşık 24 ay sonra biyopsi almışlardır. Radyografik ve histopatolojik değerlendirmeler sonucunda, tüm olgularda füzyonun başarı ile tamamlandığını,  $\beta$ -TCP/HA'in osteogenezis kapasitesini otogreft kadar etkili bulduklarını ve bu karışımın geç dönemde rezorbsiyona uğrayarak sağlam bir yapı oluşturduğunu rapor etmişlerdir<sup>242</sup>.

Bloemers ve arkadaşları travma sonucu oluşan kemik defektlerinde kalsiyum fosfat içerikli greftlerin kullanımını araştırdıkları çalışmalarında, bir çok greft materyalinin bu konuda denendiğini vurgularken, kalsiyum fosfatın yüksek biyouyumluluğu ve başarılı osteogenezisi ile tercih edilen en önemli greft grubu olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu tip greft kullanımının otogreft komplikasyonlarını tamamen ortadan kaldırdığını ve bu greft materyallerine büyüme faktörleri eklenmesi durumunda ise, daha başarılı bir osteogenezis sağlanabileceğini bildirmişlerdir<sup>243</sup>.

Daculsi ve arkadaşları HA ve  $\beta$ -TCP kombinasyonundan oluşan bifazik kalsiyum fosfatı, yaptıkları klinik ve deneysel çalışmalarda kullanmışlardır. Bu çalışmanın klinik aşamasında kemik içinde benign tümörü bulunan 4 hastada, tümörün çıkartılmasını takiben oluşan kaviteye bifazik kalsiyum fosfat yerleştirmişlerdir. Çalışmanın deneysel kısmında ise 7 köpek üzerinde 40 adet femoral defekt oluşturulup, bu defektlerin 4 tanesi kontrol grubu için boş bırakılırken, diğerleri greft materyalleri ile doldurulmuştur. Araştırmanın 6. ve 9. hafta histopatolojik incelemesinde, yeni kemik oluşumu ile birlikte iyi derecede vaskülarizasyon ve birçok osteosit gözlemlenirken; radyolojik incelemede ise, yeni kemik formasyonu izlenmiştir. Köpeklerden alınan kesitlerin değerlendirilmesinde de greft yerleştirilen defektlerde 6 hafta sonra implantın kortikal kısmında osteogenezis alanları saptanmış olup, beraberinde vasküler yapılar ve osteositler izlenmiştir. Kontrol amaçlı boş bırakılan defektlerde ise yeni kemik oluşumu 6. haftanın sonunda göze çarparken, 9 hafta sonunda defektin sadece bir kısmının kemik ile dolduğu belirtilmiştir<sup>118</sup>.

**Biz de çalışmamızda ratlarda cerrahi olarak oluşturduğumuz kalvarial defektlerde osteogenezis açısından başarılı olduğu bildirilen bifazik kalsiyum fosfat seramiklerini kullanmayı uygun gördük. Kontrol grubunda oluşturduğumuz cerrahi kritik boyut kemik defektinin, 12. haftada alınan histolojik kesitlerinde kısmi olarak yeni kemikle dolarken; greft uyguladığımız gruplarda 12. haftada kemik oluşumunun tüm defekt alanını yeterli ölçüde doldurduğunu gözlemledik. Bu sonuçlarımızın Daculsi ve arkadaşları (1990), Farina ve arkadaşları (2007), Gosain ve arkadaşları (2005), Bucholz ve arkadaşları (1989), Xie ve arkadaşlarının (2006) elde etmeleri sonuçlarla uyumlu olduğu görülmüştür.**

Son zamanlarda yapılan çalışmalar, kemik defektlerinde kullanılmak üzere hazırlanan sentetik greft materyallerinin ya kendileri içinde ya da otojen greft veya büyüme faktörleri ile kombinasyonunun kullanılmasını önermektedir. Bu kombinasyonların amacı, greft materyallerinin tek başına kullanıldıklarında ortaya çıkan dezavantajlarının, kombinasyonda kullanılan

diğer greft materyali tarafından tolere edilip ideal grefte ulaşılmasıdır. Bone Morfojenik Proteinlerin (BMP) uygun bir taşıyıcı ile implante edildiklerinde; diferansiye olmayan mezenkimal hücrelerin kemotaksis ile aktive edilerek göçlerine ve osteoblastlara dönüşmelerine, kemik matriksinin depolanmasına, yeni depo edilen kemik matriksinin mineralizasyonuna ve kemik iliği diferansiyasyonuna neden oldukları gösterilmiştir<sup>244</sup>.

Oral ve maksillofasiyal cerrahide araştırmacılar, sürekli olarak kemik greftleme tekniklerini geliştirmek, daha hızlı ve daha yoğun kemik rejenerasyonu elde edecek bir yöntem geliştirmek için çalışmaktadırlar. TZP, yara iyileşmesini ve rejenerasyonu arttırmak için baş boyun cerrahisi, oral ve maksillofasiyal cerrahi, plastik cerrahi ve kardiyovasküler cerrahi gibi pek çok cerrahi alanda kullanılmaktadır<sup>245</sup>.

Marx ve arkadaşlarının, benign ve/veya malign lezyon eksizyonu yapılmış fakat radyoterapi uygulanmamış 5 cm. ve daha büyük mandibula defektine sahip 88 hasta üzerinde yaptıkları araştırmada, 44 defektin tedavisinde posterior iliak bölgeden alınan otojen kemik grefti TZP ile beraber kullanılırken, diğer 44 hasta sadece otojen kemik grefti kullanılarak kontrol grubu olarak belirlenmiştir<sup>246</sup>. Radyografik sonuçlar incelendiğinde TZP kullanılan bölgelerde kemik maturasyonunun, TZP kullanılmayan bölgelere oranla 1.62 den 2.16' ya kadar değişen oranlarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalarda yapılan histomorfometrik ölçümlerde, TZP eklenen bölgelerde kemik yoğunluğu ortalama %74 iken, TZP eklenmeyen bölgelerde bu oran %55.1 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre, TZP eklenmesi kemik formasyon oranını ve kemik grefti içinde kemik oluşumunun derecesini en azından ilk 6 ay boyunca hızlandırmaktadır<sup>246</sup>.

Oyama ve arkadaşlarının, alveoler kemik greftleme prosedüründe otolog iliak kansellöz kemik ile TZP karışımının kemik rejenerasyonu üzerine etkisinin değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları araştırmada, daimi dentisyona sahip 7 alveoler kleft hastasını çalışmaya dahil etmişlerdir. Rejenere kemik miktarının değerlendirilmesi 3 boyutlu bilgisayarlı tomografi kullanılarak yapılmış ve kontrol grubu ile karşılaştırılmıştır. Alveoler kleft hastalarında ortalama rejenere kemik hacmi, TZP kullanılanlarda TZP kullanılmayanlara

oranla istatistiksel olarak daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar, yarık damak ve dudak hastalarında TZP'nin osteogenezisi arttırdığını ve ortodontik tedaviden sonra alveoler kemik greftlemesi prosedüründe kullanılabilirlik güvenilir, kolay ve ucuz bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir<sup>247</sup>.

Butterfield ve arkadaşları, sinüs augmentasyonu sırasında otojen kemik remodelasyonu üzerinde TZP'nin etkisini değerlendirmek amacıyla tavşanlar üzerinde bir çalışma yapmışlardır. Ağırlıkları 3-3.5 kg. arasındaki Yeni Zelanda tavşanlarından genel anestezi altında sağ iliak krestten alınan otojen kemik grefti ile bilateral sinüs augmentasyonu yapılmıştır. Tavşanlardan alınan otolog kandan santrifüj yoluyla elde edilen TZP topikal bovin trombin ve kalsiyum klorit ile karıştırılmış, elde edilen jelde otojen kemik grefti ile karıştırılarak sinüs augmentasyonu için kullanılmıştır. Kontrol tarafına ise sadece otojen kemik grefti uygulanmıştır. Hayvanlar 2., 4., 8. haftalarda sakrifiye edilmiş ve tüm örnekler peripheral quantitative computed tomography (pQ-CT), statik ve dinamik histomorfometrik analiz ile incelenmiştir. PQ-CT, statik ve dinamik histolojik kriterler kullanılarak yapılan karşılaştırma sonucunda TZP'nin, maksiller sinüs augmentasyonunda kemik grefti iyileşmesi üzerinde istatistiksel olarak anlamlı bir etkisi olmadığı sonucuna varılmıştır<sup>248</sup>.

Fennis ve arkadaşları, bir mandibular rekonstrüksiyon metodunu değerlendirmek amacıyla yaptıkları deneysel hayvan çalışmasında, 28 keçiye angulus rezeksiyonu uygulamışlardır. İlk rekonstrüksiyon özel olarak dizayn edilmiş osteosentez plak ve vidaları kullanılarak yapılmıştır. Rezeke edilen kortikal parça çıkarılmış ve üzerine rond frez kullanılarak delikler açılmıştır. Defekt rekonstrüksiyonu orijinal kortikal yapı iskeleti kullanılarak yapılmış ve boşluklar iliak krestten alınan otojen kortikokansellöz kemik grefti ile doldurulmuştur. Kemik iyileşmesini hızlandırmak için 14 hayvanda partikül kemik greftleri TZP ile karıştırılarak uygulanmıştır. Osteosentez plak ve vidaları, 3 haftadan 3 aya kadar değişen periyotta immedat yüklemeye dayanmış ve herhangi bir komplikasyon ile karşılaşmamıştır. Denekler sırasıyla 3., 6. ve 12. haftalarda sakrifiye edilmiştir. Bağımsız 2 gözlemci skorlama yöntemiyle, hangi hayvanın TZP ile tedavi edildiğini bilmeden klinik

ve radyolojik değerlendirme yapmışlardır. Skorlama parametreleri, anterior ve posterior osteotomi bölgesindeki kemik boşlukları, frez ile hazırlanan perforasyonlar, anterior ve posterior osteotomi bölgesindeki kallus oluşumu, santral rezorbsiyon (internal rezorbsiyon) ve angular rezorbsiyon (eksternal rezorbsiyon) değişkenlerini içermiştir. Yapılan klinik ve radyografik değerlendirme sonucunda, TZP ile tedavi edilen grupta kemik iyileşmesinin önemli ölçüde daha hızlı olduğu sonucuna varılmıştır<sup>249</sup>.

Robiony ve arkadaşları, şiddetli atrofik mandibulası olan hastaların tedavisi için yeni bir metodu değerlendirmek amacıyla distraksiyon osteogenezisi sırasında TZP kullanmışlardır. Şiddetli atrofik mandibulası olan ve total dişsiz 2'si erkek toplam 5 hasta yeni bir distraksiyon prosedürü ile tedavi edilmiştir. Cerrahi sırasında, iliak kemikten alınan otojen kemik grefti TZP'den elde edilen otolog platelet konsantrasyonu ile karıştırılarak distraksiyon boşlukları doldurulmuştur. Otolog kemik ve TZP'den oluşan bu karışım, distraksiyon rejenerasyonu için kullanışlı bir yapı iskeleti yaratmıştır. Latent periyot için 15 gün beklendikten sonra, distraksiyon hızı günde 0.5 mm. olacak şekilde ayarlanmıştır. Konsolidasyon periyodu için 60 gün beklendikten sonra distraktörler çıkarılmış ve aynı seansta implantlar yerleştirilmiştir. Tedavi edilen tüm hastalarda, planlanan distraksiyon yüksekliği kemik rejenerasyonundaki önemli artış ile başarılmış ve bütün hastalara planlanan zamanda implant yerleştirilmesi mümkün olmuştur. Araştırmacılar, bu yeni kombinasyonun şiddetli atrofik mandibulaların restorasyonunda mükemmel çözüm sunan bir yöntem olacağını düşündüğünü bildirmişlerdir<sup>250</sup>.

Aghaloo ve arkadaşları, kemik iyileşmesi üzerinde TZP'nin etkisini değerlendirmek amacıyla 15 tavşanda randomize, kör ve prospektif bir çalışma planlamışlardır. Kiloları 2, 4 ve 8 kg. arasında değişen 15 adet erkek Yeni Zelanda tavşanında 8 mm'lik 4 kafatası defekti hazırlamışlardır. Hazırlanan 3 defekte otojen kemik, yalnız TZP ve otojen kemik ile TZP uygulanmış, bir defekt ise kontrol için boş bırakılmıştır. Defektler 1., 2. ve 4. aylarda histomorfometrik, histolojik ve step-wedge kalibrasyon ile dijital subtraksiyon radyografi analizi ile değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, boş



bırakılan ve yalnız TZP uygulanan defektlerle karşılaştırıldığında, otojen kemik ve TZP eklenmiş otojen kemik örneklerinde radyografik kemik dansitesi ve histomorfometrik kemik alanında anlamlı artış olduğu görülmüş, ancak otojen kemiğe TZP eklenmesinin anlamlı bir fark yarattığı gösterilememiştir. Aynı şekilde kontrol defekti ve yalnız TZP uygulanan defektler arasında da anlamlı bir farka rastlanmamıştır<sup>251</sup>.

Jaksen ve arkadaşları koyunlarda maksiller sinüs duvarı augmentasyonu yapmışlar, otojen kemik+TZP ve sadece otojen kemiği karşılaştırmışlar, sonuçta TZP'nin rejeneratif kapasitesinin düşük olduğunu belirtmişlerdir<sup>252</sup>.

Fürst ve arkadaşları da ratlarda kortikal mandibuler defektlerin kemik rejenerasyonunda plateletlerden salınan büyüme faktörlerinin etkisi üzerine yaptıkları çalışmada anlamlı bir fark bulamamışlardır<sup>253</sup>.

Belli ve arkadaşları, yayınladıkları olgu raporunda geniş mandibular kistik lezyonun tedavisinde lezyonun eksizyonunu takiben sığırdan elde edilmiş granül formunda hidroksilapatit ve TZP karışımını kullanmışlardır. Araştırmacılar, hastalardan 4 ay sonra alınan radyografide kemik içi defekt bölgesinde yüksek oranda remineralizasyon izlediklerini ve operasyondan sonra herhangi bir komplikasyon ile karşılaşmadıklarını bildirmişlerdir<sup>254</sup>.

Kassolis ve arkadaşlarının, sinüs elevasyonu ve/veya alveoler kret augmentasyonu için dondurulmuş-kurutulmuş kemik allogreftleri (DKKA) ve TZP kombinasyonu ile tedavi edilen 15 hastanın klinik ve radyolojik sonuçlarını sundukları olgu serisinde, DKKA ve TZP (0.5g./2cc.) karıştırılarak kompozit greft materyali olarak yerleştirilmiştir. Jel formu, otolog trombin zengin plazma ve TZP (1:4 oranında) karıştırılarak elde edilmiştir. Biyopsi örnekleri, implant uygulaması sırasında implant yuvası hazırlanırken alınmış ve histolojik olarak incelenmiştir. Yerleştirilen 36 implanttan 32'si başarılı bir şekilde iyileşirken, 4'ü mobilite nedeniyle çıkartılmak zorunda kalmıştır. Araştırmacılar, klinik ve histolojik sonuçlara dayanarak sinüs yükseltilmesi ve kret augmentasyonunda DKKA ve TZP karışımının implant yerleştirilmesinden önce kullanılabilir alternatif bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir<sup>255</sup>.

Camargo ve arkadaşlarının, periodontal cerrahide kemik içi defektler için 2 farklı rejeneratif tekniğin etkinliğini klinik olarak karşılaştırmak amacıyla yaptıkları çalışmaya, 18 hasta katılmıştır. İnterproksimal kemik defektlerinde, TZP ve poröz kemik allogrefti (BPKA) birlikte kullanılmış veya absorbe olabilen polilaktik asit membranı, bovin poröz kemik allogrefti (BPKA) ve TZP kombinasyonu uygulanmıştır. Her iki tedavi yöntemi başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında, önemli miktarda cep derinliğinde azalma ve klinik ataşman kazancı elde edilmiştir. Ancak iki grup arasındaki bütün değişkenler, istatistiksel olarak anlamlı derecede TZP+BPKA+YDR grubunun lehine bulunmuştur<sup>189</sup>.

Aghaloo ve arkadaşlarının, dondurulmuş-kurutulmuş kemik grefti ile TZP kombinasyonunun etkisini değerlendirmek amacıyla yaptıkları başka bir çalışmada, 15 adet Yeni Zelanda tavşanında 8mm'lik 4 adet kranial defekti oluşturmuşlardır. Hazırlanan defektlere randomize, kör ve prospektif olarak dondurulmuş-kurutulmuş mineralize kemik (DKMK), DKMK+TZP, dondurulmuş-kurutulmuş demineralize kemik (DKDK) ve DKDK+TZP uygulanmış olup, 1., 2. ve 4. aylarda histomorfometrik ve radyografik olarak değerlendirme yapılmıştır. Radyografik olarak, DKMK ve DKDK greftlerine TZP eklenmesinin kemik yoğunluğunda artışa neden olduğu, ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varmışlardır. Histomorfometrik olarak da, DKMK'e TZP eklenmesinin kemik alanlarında 1. ve 4. aylarda, DKDK'e TZP eklenmesinin ise 1. ve 2. aylarda artışa neden olduğu, ancak bu sonuçlarında istatistiksel olarak anlamlı olmadığı sonucuna varmışlardır<sup>251</sup>.

Zechner ve arkadaşları, mini pigler üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada dental implantlardaki kemik iyileşmesi üzerinde TZP'nin etkisini değerlendirmişlerdir. Yetişkin 12 adet mini pigde mandibular premolar dişler cerrahi olarak çekilmiş ve implant yerleştirilmeden önce otojen TZP sol bölgedeki çekim soketlerine aşılanmıştır. Sağ bölgedeki soketler ise kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Denekler 3., 6. ve 12. haftalarda sakrifiye edilmiş ve örnekler histomorfometrik olarak incelenmiştir. Yapılan histomorfometrik değerlendirmede, erken iyileşme döneminde (6.hafta) topikal TZP uygulanan bölgelerde kemik-implant kontağının önemli oranda arttığı gösterilmiştir. 12.

haftada ise 2 grup arasında anlamlı bir farka rastlanmamıştır. Araştırmacı ve arkadaşları, topikal TZP uygulamasının erken iyileşme periyodunda implant bölgesindeki kemik rejenerasyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir<sup>256</sup>.

Anitua ve arkadaşlarının, implant uygulanacak bölgelerin hazırlanması üzerine yaptıkları bir araştırmada, 20 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. İmplant öncesinde çekim yapılan hastalarda çekim boşluklarının bir kısmı TZP ile tedavi edilirken, bir kısmı kontrol grubu olarak spontan iyileşmeye bırakılmıştır. TZP eklenen grup, kontrol grubuyla kıyaslandığında bukko-lingual kemik genişliğinde ve kemik yoğunluğunda artış izlenirken, aynı zamanda yumuşak doku iyileşme sürecinde de kılma meydana geldiği görülmüştür. Araştırmacılar implant yerleştirilecek alanların hazırlanmasında TZP kullanımının, yumuşak doku iyileşmesini hızlandırma ve kemik rejenerasyonunu artırma gibi avantajlar sağladığını bildirmişlerdir<sup>257</sup>.

Man ve arkadaşları, 20 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada, otolog fibrin yapıştırıcı ve platelet jel kullanımının kozmetik cerrahi prosedürlerde (face lift, mamoplasti, abdominoplasti gibi) pek çok avantajının olduğunu göstermişlerdir. Bu avantajlar; operasyon süresinin kılması, dren ihtiyacının eliminasyonu, baskılı bandaj ihtiyacının ve iyileşme süresinin azalması, operasyon sonrası şişlik ve ağrıda düşüş ile yara iyileşmesinde artış olarak bildirilmiştir<sup>15</sup>.

Valle ve arkadaşlarının, oral antikoagülan terapisi gören hastalarda, diş çekiminden sonra kanamanın kontrolünde TZP etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla yaptıkları çalışmalarında, mekanik kalp kapağı replasmanı yapılmış ve oral antikoagülan kullanan 40 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Araştırmacılar, varfarin kullanmaya devam eden hastalarda INR (International Normalized Ratio) değeri normal sınırlarda tutulduğu sürece TZP kullanımının güvenli ve gelişmiş bir prosedür olduğunu, TZP'nin kanama ve tromboemboli riskini engellediğini belirtmişlerdir<sup>258</sup>.

Sammartino ve arkadaşları, 20 yaş dişlerinin çekiminden sonra periodontal dokular üzerinde otolog TZP'nin etkisi üzerine bir çalışma yapmışlar, mandibular 2.molar dişin distalinde 7.5 mm ve daha fazla cep derinliği olan ve ataşman seviyesi 6 mm ve üstü olan hastaları çalışmaya

dahil etmişlerdir. Sağlıklı 18 genç hastada yaptıkları çalışmada cerrahiden 12 hafta sonra klinik olarak inceleme yapılmış, kemik defekti içerisinde yeni kemik oluşumunda ve ataşman seviyesinde artış, cep derinliğinde dikkate değer bir azalma olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar, TZP'nin derin gömülü mezioanguler 3. molar dişlerin cerrahi çekiminden sonra mandibuler 2. molar dişin distal kökünde oluşabilecek periodontal defektlerin tedavisinde, kemik rejenerasyonunu sağlamada ve hızlandırmada etkili olduğu sonucuna varmışlardır<sup>259</sup>.

TZP'nin kemik rejenerasyonu için kullanımı ile ilgili literatürde pek çok çalışma bulunmaktadır. Hanna ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, TZP'nin poröz hidroksilapatit kemik grefti ve sığır kaynaklı ksenogreft ile birlikte kullanılmasının klinik parametreleri arttırdığını göstermişlerdir<sup>260</sup>.

Camargo ve arkadaşları yaptıkları klinik çalışmada, kemik greftlerine TZP'nin olumlu klinik etkisi iki nedene bağlı olabilir sonucuna varmışlardır. Birincisi otojen fibrin jel kullanımı greft partiküllerinin yapışmasını artırır, saçılma riskini azaltır. İkincisi; TZP çevre yumuşak dokular üzerinde güçlü mitojenik etkiye sahip olması nedeniyle yara iyileşmesini hızlandırarak operasyon bölgesinin açılmasını ve infeksiyonunu engellemektedir. Araştırmacılar aynı zamanda, TZP'nin poröz sığır kemik grefti ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) ile birlikte kullanılmasının sadece YDR uygulamasına göre, periodontal ataşman kazancını arttırdığını da bildirmişlerdir<sup>189</sup>.

Bu çalışmalardan farklı olarak; Arpornmaeklong ve arkadaşları tarafından ratların kemik iliği stromal hücrelerinin osteojenik farklılaşması üzerine TZP'nin etkilerinin in vitro ortamda incelendiği çalışmalarında, doza bağlı olarak TZP'nin ilik kaynaklı preosteoblastların osteojenik farklılaşmasını engellediği ve dolayısıyla osteoindüktif bir ajan olmadığını rapor etmişlerdir<sup>261</sup>.

Döri ve arkadaşları yaptıkları klinik çalışmalarda TZP'nin sığır kaynaklı ksenogreftler ve rezorbe olan membran kullanılan YDR'nda, sığır kaynaklı ksenogreft+mine matriks derivesi+trombosit kaynaklı büyüme faktörü (TKBF)+rezorbe olmayan membran kullanılan YDR kombinasyonlarına ilave

bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir<sup>262</sup>. Yapılan diğer klinik çalışmalarda da aynı yönde sonuçlar bildirilmiştir<sup>262,263</sup>.

Jensen ve arkadaşları yaptıkları çalışmaya göre çelişkili literatür sonuçlarına neden olan en önemli faktörlerin; TZP izolasyonunda kullanılan değişik yollar, trombosit fragmentasyonu ve büyüme faktörlerinin etkinliğini etkileyebilecek spesifik bir antikoagülan kullanılmasının olabileceğini bildirmişlerdir<sup>264</sup>.

Choi ve arkadaşları köpeklerde yaptıkları deneysel bir çalışmada, otojen kemik greftlerine eklenen TZP'nin kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisinin histolojik olarak incelenmesi sonucunda, otojen greftlere TZP eklenmesinin kemik rejenerasyonunun miktar ve kalitesini kötü yönde etkilediğini bildirmişlerdir<sup>265</sup>.

**Bizim çalışmamızda bunun aksine, kemik grefti+TZP ve sadece kemik grefti uygulamaları arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadığı saptandı. Yaptığımız çalışmada osteosit yoğunluğu açısından yapılan değerlendirmede ise, kontrol grubuna kıyasla 2. ve 8. haftada greft ve greft+TZP grubu arasında fark gözlemlenmemiş olup, 12. haftada greft+TZP grubu osteosit yoğunluğu açısından sadece greft uygulanan gruba göre istatistiksel olarak daha anlamlı bir sonuç vermiştir.**

Çetin yaptığı tez çalışmasında; greft, TZP ve YDR'nin osteogenezis üzerine etkilerini deneysel olarak incelenmiştir. Ratların femurunda oluşturduğu kemik kavitelerinin 1. grubu kontrol amaçlı boş bırakılırken, 2. grubuna Tip-I kollajen membran uygulanmış, 3. grubuna Tip-I kollajen membran ve hidroksilapatit grefti birlikte implante edilmiş ve son gruba ise Tip-I kollajen membran+hidroksilapatit+TZP birlikte yerleştirilerek defektler rekonstrükte edilmiştir. Postoperatif 10., 21., 45. ve 90. günlerde ratlar sakrifiye edilerek, femurları histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. Kesitler incelenerek elde edilen osteogenezis değerleri ile doku rejenerasyonu ve kullanılan materyallerin kemik defektindeki yabancı doku reaksiyonu, enfeksiyon, fibröz enkapsülasyon, fiziksel ataçman ve biokompatibilite yönleriyle kıyaslamaları, Mann-Whitney-U testi ile istatistiksel olarak analiz

edilmiştir. Sonuçta, kullanılan greft materyallerinin benzer düzeyde enflamasyona ve fibrotik yanıtı neden olduğu, doku ile uyumluluklarının (biyokompatibilite) mükemmel olduğu ve yabancı doku reaksiyonuna neden olmadıkları saptanmıştır. Kemik üzerine olan etkileri incelendiğinde ise, tüm gruplarda 21. günden sonra osteogenezis görülürken, membran uygulamasının fibrotik iyileşmeye engel olarak daha ideal bir osteogenezisi gerçekleştirdiği, ancak kombinasyona TZP ilave edilmesinin, oluşan yeni kemiğin kalitesi ve kantitesi açısından anlamlı derecede bir farklılık gösterdiği, içerdiği büyüme faktörleri nedeniyle iyileşmenin daha hızlı olduğu ve defekt tabanında osteoblastik aktivitenin daha erken süreçte başladığı rapor edilmiştir<sup>266</sup>.

Yamada ve ark. tarafından köpeklerde yapılan bir çalışmada, dental implant yerleştirmeden önce kemik rejenerasyonu amacıyla MKH+TZP, TZP, kansellöz kemik ve kemik iliği uygulanan ve kontrol amacıyla boş bırakılan bölgelerde implant operasyonunu takiben 2. ayda osseointegrasyonun değerlendirilmesi yapılmıştır<sup>267</sup>. 8. haftada yapılan histolojik incelemede TZP-MKH karışımının partiküler kansellöz kemik ve kemik iliği kadar olgun, yapısal olarak uygun bir kemik rejenerasyonu sağladığı gözlenmiştir. Ayrıca, defektin tek başına TZP ile doldurulmasının osteogenezisin gerçekleşmesini sağlamadığı da görülmüştür. Bu yüzden farklı araştırmacılar defekt içerisinde TZP'nin kemik iyileşmesini ilerletmediğini düşünmüşlerdir<sup>268</sup>. **Bizim çalışmamızda, bu çalışmalardan farklı olarak kansellöz kemik grefti yerine kansellöz kemiğe oranla fazla kemik matriksi dolayısıyla daha çok indüktif komponent içeren, kemik morfojenik protein (KMP) konsantrasyonu daha fazla olan bifazik kalsiyum fosfat kemik grefti kullanılmıştır.**

Son yıllarda doku mühendisliği yönteminin geliştirdiği kök hücreler ile ilgili, uygun bir yapı iskelesi ve büyüme faktörleriyle birlikte kullanıldığı maksillofasial bölge dokularının rejenerasyonu için yeni yöntemler araştırılmaya başlanmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir<sup>269-272</sup>.

Kök hücreler gelişimsel olarak embriyonik kök hücre veya post-natal kök hücre (organa spesifik, dokuya spesifik veya erişkin kök hücre de denir)

olarak ikiye ayrılırlar<sup>273</sup>. Embriyonik kök hücreler (EKH'ler) gelişmekte olan blastosistin iç kitlesinden köken alırlar ve vücuttaki tüm hücre çeşitlerine (endoderm, mezoderm ve ektoderm) dönüşebildikleri için 'pluripotent hücre' olarak kabul edilirler. Embriyonik kök hücreler özelleşmiş doku ve organlardan elde edilirler, tüm bir doku veya dokuları oluşturan çeşitli hücre türlerine dönüşebildikleri için 'multipotent' olarak kabul edilirler<sup>274</sup>.

EKH'ler pek çok dokunun tamiri veya rejenerasyonu için önemli hücre kaynakları olsalar da; etik sorunlar, kontrol edilemeyen farklılaşmaları ve verici-alıcı arasındaki immünite problemleri yüzünden klinik kullanımları sınırlıdır. Ayrıca in vivo ortamda kullanıldığında gelişebilecek kromozomal değişkenlik ve tümörleşme olasılıklarını elimine edebilmek için uzun dönem klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Rosenthal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, EKH'lerin farelere enjekte edildiğinde teratom oluşturabildiklerini göstermişlerdir. In vitro ortamda daha yavaş büyüme oranları ve daha az telomeraz aktivitelerinin olmasına bağlı olarak, mezenkimal kök hücrelerin EKH'lere göre tümör oluşumu açısından nispeten daha az risk taşıdığı düşünülmektedir<sup>275</sup>.

Embriyonik kök hücreler; kemik iliği, sinir dokusu, kas, deri, barsak, karaciğer, dental pulpa, periodontal ligament, alveolar kemik ve çekilmiş daimi dişler gibi pek çok organ ve dokudan elde edilmiştir<sup>276-286</sup>. Bu kanıtlar, tedavi uygulamaları için MKH'lerin birçok organdan elde edilebileceğini göstermektedir. Bununla birlikte organ veya dokuya özgü nitelikler, kök hücre davranışını etkileyebileceği için, tedavi amaçlı kök hücre kaynağının seçiminde dikkatli olmak gerektiği çalışmalarda rapor edilmiştir<sup>286-289</sup>.

Akintoye ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda, kraniyofasiyal ve uzun kemiklerden elde edilen kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin (KİMKH'lerin), proliferasyon ve farklılaşma açısından birbirlerinden farklı olduklarını bildirmişlerdir. Kraniyofasiyal kemiklerden elde edilen KİMKH'lerin, uzun kemiklerden alınan hücreler gibi organize bir hematopoetik ilik organı oluşumunu destekleyemediği rapor edilmiştir<sup>286</sup>.

Rubio ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda erişkin insan yağ dokusundan elde edilen MKH'lerinin, uzun dönem kültürde bulunmaları

sonucu spontan transformasyona uğradığını ve osteosarkom geliştiğini bildirmişlerdir<sup>290</sup>.

Bunun aksine, Miura ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada, kemirgen KİMKH'si ve insan yağ dokusu kaynaklı MKH'lerinin spontan transformasyonunu indükleyen kültür ortamında, insan KİMKH'leriyle yapılan değerlendirmelerde herhangi bir transformasyon potansiyeli gözlemediklerini rapor etmişlerdir<sup>291</sup>.

Mulder ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre, bugüne kadar hematopoetik hastalıkların, kanserin ve *graft versus host* hastalığının başarılı ve rutin tedavisi için kök hücre sağlayan tek sistemin, kemik iliği olduğu vurgulanmıştır<sup>292</sup>.

**Bugüne kadar, KİMKH'lerin herhangi bir primer kansere neden olduğu ya da ciddi yan etkilerle ilişkili olduğuna dair bir kanıt yoktur. Tüm bu sebeplerle çalışmamızda, hücre esaslı tedavilerden ideal sonuçlar elde edilebilmesi için, en elverişli verici bölge olan kemik iliği kaynaklı MKH popülasyonları kullanılmıştır.**

Mezenkimal kök hücreler ve mezenkimal kök hücre kaynaklı osteojenik, kondrojenik ve adipojenik hücrelerin hepsinin nonimmünojenik oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir<sup>293</sup>. Allojenik olarak transplante edilen mezenkimal kök hücrelere karşı donörün alloreaktif lenfositlerinde herhangi bir artış saptanmamıştır<sup>26,294</sup>. Bu fenomenin altında yatan mekanizma henüz tam olarak anlaşılamamıştır. **Her denekten kök hücre üretilmesinin zorluğu ve mezenkimal kök hücreler ile osteoblasta kadar farklılaştırılmış kök hücrelerin nonimmünojenik olmaları nedeni ile biz çalışmamızda allojenik kök hücre kullanmanın uygun olduğu planlanmıştır.**

Hücre uygulamaları için günümüzde iki yöntem sıklıkla kullanılmaktadır. Birincisi intravenöz injeksiyonlar (hücrelerin direkt uygulanması), ikincisi hücre enkapsülasyon sistemleridir (bir taşıyıcı yardımıyla hücrenin indirekt uygulanması)<sup>295</sup>.

Liechty ve arkadaşları yaptıkları çalışmada; KİMKH'lerin sistemik injeksiyondan sonra birçok organda bölgeye özgü olarak farklılaştığı,



yapısına girdiği ve yaralanmış bölgeye göç ettikleri gösterilmiştir<sup>296</sup>. Hücre enkapsülasyon yaklaşımında ise, vücuda yerleştirildikten sonra enzimatik veya hidrolik yıkımla rezorbe olan biyouyumlu bir yapı iskelesi, rejenerasyon amacıyla hücrelerle birlikte defekt içine uygulanmaktadır<sup>297</sup>.

Kranial defekt bölgelerine ulaşmak kolay olduğu için KİMKH'lerin bu bölgeye lokal transplantasyonu, pratik bir yöntemdir. Ayrıca, KİMKH'lerin istenen bölgeye sistemik injeksiyon yoluyla uygulanmasının etkinliği belirsiz ve sınırlıdır. **Buna bağlı olarak çalışmamızda, MKH'lerin yapı iskelesi yardımıyla defekt içerisine lokal transplantasyonu yöntemi tercih edilmiştir.**

Doku rejenerasyonunun gerçekleşebilmesi için kullanılacak olan MKH'lerin hücre yoğunluğu da önemli bir faktördür. MKH uygulamasından sonra hücrelerin canlılıklarını koruyabilmeleri ve osteoblastik hücrelere farklılaşabilmeleri için yeterli doku sıvısı ve kan desteği sağlanmalıdır<sup>271</sup>. Yüksek miktarda hücre yoğunluğu daha derin bölgelerdeki hücrelere vaskülarizasyonu ve sıvı infiltrasyonunu engelleyebilir.  $2 \times 10^6$ - $2 \times 10^7$  hücre/ml arasında MKH konsantrasyonları kullanılan çalışmalarda, kemik dahil değişik defektlerde etkili doku rejenerasyonunun gerçekleştiği bildirilmiştir<sup>298-300</sup>. **Çalışmamızda da bu değerler arasında bulunan,  $2 \times 10^7$  hücre/ml yoğunluğundaki mezenkimal kök hücreler kullanılmıştır.**

Kotobuki ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmaya göre; doku mühendisliği yöntemleriyle yeni organlar elde edebilmenin, mekanik dayanıklılık ve üç boyutlu yapı sağlayan uygun yapı iskeleleri olmadan sadece hücre kullanımıyla mümkün olmadığı bildirilmiştir<sup>301</sup>. Bu yüzden in vivo olarak doku rejenerasyonu ve kök hücre tamirini arttıracak, dokuya özgü yapı iskeleleri geliştirmenin gerekli olduğunu rapor etmişlerdir.

**MKH'lerle ilgili olarak yapılan sınırlı sayıdaki çalışmaların sonuçlarına göre, MKH'lerin kemik rejenerasyonu üzerine olumlu etkisi olduğu ifade edilebilir. Ancak "MKH'lerin in vivo ortamda tümörleşebilme olasılığının varlığı gözardı edilmemeli ve hangi potansiyel mekanizmalarla tümör hücrelerine dönüşebilecekleri konusu araştırılmalıdır" düşüncesindeyiz.**

Teorik olarak çok şey vaat eden TZP; Smart PReP (Harvest Technologies, Norwell MA), Plasma Seal (Plasma Seal, San Francisco, CA), Platelet Concentrator (Implant Innovations, Inc. 3i, West Palm Beach, FL) gibi ticari firmaların geliştirdiği cihazlar sayesinde daha kolay ve ucuz elde edilebilir hale gelmiştir. Bu hızlı gelişme, beklentinin yüksek olması, uygulamanın kolaylığı, otolog hazırlanabilmesi ve otolog olmayan kan ürünlerinin yan etkilerini taşınamaması nedenleriyle ürünün klinik uygulamalara hızla girmesini sağlamıştır.

Son yıllarda rekombinant teknolojinin gelişmesi, bu yolla elde edilen büyüme faktörlerinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin daha iyi ortaya konulmasına yardımcı olmuştur. Çalışmalar en çok TGF ailesinden olan BMP' ler üzerine yoğunlaşmış olmakla birlikte, TGF- $\beta$ , PDGF, FGF, VEGF ve IGF kemik iyileşmesinde etkisi ortaya konulan diğer büyüme faktörleridir. Bunların deneysel çalışmalarla kemik iyileşme üzerine etkinliği gösterilmiş, bazıları sınırlı da olsa klinikte kullanılmış olmalarına rağmen, rutin klinik kullanıma girmeleri zor görünmektedir. Bunun en önemli nedeni ise, rekombinant teknolojinin pahalı olmasıdır<sup>9,10,11</sup>.

Sert doku rejenerasyonu amaçlayan kök hücre uygulamalarında yapı iskelesi olarak biyoaktif HA,  $\beta$ -TKF ( $\beta$ -trikalsiyum fosfat) seramikler, cam seramikler ve alüminyum seramikleri de içeren bir dizi seramikler, kalsiyum karbonat ve polilaktik asit gibi polimerler kullanılmıştır; çünkü bu materyaller yapay kıkırdak veya kemik üretimi için yeterli biyouyumluluğa ve yıkılabilirliğe sahiptir<sup>302-305</sup>. Ancak porlarının olmaması, seramiğin yavaş rezorpsiyonu ve osteoindüktif özelliklerinin olmaması yüzünden yeni kemiğin defekt içine invaze olmasını güçleştirirler<sup>267,306</sup>. Bu nedenle, "kemik defektlerinde otojen kemik oluşumunu sağlayacak jel benzeri kıvama sahip bir materyal uygulanması daha uygun olabilir" düşüncesiyle son yıllarda, kemik defektlerinin doku mühendisliği yöntemleriyle rejeneratif tedavisini araştıran çalışmalarda, kök hücrelerle birlikte yapı iskelesi olarak TZP kullanılmaya başlanmıştır<sup>267</sup>. Bu çalışmalarda; MKH'lerle birlikte uygulanan TZP'nin, MKH'lerin adezyonunu, proliferasyonunu ve kemik oluşturmak üzere farklılaşmasını destekleyebileceği belirtilmiştir. KİMKH'nin TZP içerisindeki

büyüme faktörleri için reseptörler taşıdığı ve *in vitro* çalışmalarda %10 TZP eklenmesinin KİMKH'lerin proliferasyonunu belirgin ölçüde arttırmaya yettiği gösterilmiştir<sup>307</sup>. **Bu bulgular göz önünde bulundurularak, çalışmamızda yapı iskelesi olarak TZP kullanılmıştır.**

Pieri ve arkadaşları, minipigler üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada mandibulada kemik defekt; oluşturmuşlar ve bu defektlere Mezenkimal kök hücre+florhidroksilapatit+TZP kombinasyonu, TZP+florhidroksilapatit, otojen kemik grefti ve sadece Florhidroksilapatit implante etmişlerdir. 3 ay sonunda yapılan histolojik ve histomorfometrik incelemede, en iyi iyileşme kalitesi sırasıyla otojen kemik greftinde, sonrasında Mezenkimal kök hücre+florhidroksilapatit+TZP kombinasyonunda, TZP+florhidroksilapatitte ve son olarakta yalnızca florhidroksilapatit uygulanan grupta gözlemlediklerini rapor etmişlerdir<sup>308</sup>.

Khojasteh ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada oluşturdukları kritik boyut kranial kemik defektlerine demineralize kemik matriksi+TZP, demineralize kemik matriksi+mezenkimal kök hücre, bifazik kalsiyum fosfat+TZP ve bifazik kalsiyum fosfat+mezenkimal kök hücre uygulamışlardır. 6 hafta sonunda yapılan histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirme sonucunda en iyi kemik iyileşme kalitesinin Bifazik kalsiyum fosfat+Mezenkimal kök hücre grubunda olduğunu bildirmişlerdir<sup>309</sup>.

Jafarian ve arkadaşları, köpeklerin mandibulasında oluşturdukları kemik defektine 4 farklı greft kombinasyonu uygulayarak karşılaştırmışlardır. Bu kombinasyonlar ve kemik rejenerasyonundaki üstünlüklerinin kıyaslanması şu şekilde olmuştur; 1. sırada Bifazik kalsiyum fosfat+ Mezenkimal kök hücre grubu, 2. sırada Doğal sığır kemik minerali grefti+Mezenkimal kök hücre grubu, 3. sırada Bifazik kalsiyum fosfat grubu, 4. sırada Doğal sığır kemik minerali grefti şeklinde sıralandığını rapor etmişlerdir<sup>310</sup>.

**Pieri ve arkadaşları en iyi kemik rejenerasyonunu sağlayan greftin otogreft olduğunu ve bunu takiben Mezenkimal kök hücre+TZP+florhidroksilapatitin izlediği, Kojasteh ve arkadaşları ise en ideal kemik rejenerasyonunu Mezenkimal kök hücre+ Bifazik kalsiyum fosfat seramik greftinin sağladığını bildirmişlerdir. Jafarian ve**

arkadaşları ise ilk sırada Mezenkimal kök hücre+Bifazik kalsiyum fosfat seramik greftinin yer aldığını rapor etmişlerdir. Ancak bizim araştırmamızda ise ilk sırada Mezenkimal kök hücre+TZP+Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti kombinasyonu, en iyi kemik rejenerasyonunu sağlayan greft olarak yer almaktaydı. Çalışmamızın sonuçları Pieri ve arkadaşlarının ve Jafarian ve arkadaşlarının çalışmasıyla paralellik göstermektedir. Kojasteh ve arkadaşlarının çalışmasının farklı sonucu ise, bu araştırmada Mezenkimal kök hücre+TZP+Bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti kombinasyonunun birlikte uygulandığı bir çalışma grubunun olmayışı ve bu nedenle kıyaslama yapılamamış olması nedenlerine bağlı olabilir kanısındayız.

Dallari ve arkadaşları tarafından, tavşanlarda oluşturulan kemik defektlerinin tedavisinde kemik iliği stroma hücrelerinin periost tabakası üzerinden direkt defekte injekte edilmesine oranla, TZP ile kombine şekilde uygulanmasının kemik iyileşmesinin istatistiksel olarak anlamlılığını arttırdığı bildirilmiştir<sup>311</sup>. Bu bulgunun, TZP içerisindeki büyüme faktörlerinin, özellikle trombosit kaynaklı büyüme faktörünün, stroma kök hücreleri üzerindeki mitozu uyarıcı etkisine ve TZP'nin bir yapı iskelesi olarak osteokondüktif etkisine bağlı olabileceği ileri sürülmüştür<sup>267</sup>. Buna karşılık, tek başına TZP kullanımının 12 hafta sonunda defektin tamamen iyileşmesine yol açmadığı da belirtilmiştir. Bu çalışmada kemik iliği stromal hücrelerin yapı iskelesi olarak TZP kullanılmasının yanısıra, aynı zamanda TZP kemik grefti ile birlikte de uygulanmıştır. TZP'nin kemik grefti ile uygulandığı grupta, Kemik iliği stromal hücreler+TZP+Graft uygulanan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha az oranda yeni kemik oluşumu sağladığı rapor edilmiştir<sup>311</sup>.

**Çalışmamızda kranial kemik defektinin iyileşmesinin değerlendirilmesinde immünohistokimyasal ve histolojik değerlendirme ile osteogenezis, osteoblastik aktivite ve kemik hücreleri yoğunluğu ölçümleri yapılmış ve bu kriterler göz önüne alınarak kıyaslamalar gerçekleştirilmiştir.**

Özçelik ve ark. tarafından aynı histopatolojik değerlendirme kriterleri kullanılarak yapılan çalışmada ve daha önceki yayınlarda kranial kemik defektlerinin değerlendirilmesinde, düz radyogramlar veya BT kullanılmıştır. Direkt kranial kemik defektlerindeki etkinliğini inceleyen bir yayın olmamakla birlikte, bu bölgeye yakın olması ve fikir vermesi açısından, sıçan zigomatik arkının ortasından yapılan kemik defektinin takibinde 3-boyutlu bilgisayarlı tomografi (3Boyutlu BT) ve düz radyogramlar karşılaştırılmıştır. Postoperatif 10. haftada yapılan ölçümlerde, düz radyogramların kırık hattındaki fibröz kallusu yakalama şansının 3BBT'ye göre istatistiksel olarak daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca araştırmacılar istatistiksel olarak anlamlı olmasa da 20. haftada yapılan ölçümlerde, 3BBT ile yapılan ölçümün, defektin gerçek boyutunu düz radyogramlardan daha iyi tespit ettiğini, ancak istatistiksel olarak anlamlı şekilde defekti olduğundan daha küçük gösterdiğini de rapor etmişlerdir<sup>312</sup>.

Sıçanların kranial 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<sup>213</sup>. **Bizim çalışmamızda kritik büyüklükteki kemik defekti iyileşmesini tespit etmede radyolojik yöntemler kullanılmamıştır. Çalışmamızda histolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler tercih edilmiştir.**

## 7. SONUÇLAR

Çalışmamızda, deneysel olarak rat kalvaryumunda oluşturulan kritik boyut kemik defektlerinde mezenkimal kök hücreleri, bifazik kalsiyum fosfat seramikleri ve trombositten zengin plazmanın kemik rejenerasyonu üzerine etkileri histolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Bu incelemelerde, osteopontin ile osteonektin enzim ekspresyonlarının değerlendirilmesi ve osteosit yoğunluğu kriterleri gözönüne alınmıştır. Yapılan değerlendirmeler istatistiksel olarak kıyaslanmıştır. Elde edilen sonuçlar sıralanacak olursa;

1) Osteopontin ekspresyonu için yapılan haftalara göre kıyaslamada; osteoblastik aktivite 2. haftada çok az oranda (% 3.3) başlarken, 8. haftada bu oran artmış (% 23.3), 12. haftada ise ciddi bir farklılık yaratmıştır (% 73,3). İyileşme süresi boyunca uygulanan kesit alınma zamanları arasında oluşan osteogenezise bağlı olarak osteopontin ile pozitif boyanmada anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Bu durum iyileşme süresinin ilerlemesine paralel olarak osteoblastik aktivitenin başladığı ve osteogenezisin arttığı şeklinde yorumlanmıştır.

2) Osteonektin ekspresyonu için yapılan haftalara göre kıyaslamada; osteoblastik aktivite 2. haftada çok az oranda (% 10) hücre boyanması ile gerçekleşirken, 8. haftada bu oran artmış (% 40), 12. haftada ise ciddi bir fark yaratmıştır (% 76.7). Deney süresi boyunca uygulanan kesit alınma zamanları arasında oluşan osteogenezise bağlı olarak osteonektin ile pozitif boyanmada anlamlı farklılıklar tespit edilmiştir. Bu durum aynı şekilde iyileşme süresinin ilerlemesine paralel olarak osteoblastik aktivitenin başladığı ve osteogenezisin arttığı şeklinde yorumlanmıştır.

3) Deney süresince kesitlerin alındığı haftalara göre osteosit yoğunluğu incelendiğinde, tüm haftalar için arzu edilen 3 değeri (kontrol grubundan %

30 daha fazla osteosit yoğunluğu) sürenin ilerlemesine paralel olarak artış göstermektedir. Bu değer, çalışmanın 12. haftasında en yüksek seviyeye ulaşmıştır.

4) Değerlendirmeler sonucunda osteopontin ekspresyonu için gruplar arası kıyaslamada, en iyi osteopontin ile pozitif boyanan grubun Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu olduğu (%52,4), bunu sırasıyla Greft+ Mezenkimal kök hücre grubu (%42,9) ile Greft+TZP grubunun (%28,6) takip ettiği ve son olarak sadece Greft uygulanan grubun (%19,0) izlediği görülmüştür. Bu durum, osteokondüktif etkili grefte mezenkimal kök hücre ilavesiyle osteogenezis oldukça arttığını göstermekle beraber, mezenkimal kök hücrenin osteoblastik aktiviteyi yükselttiğini gösteren önemli bir materyal olduğu konusunda güçlü bir bulgudur.

5) Gruplar arası ikili kıyaslamada ise; Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu ile sadece greft uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilmiştir ( $p=0,024$ ). Bu durum, osteokondüktif etkili grefte TZP ve mezenkimal kök hücrelerin eklenmesinin osteoindüksiyonu sağladığı ve osteogenesisi anlamlı bir oranda arttığı şeklinde yorumlanmıştır.

6) Değerlendirmeler sonucunda osteonektin ekspresyonu için gruplar arası kıyaslamada, en iyi osteonektin ile pozitif boyanan grubun Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu olduğu (%66,7), bunu sırasıyla Greft+ Mezenkimal kök hücre grubunun (%57,1), Greft+TZP (%33,3) grubunun ve son olarak sadece Greft uygulanan grubun (%23,8) izlediği saptanmıştır. Hem mezenkimal kök hücrenin greftle birlikte uygulandığı 4. grupta, hem de mezenkimal kök hücrenin greft ve TZP ile birlikte uygulandığı 5. grupta ideal bir osteogenezisin elde edilmesi, düzenli bir kemik yapının oluşması ve erken dönemde osteoblastik aktivitenin başlaması gibi kriterler gözönüne alındığında **“bu kombinasyonun osteokondüktif özelliğinin yanısıra osteoindüktif bir özelliği olduğu”** şeklinde yorumlanmış ve bu özellikler histolojik ve immünohistokimyasal olarak gözlenmiştir.

7) Yukardaki değerler dikkate alınarak gruplar arası kıyaslamalarda ise; Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu ile Greft grubu arasında osteonektin boyanma pozitifliğine göre anlamlı bir farklılık saptanmıştır (p=0,005). Aynı şekilde Greft grubu ile Greft+Mezenkimal kök hücre grubu arasında (p=0,028) ve Greft+TZP grubu ile Greft+Mezenkimal kök hücre+TZP grubu arasında (p=0,031) anlamlı farklılıklar bulunmuştur. İstatistiksel değerlendirme sonucu Greft grubu ile Greft+Mezenkimal kök hücre grupları arasındaki değerlerin anlamlı çıkması ve yaklaşık 2 katı kadar bir fark yaratmış olması, bize Mezenkimal kök hücrenin osteogenezis üzerinde olumlu bir etkisi olduğunu göstermektedir. Bu bulgu oldukça önemli olup, ideal bir materyalin elde edilmesi hedefimize yaklaştığımız kanısını da uyandırmıştır. Üstelik bu materyale TZP ilavesinin olayı bir derece üst seviyeye çıkarması da, bu ürünün seçilebilecek bir materyal olduğunu düşündürse de bu durum “iyileşme açısından tercih hekime bırakılmalıdır” şeklinde yorumlanmıştır.

8) 2. hafta için Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre uygulanan grup (% 14,3) hariç diğer gruplarda ‘3’ derecesinde osteosit yoğunluğu görülmemiştir. Bu da erken dönem için osteosit artışının en iyi olduğu grubun Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu olduğunu göstermiştir.

8. haftada Greft+Mezenkimal kök hücre grubu en yüksek oranda 3. derece osteosit yoğunluğu göstermiştir (%42.9). Onu takiben Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubu gelmiştir (%28.6). Diğer gruplarda 8. haftada henüz ‘3’ derecesinde osteosit yoğunluğu gösteren kesit tespit edilememiştir.

12. haftada ise en iyi değer Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubunda (%85.7) gerçekleşirken bunu sırasıyla Greft+Mezenkimal kök hücre grubu (%57.1), Greft grubu (%28.6) ve sonuncu olarak Greft+TZP grubunun (%14.3) izlediği saptanmıştır.



9) Uygulanan tüm materyallerde yabancı cisim reaksiyonu, fibröz enkapsülasyon ve enfeksiyon gibi bulgular görülmezken; yara iyileşmesi prosedürü boyunca hemen hemen aynı düzeyde enflamasyon izlenmiştir.

Bu bulgular ışığında, deneysel olarak gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda mezenkimal kök hücreleri, bifazik kalsiyum fosfat seramik grefti ve trombositten zengin plazma osteogenezis üzerine etkileri 2., 8. ve 12. haftalarda incelenmiş; osteoblastik aktivite ve osteogenezisin Mezenkimal kök hücrenin kombine edildiği gruplarda ideal sonuçlar verdiği, osteokondüktif etkili grefte büyüme faktörü içeren TZP ve Mezenkimal kök hücrelerin ilavesiyle düzenli bir kemik yapının oluştuğu ve osteoindüksiyonun sağlandığı gözlenmiştir. İstatistiksel olarak gruplararası kıyaslamalarda, Greft+TZP+Mezenkimal kök hücre grubunun osteogenezisi 2 kat artırması önemli bir bulgu olup, ideal bir materyalin elde edilmesi hedefimize yaklaştığımız kanısı uyanmıştır. Yasal, etik ve tıbbi sorunların bir an önce aşılması, Mezenkimal kök hücre ile ilgili çalışmaların artırılması ve bunun klinik boyuta taşınması gerektiğini düşünmekteyiz.

## 8. KAYNAKLAR

---

- 1) Bassett CAL. Biophysical principles of affecting bone structures in G. H. Bourne (Ed.), *The Biochemistry and Physiology of Bone*. Acad. Press, Inc. NewYork. 1-76:1971
- 2) Cutting CB, McCarthy JG., Berenstein A: Blood supply of the upper craniofacial skeleton: The search for composite calvarial blood flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 74:603.1984
- 3) Schmitz JP., Schwartz Z., Hollinger JO., Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel).*;138(3):185-92,1990.
- 4) Aybar Odstroil A, Territoriale E, Missana L: An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam.* 18: 63-7: 2005
- 5) Dodde R, Yavuzer R, Bier UC, Alkadri A, Jackson IT: Spontaneous bone healing in the rabbit. *J Craniofac Surg.* 11: 346-9, 2000
- 6) Frame JW: A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg.* 38: 176-80, 1980
- 7) Greenwald AS, Boden SD, Goldberg VM, Khan Y, Laurencin CT, Rosier RN: Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications. *J Bone Joint Surg Am.* 83-A(Suppl 2, Pt 2):98-103: 2001
- 8) Szpalski M, Gunzburg R: Applications of calcium phosphate based cancellous bone void fillers in trauma surgery. *Orthopedics* 2002, 25(5 Suppl):601-9.
- 9) Boden SD: Bioactive factors for the bone tissue engineering. *Clin Orthop.* 367: 84-94: 1999
- 10) Khan SN, Bostrom MP, Lane JM: Bone growth factors. *Orthop Clin North Am.* 31: 375-388: 2000
- 11) Mathes SJ: Repair and grafting of bone. In: *Plastic surgery*. 2nd ed. Saunders Elsevier Inc, Philadelphia, 639-718: 2006
- 12) Crovetti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A: Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci* 30:145-151: 2004
- 13) Knighton DR, Fiegel VD, Austin LL, Ciresi KF, Butler EL: Classification and treatment of chronic nonhealing wounds: Successful treatment with autologous Platelet-derived wound healing factors(PDWHF). *Ann Surg* 204(3): 322-330:1986
- 14) Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Schumerth S, Butler EL, Cerra F: Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* 170: 56-60:1990

- 
- 15) Man D, Plosker H, Winland-Brown JE: The use of autologous platelet-rich plasma (Platelet Gel) and autologous platelet-poor plasma (Fibrin Glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 107(1): 229-239:2001
  
  - 16) Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA: Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 24: 483- 488:2001
  
  - 17) Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, Libener R, Cattana E, Levis A, Beta PG, Borzini P: The use of autologous platelet gel to treat difficult-to heal wounds: a pilot study. *Transfusion* 44: 1013-1018:2004
  
  - 18) Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Gali A: The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: A preliminary report. *Int J Artif Organs* 25: 334-338:2002
  
  - 19) 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
  
  - 20) Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 9(5):641-650:1991
  
  - 21) 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 USA*. 28;97(7):3213-8:2000
  
  - 22) Verfaillie C.M., Adult stem cells: assessing the case for pluripotency, *Trends in Cell Biology*, 12:502-508:2002
  
  - 23) Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C. et al. Multilineage potential af adult human mesenchymal stem cells, *Science* 284:143-147:1999
  
  - 24) 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
  
  - 25) 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
  
  - 26) 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
  
  - 27) 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

- 
- 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) 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
- 30) Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, Vanden 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
- 31) 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
- 32) 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
- 33) 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
- 34) 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
- 35) Bernard GW : Healing and repair of osseous defects. *Dent Clin North Am.*35(3) 469:1991
- 36) Daculsi G , Bouler JM, Legeros R.Z.: Adaptive crystal formation: in normal and pathological calcification. in synthetic calcium phosphate and related biomaterials. *Int. Rev.Cytology,* 172:129-191:1996
- 37) Silva RV, Camili JA, Bertran CA, Moreira NH, The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats, *Int. J Oral Maxillofac. Surg.* 34(2): 178-184:2005
- 38) İpekoğlu M, Gören Ş, Gümüşpala S, Altındaş S, Hidroksilapatit üretiminde farklı yöntemlerin karşılaştırılması, *Biyomut; National Meeting on Biomedical Engineering, İstanbul:*2004
- 39) Kökden A, Türker M, Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri ve Biyomateryaller, *Cumhuriyet Ün. Dişhekimliği Fak. Derg.* 2(2): 134-140:1999
- 40) Albee F.H.: Studies in bone growth. Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis. *Ann Surg* 71: 32-36:1920
- 41) Bhaskar SN, Btady JM, Getter L, Grower MF and Doskell T Biodegradable ceramic implants in bone, *J Oral Surg*32: 336-346:1971

- 
- 42) Nery E.B., Lynch KL, Hirthe WM, Mueller KH.: Bioceramics implants in surgically produced infrabony defects. J. Periodontol. 46: 328-339:1975
- 43) Legeros R.Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. Monographs in Oral Sciences.Vol 15:1991
- 44) Degroot K: Ceramics of calcium phosphates: preparation and properties. in bioceramics of calcium phosphate. CRC Press, Boca Raton, 100-114:1983
- 45) Jarcho M: Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. Clin Orthop 157: 259-278:1981
- 46) Daculsi G., LeGeros R.Z., Deudon C.. Scanning and transmission electron microscopy and electron probe analysis of the interface between implants and host bone. Scan. Micr 4: 309-314:1990
- 47) Hench LL, Splinter R.J., Ailen W.C., Greelee T.K: Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials, J Biomed Mater Res 2:117-141:1971
- 48) Gartner LP, Hiatt J.L.: Color textbook of Histology. 2th edition, W.B Saunders company, p129-155:2001
- 49) Junqueira LC., Carneiro J: Basic Histology 10th ed. Lange p141-154:2003
- 50) Kirker-Head CA, Gerhart TN, Schelling SH, Hennig GE, Wang E, Holtrop ME: Longterm healing of bone using recombinant human bone morphogenetic protein 2. Clin Orthop Relat Res. (318):222-230:1995
- 51) Kierszenbaum A.L: Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giriş. Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, 4. başlık, s118:2006
- 52) Bancroft JD, Stevens A: Theory and Practice of Histological Techniques. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork, Chapter 15, p309-339:1996
- 53) Gartner LP, Hiatt JL. Cartilage and Bone. Color Textbook of Histology, 2nd ed., Gartner LP, Hiatt JL (eds.) W. B. Saunders, Philadelphia, S:129-154: 2001
- 54) Atalay B. Deneysel Olarak Demir Eksikliği Anemisi Yapılan Sıçanlarda Kemik Defektlerine Yerleştirilen Greft Materyallerinin Kemik İyileşmesine Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul:2007
- 55) Ham AW, Cormack DH. Histophysiology of Cartilage, Bones and Joints. Philadelphia, JB Lippincott:1979
- 56) Owen M. The origin of bone cells. Int Rev Cytol 28-213:1970
- 57) Young RW. Nucleic acids, protein synthesis and bone. Clin Orthop Rel Res.26-147:1963

- 
- 58) Baron R. Anatomy and ultrastructure of bone, in Favus, M. 1.( Ed.), Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorder of Mineral Metabolism, 4th ed., Lippincott williams & Wilkins,chap. 1:1999
- 59) Fawcett DW, Bloom W. A textbook of histology. WB Saunders Comp. 10th ed.Philadelphia, London, Toronto; 244-282:1975
- 60) Kalfas HI. Principles of Bone Healing. Neurosurg Focus. 10(4); 1-4:2001
- 61) Fawcett DW, Bloom W. A textbook of histology. WB Saunders Comp. 10th ed.Philadelphia, London, Toronto; 244-282:1975
- 62) Soydan N. Genel Histoloji. İstanbul, İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi:1982
- 63) Şirin SY. Deneysel olarak meydana getirilen kemik defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul:2005
- 64) Gürkan T. Jinekolojik yönden Osteoporozla Yaklaşım. İçinde Gökçe Kutsal Y(Ed.) Osteoporoz. Günes Kitabevi Ankara;213-230.2005
- 65) Tuskan C, Yaltrık M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan Biyomateryaller.Bölüm I,II, İ.Ü. Dişhekimliği Fakültesi Yayınları, İstanbul:2002
- 66) Bowers G, Granet, M, Stevens M. Histologic evaluation of new attachment in humans.A preliminary report. J Periodontol; 56: 381-396:1985
- 67) Wozney JM, Rosen V, Byrne M, Celeste AJ, Moutsatsos I, Wang EA.. Growth factors influencing bone development. J Cell Sci Suppl. 1990; 13: 149 Gartner LP, Hiatt JL. Cartilage and Bone. Color Textbook of Histology, 2nd ed., Gartner LP, Hiatt JL (eds.) W. B. Saunders, Philadelphia, p129-154:2001
- 68) Sandy C, Marks JR, Popoff SN. Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton. The American Journal of Anatomy; 83(1): 1-44:1988
- 69) Duthie RB. Bone and Joint Tissues. In : Kyle J, Karey LC (Eds). Scientific Foundations of Surgery 4.ed. Heinemann Medical Books, Londra, 150 – 166:1989
- 70) Hollinshead HW, Rosse C. Textbook of Anatomy. 4.ed. Harper & Row Publishing, Philadelphia,24-30:1985
- 71) Tencate AR. Oral Histology Development, Structure and Function. Fourth Edition. Mosby:1984
- 72) Feinberg SE, Steinberg B, Helman J. Healing of traumatic injuries. In: Fonseca RJ, Walker RV, Betts NJ, Barber HD (Eds) Oral and maxillofacial trauma. Vol 1. 2nd Ed. Philadelphia (PA): WB Saunders Co.;13–59:1997
- 73) Miloro M. Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery Sec. Ed. BC Decker Inc Hamilton London:2004
- 74) Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. Science.; 260: 920-6:1993

- 
- 75) Radi Z, Khan K. Effects of Cyclooxygenase Inhibition on Bone, Tendon and Ligament Healing, *Inflammation Research J*; 1: 358-366:2005
- 76) Kılıçoğlu, SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*; 55: 143-150: 2002
- 77) Brond AR, Rubin TC: Fracture Healing. *Surgery of the Musculoskeletal System*. 2nd ed. Churchill Livingstone, New York, page 93-114:1990
- 78) Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: *Robbin's pathologic basis of disease*. 6th ed. WB Saunders Co, London:1999
- 79) Cruess RL. Healing of bone,tendon and ligament : Fractures. 2nd ed. Lippincott Co, Philadelphia, p147-167:1984
- 80) Junqueira LC, Carneiro J: *Basic Histology*, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter 8, page: 144 :2003
- 81) Heppenstall RB. editor. Fracture healing. *Fracture Treatment and Healing*. Philadelphia: Saunders;35- 64:1970
- 82) Fındıkçioğlu K.: Trombositten zengin ve fakir plazmanın kritik boyutta kemik defekti iyileşmesine etkisi, Uzmanlık tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D. S: 22:2006
- 83) Kruger GO. *Text Book of Oral and Maksillofacial Surgery*. The CV Mosby Company :1984
- 84) Fonseca R.J, Walker RV. *Oral and Maxillofacial Trauma* . W B Saunders Company. Vol II :1991 p183
- 85) Peterson LJ, İndresano AT, Marciani RD, Rose SM: *Principles of Oral and Maxillofacial Surgery* . J.B.Lippincott Company. Vol II:1992
- 86) Nolan PC, Nicholas RM, Mulholland BJ, Mollan RAB, VWilson DJ: Culture of huma Osteoblasts on Demineralized Human Bone. *The Journal of Bone and Joint Surgery*. 74-B (2) : 284-286 :1992
- 87) Archer WH, *Oral and Maxillofacial Surgery Vol II* VVBSaunders Company:1975
- 88) Sabiston DC, *Textbook of Surgery The Biological Basis of Modern Surgical Practice*. WB Saunders Company:1991
- 89) Jablanski S. *Illustrated Dictionary of Dentistry*. W.B.Saunders Company, Philadelphia:1982
- 90) Peterson LJ, Tucker MR. *Contemporary of Maxillofacial Surgery*. The CV Mosby Company:1988
- 91) Aybar B, Gümrü O: Oral Cerrahide Kemik Defektlerinin Onarımı. *İst. Tıp Fak. Mecmuası*. 63-3:2000
- 92) Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF: Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*. J ;3(1):49-57:2006
- 93) Boyne P.J. *Tissue Transplantations In: Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery*. Kruger G.O. (ed) 6th ed.,C.V. Moosby Cc.,St.Louis p: 296 – 332:1984

- 
- 94) Constantino PD, Freidman CD. Soft tissue augmentation and replacement in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am.* 27:1-12:1994
- 95) Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. *Clinical Orthopedics and Related Research.*371: 10-27:2000
- 96) Whang PG, Whang JC. Bone graft substitutes for spinal fusion. *The Spine Journal;* 3: 155-65:2003
- 97) Murashima Y, Yoshikawa G, Wadachi R, Sawada N, Suda H. Calcium sulfate as a bone substitute for various osseous defects in conjunction with apicectomy. *Int Endodontic J.*;36:768-74:2002
- 98) Cortellini P, Pnirato G, Tonetti M. Periodontal regeneration of human intrabony defects. Re-entry procedures and bone measurement. *J Periodontol.*;64:261-68:1993
- 99) Walsh WR, Morberg P, Yu Y, Yang JI, Haggard W, Sheath PC, Svehla M, Bruce WJ. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. *Clin Orthopedic;*406:228-36:1995
- 100) Karaca I, Yaman S, Uğar DA, Aral L, Arıcıoğ l A, İşman F. An Investigation of Serum Alkaline Phosphatase, Calcium and Phosphate Levels after Intraosseous Implantation of Pyrost in Humans. *Biochemical Archives.* Vol.13, 69-74:1997
- 101) Urist MR, O'Connor BT, Burwell RG.: *Bone Grafts, Derivates and Substitutes.* Butterworth - Helemann Company. Oxford, 3 – 80:1994
- 102) Pecora GE, De Leonardis D, Della Rocca C, Cornelini R, Cortesini C. Short term healing following the use of calcium sulfate as a grafting material for sinus augmentation: A clinical report. *Int J Oral and Maxillofac Imp.*1998;13:866-73.
- 103) De Leonardis D, Pecora GE. Augmentation of the maxillary sinus with calcium sulfate: one-year clinical report from a prospective longitudinal study. *Int J Oral and Maxillofac Imp.*14:869-78:1999
- 104) Hollinger JO, Battistone GC. Biodegradable bone repair materials. *Clin Orthop.*; 207: 209-305:1986
- 105) Ylinen P, Suuronen R, Taurio R, Tormala P, Rokanken P. Use of hydroxylapatite/polymer-composite in facial bone augmentation. An experimental study. *Int J Oral and Maxillofac Surg.*;31:405-9: 2002
- 106) Jarho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clin Orthop.*; 157:259:1981
- 107) Geesink RGT, Degroot K. Bonding of bone to apatite coated implants. *J Bone Joint Surg.*;70:17:1988
- 108) Byrd HS, Hobar PC. Augmentation of craniofacial skeleton with porous hydroxylapatite granules. *Reconst. Surg.*;91:15-22:1993
- 109) Hollinger JO, Brekke J. Role of bone substitutes. *Clin Orthop.*;324:55-65:1996



- 
- 110) Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *J Am Acad Orthop Surg*.;3:1-8:1995
  - 111) Turner TM, Urban RM, Gitelis S, Haggard W, Richelsoph K. Resorption evaluation of a large bolus of a calcium sulfate in a canine medullary defect. *Orthopedics*.;26: 577-9:2003
  - 112) Erbe EM. Attributes of vitoss synthetic cancellous bone void filler, an ultraporous beta-tricalcium phosphate saccfold (abstract) Presented at: Int Workshop on Bone Substitutes; October 8-10:2000
  - 113) Havelin LI, Engeseater LB, Furnes O, Lie SA, Vollset SE. The Norwegian arthroplasty register: 11 years and 73000 arthroplasties. *Acta Orthop Sacnd*.;71: 337-53:2000
  - 114) Strnad Z, Strnad J, Povysil C, Urban K. Effect of plasma sprayed hydroxyapatite coating on osteoconductivitiy of commercially pure titanium implants. *Int J Oral and Maxillofac Impl*.;15:483-90:2000
  - 115) Oonishi H, Kushitani S, Yasukawa E, Iwaki H, Hench LL, Wilson J, Tsuji E, Sugishara T. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. *Clin Orthop*.;334:316-25:1997
  - 116) Borelli J, William DP, William MR. Treatment of nonunions and osseous defects with bone graft and calcium sulfate. *Clin Orthop and Rel Research*.;411:245-54:2003
  - 117) Bucholz RW, Carlton A, Holmes R. Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop*.;240:53-62:1989
  - 118) Daculsi G, Passuti N, Martin S, Deudon C, Legeros RZ, Raheer S. Macroporous calcium phosphate ceramic for long bone surgery in humans and dog. Clinical and histological study. *J Biomedical Materials Research*.;24:379-96:1990
  - 119) Heise U, Osborn JF, Duwe F. Hydroxyapatite ceramic as a bone substitute. *Int orthopedics*.;14:329-38:1990
  - 120) Muschik M, Ludwig R, Halbhubner S, Bursche K, Stoll T. Beta-tricalcium phosphate as a bone substitute for dorsal spinal fusion in adolescent idiopathic scoliosis: preliminary results of a prospective clinical study. *Eur Spine J*.;10:178-84: 2001
  - 121) Daculsi G., LeGeros R.Z., Nery E., Lynch K. , Kerebel B.: Transformation of biphasic calcium phosphate in vivo. Ultrastructural and physico-chemical characterization. *J Biomed Mat Res* 23: 883-394:1989
  - 122) LeGeros R.Z., Daculsi G. . The in vivo behaviour of biphasic calcium phosphate. Histological, ultrastructural and physico-chemical characterization. in: *Handbook of Bioactive Ceramics, Calcium Phosphate and Hydroxylapatite Ceramics*:2001
  - 123) Yarnamuro T, Hench LL, Wilson-Hench J W: Eds. Amsterdam, CRC Press 2:1990
  - 124) Daculsi G., LeGeros R.Z., Mitre D.: Crystal dissolution of biological and ceramic apatiles. *Calcif Tissue Int*: 45: 95- 103:1989
  - 125) Daculsi G. Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials* 19:1473-8:1998

- 
- 126) Daculsi G., LeGeros R.Z., Heughebaert M., Barbieux.:Formation of carbonate apatite crystals after implantation of calcium phosphate ceramics. *Calcif Tissue int* 46: 20-27:1990
- 127) LeGeros R.Z.: Calcium phosphate materials in restorative dentistry : A review, *Adv. Dent. Res* 2:164-183:1988
- 128) Bonfield W. Hydroxyapatite-reinforced polyethylene as an analogous material for bone replacement. in *Bioceramics: Materials Characteristics Versus in Vivo Behavior*, P Ducheyne and J. E. Lemons (eds) *Ann NY Acad Sci* 523: 173-177:1988
- 129) Constanz B.R., Iken I.C., Fulmer M.T., Poser R.D., Smith ST, VanWagoner M. Ross J. Goldstein S.A. Skeletal repair by in situ formation of the mineral phase of bone. *Science* 267: 1796-1799:1995
- 130) Daculsi G , Bouler J.M., Legeros R.Z.: Adaptive crystal formation: in normal and pathological calcification. in *synthetic calcium phosphate and related biomaterials*. *Int. Rev.Cytology*, 172:129-191:1996
- 131) Daculsi G, Weiss P, Bouler Jm, Gauthier O, Aguado E.: Bcp/hpmc composite : a new concept for bone and dental substitution biomaterials. *Bone* ,25:59-61:1999
- 132) Millot F., Grimandi G., Weiss P. Daculsi G.: Preliminary in Vitro and in Vivo studies of a New Injectable Bone Substitute.*Cells and Mat.* 9:21-30:1999
- 133) Daculsi G., Weiss P., Delecrin J., Grimandi G., Passuti N., Guerin F. : Composition pour biomaterial - proceed preparation. Patent 94-01-414 1994235:1994
- 134) Tamai, N., Myoui, A.,Tomita,T., Nakase, T., Tanaka, J., Ochi.T., Yoshikawa,H. : Novei hydroxapatite Ceramics with an interconnective porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo.*J Biomed Mater Res.*,59 :110- 17:2002
- 135) Yubao L, Xingdong Z, DeGrooif K: Hydrolysis and phase transition of alpha-tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 18 :737-741:1997
- 136) Benahmed M., Bouler, JM., Gan.O.. Daculsi, G. : Bio degradation of synthetic biphasic calcium phosphate by human monocytes in vitro a morphological study. *Biomaterials*, p17 .2173-2178:1996
- 137) Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G. : Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions : Preliminary in vitro and in vivo study.*J Biomed Mater Res*, 46 : 103-111:1999
- 138) Van der Heyden MA, Hescheler J, Mummery CL. Spotlight on stem cells-makes old hearts fresh. *Cardiovasc Res* 58(2):241-245:2003
- 139) Şahin F., Saydam G., Omay S B.: Kök Hücre Plastisitesi ve Klinik Pratikte: Kök Hücre Tedavisi: *THOD* 1-15:2005
- 140) Karaöz E, Aksoy A, Ayhan S, Sarıboyacı A E, Kaymaz F, Kasap M.: Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers: *Histochem Cell Biol* 132:533–546:2009

- 
- 141) Devine SM: Mesenchymal stem cells: will they have a role in the clinic? *J Cell Biochem Suppl.* 38:73-79:2002
- 142) Pountos I, Giannoudis PV: Biology of mesenchymal stem cells. *Injury.* 36 Suppl 3:p8-12:2005
- 143) 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
- 144) 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
- 145) Connolly JF: Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clin Orthop Relat Res.* (313):8-18:1995
- 146) Abedin M, Tintut Y, Demer LL: Mesenchymal stem cells and the artery wall. *Circ Res.* 95(7):671-676, Review:2004
- 147) 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
- 148) 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
- 149) Virchow R: *Cellular pathology.* London: John Churchill:1863
- 150) Erices A, Conget P, Minguell JJ: Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 109(1):235-242:2000
- 151) 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
- 152) 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
- 153) Song L, Tuan RS: Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow. *FASEB J.* 18(9):980-982:2004
- 154) 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
- 155) 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
- 156) 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

- 
- 157) 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
- 158) 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
- 159) 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
- 160) 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
- 161) 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
- 162) 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
- 163) Friedenstein AJ, Piatetzky-Shapiro II, Petrakova KV: Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol*. 16(3):381-390:1966
- 164) 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
- 165) 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
- 166) 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
- 167) 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
- 168) 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
- 169) 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

- 
- 170) 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
- 171) 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
- 172) 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
- 173) 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
- 174) Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov 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
- 175) 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
- 176) 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
- 177) 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
- 178) 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
- 179) Ahn JI, Terry Canale S, Butler SD, Hasty KA: Stem cell repair of physeal cartilage. *J Orthop Res.* 22(6):1215-1221:2004
- 180) 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
- 181) Murphy JM, Fink DJ, Hunziker EB, Barry FP: Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48(12):3464-3474:2003
- 182) 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
- 183) 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

- 
- 184)** Kanno T., Takahashi T., Tsujisawa T., Ariyoshi W., Nishihara T.: Platelet Rich Plasma Enhances Human Osteoblast-Like Cell Proliferation and Differentiation; *J Oral Maxillofac Surg.*, 63,362-369:2005
- 185)** Ogino Y., Ayukawa Y., Tsukiyama Y., Koyano K.: The effect of platelet-rich plasma on the cellular response of rat bone marrow cells in vitro; *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol Endod.*,100,302-307:2005
- 186)** Seher A., Axmann D., Geis-Gerstorfer J., Weber H., Scheideler L.: Stimulation of Cell Proliferation by Platelet Rich Plasma (PRP); *Internationales Symposium 'Interface Biology of Implants' am 15./16.Mai in Rostock:2003*
- 187)** Tassani P., Otto D., Szekely A., Meiser B., Uberfuhr P., Pfeiffer M., Jaenicke U.: Transfusion of Platelet Rich Plasma from the Organ Donor during Cardiac Transplantation; *J. Clin Anesth.*, 9,409-414:1997
- 188)** Turk A., Ishida K., Jensen A., Wollman J., Miller T.: Enhanced Healing of Large Cranial Defects by an Osteoinductive Protein in Rabbits; *Plastic and Reconstructive Surgery.*,92(4),593-600:1993
- 189)** Camargo P.M., Lekovic V., Weinlaender M., Vasilic N., Madzarevic M., Kenney E.B.: Platelet-Rich Plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans; *J. Periodont. Res.*, 37,300-306:2002
- 190)** Canalis E., McCarthy T., Centrella M.: Isolation and Characterization of Insulin-Like Growth Factor I (Somatomedin-C) from Cultures of Fetal Rat Calvariae; *Endocrinology.*,122(1), 22-27:1988
- 191)** Carlson N.E., Roach R.B.: Platelet-rich plasma Clinical applications in dentistry; *J.A.D.A.*, 133,1383-1386:2002
- 192)** Cook S.D., Baffes G.C., Wolfe M.W., Sampath T.K., Rueger D.C., Whitecloud T.S.: The Effect of Recombinant Human Osteogenic Protein-1 on Healing of Large Segmental Bone Defects; *The Journal of Bone and Joint Surgery.*,74(6),827-838:1994
- 193)** Dugrillon A., Eichler H., Kern S., Kluter H.: Autologous concentrated platelet rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration; *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*,31, 615-619:2002
- 194)** Freymiller E.G., Aghaloo T.L.: Platelet-Rich Plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg.*, 62,484-488:2004
- 195)** Grageda E., Lozada J., Boyne P., Caplanis N., Mcmillan P.: Bone Formation in the Maxillary Sinus by using Platelet Rich Plasma: An Experimental Study in Sheep; *J.Oral Implantology.*,31(1),2-17:2005
- 196)** Heckman J.D., Boyan B.D., Aufdemorte T.B., Abbott J.T.: The Use of Bone Morphogenetic Protein in the Treatment of Non-Union in a Canine Model: *The Journal of Bone and Joint Surgery.*,73(5),750-764:1991
- 197)** Marukawa E., Asahina I., Oda M., Seto I., Alam Md., Enomoto S.; Functional reconstruction of the non-human primate mandible using recombinant human bone morphogenetic protein-2; *Int. J. Oral Maxillofacial Surgery.*, 31,294-302:2002

- 
- 198) Scheliephake H., Lagner M.: Reconstruction of the mandible by prefabricated autogenous bone grafts; *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, 26, 244-252:1997
- 199) Termaat M.F., Den Boer F.C., Bakker F.C., Patka P., Harman T.J.: Current Concepts Review Bone Morphogenetic Proteins; *The Journal of Bone and Joint Surgery.*,87(6),1367-1376: 2005
- 200) Soffer E., Ouhayoun J.P., Anagnostou F.: Fibrin sealants and platelet preparations in bone and periodontal healing; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, 95,521-528:2003
- 201) Tozum T.F., Demiralp B.: Platelet-Rich Plasma: A Promising Innovation in Dentistry; *J. Can. Dent. Assoc.*, 69(10),664.2003
- 202) Ferreira C.F., Carriel Gomes M.C., Filho J.S., Granjeiro J.M., Oliveira Simoes C.M., Magini R.S.: Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth: *Clin. Oral Impl. Res.*, 16,456-460:2005
- 203) Choi B.H., Zhu S.J., Kim B.Y., Huh J.Y., Lee S.H., Jung J.H.: Effect of platelet rich plasma(PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study; *Int. J. Oral and Maxillofac. Surg.*, 34, 420-424:2005
- 204) Landesberg R., Roy M., Glickman R.S.: Quantification of Growth Factor Levels Using a Simplified Method of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation; *J Oral Maxillofac Surg.*, 58,297-300:2000
- 205) Sanchez A.R., Sheridan P.J., Kupp L.I.: Is Platelet Rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review; *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*,18,93-103:2003
- 206) Kanno T., Takahashi T., Tsujisawa T., Ariyoshi W., Nishihara T.: Platelet Rich Plasma Enhances Human Osteoblast-Like Cell Proliferation and Differentiation; *J Oral Maxillofac Surg.*, 63,362-369:2005
- 207) Wang F.S., Kuo Y.R., Wang C.J., Yang K.D., Chang P.R., Huang Y.T., Huang H.C., Sun Y.C., Yang Y.J., Chen Y.C.: Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  activation and vascular endothelial growth factor-A expression in human osteoblasts: *Bone.*, 35,114-123:2004
- 208) Hock J.M., Centrella M., Canalis E.: Insulin-Like Growth Factor I Has Independent Effects on Bone Matrix Formation and Cell Replication, *Endocrinology.*,122(1),254-260:1988
- 209) Bayramiçli M: Deneysel mikrocerrahi. 1. baskı. Argos iletişim, İstanbul, S:123:2005
- 210) Schmitz JP, Hollinger JO: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res.* 205: 299-308:1986
- 211) 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
- 212) 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: 58-62:2001
- 213) 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
- 214)** 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
- 215)** Aaboe M., Pinholt E., Hjorting-Hansen E.: Unicortical Critical Size Defect of Rabbit Tibia is Large Than 8 mm.; *The Journal of Craniofacial Surgery.*,5(3),201-3:1994
- 216)** Bosch C., Melsen B., Vargervik K.; Importance of the Critical Size Bone Defect in Testing Bone-Regenerating Materials; *The Journal of Craniofacial Surgery.*,9(4),310- 316:1998
- 217)** Develioğlu H.: Kritik Boyutlu ve Kritik Boyutlu Olmayan Defektler, Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 6(1), 60-63:2003
- 218)** 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
- 219)** Jan A, Sandor G, Iera D, Mhawi A, Peel S, Evans W, Clokie C: Hyperbaric oxygen results in an increase in rabbit calvarial critical sized defects; *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101;144-149:2006
- 220)** Basterzi Y: Sıçan kraniyal kemik defektlerinde insan amniyon sıvısının kemik iyileşmesi üzerine etkisi, Uzmanlık tezi, Ankara, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D. S: 15:2003
- 221)** 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
- 222)** 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
- 223)** Brom MJ, Banta JV, Renshaw TS. Spinal fusion augmented by Luque-rod segmental instrumentation for neuromuscular scoliosis. *J Bone Joint Surg Am.* 71:32-44:1989
- 224)** Henman P, Finlayson D. Ordering allograft by weight: Suggestions for the efficient use of frozen bone-graft for impaction grafting. *J Arthroplasty.*;15:368-71: 2000
- 225)** Dedeoğlu R.K., DBM (Demineralize kemik matriksi) ve  $\beta$ -trikalsiyum fosfat'ın deneysel kemik defektlerinde ayrı ayrı ve birlikte kullanıldıklarında iyileşme üzerine olan etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri enstitüsü. İstanbul:2004
- 226)** Nemeth Z, Suba Z, Hrabak K, Barabas J, Szabo G. Autogenous bone versus beta-tricalcium phosphate graft alone for bilateral sinus elevations (2-3D CT, histologic and histomorphometric evaluations. *Orv. Hetil.*;143(25:1533-1538:2002
- 227)** Artzi Z., Tal H., Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part 1: Histomorfometric evaluations at 9 months. *J. of Periodontology.* 71: 1015-1023:2000



- 
- 228) Sanders D.L., Reinisch L. :Wound Healing and collagen thermal damage in 7,5  $\mu$ sec pulsed carbondioxide laser skin incisions, *Lasers. Surg. Med.*26:22-32:2000
- 229) Mundell RD, Money MP, Siegel MI, Losken A. Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. *J Oral Maxillofac Surg.* 51:1004-12:1993
- 230) Bostman O, Pihlajamaki H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: A review. *Biomaterials.*21:2615-21: 2000
- 231) Cornell CN. Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts. *Orthop Clin North Am.* 30:591-8:1999
- 232) Ruhaimi KA. Effect of adding resorbable calcium sulfate to grafting materials on early bone regeneration in osseous defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 6: 859-64:2000
- 233) Electronic References (2004). Cam implants bv. Erisim, <http://www.camimplants.nl/noframes/sp.>: 20.03.2005
- 234) Lecomte A, Gautier H, Bouler JM, Gouyette A, Pegon Y, Daculsi G, Merle C, Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 84(1):1-6: 2008
- 235) Moore wr,Grave SE, Bain GI,Synthetic bone graft sustitues.*Australian and New Zealand Journal of Surgery* 71: 354-61:2001
- 236) Foitzik C, Darmstadt HS. Pure-phase Tricalcium phosphate for bone substitution in periodontal disease. *Quintessence.*;50:1049-58:1999
- 237) Farina NM, Guzon FM, Pena ML, Cantalapedra AG: In vivo behaviour of two different biphasic ceramic implanted in mandibular bone of dogs. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* Volume 19, Number 4, 1565-1573, DOI: 10.1007/s10856-008-3400-y:2007
- 238) Tarcy BM, Doremus RH. Direct electron microscopy studies of the bone hydroxylapatite interface. *J Biomed Mater Res.*;18:719:1984
- 239) Ishikawa I, Sasaki KM, Aoki A, Watanabe H,Effects ofEr:YAG laser on periodontal therapy. *J Int Acad Periodont* 5(1): 23-28:2003
- 240) Gosain AK, Riordan PA, Song L, Amarante MT, Kalantarian B, Nagy PG, Wilson CR, Toth JM, McIntyre BL. A 1-Year Study of Hydroxyapatite-Derived Biomaterials in an Adult Sheep Model: III. Comparison with Autogenous Bone Graft for Facial Augmentation. *Plas. Reconstr Surg.* 116:1044-52: 2005
- 241) Grimes JS, Bocklage TJ, Pitcher JD. Collagen and biphasic calcium phosphate bone graft in large osseous defects. *Orthopedics.* 29:145-9:2006
- 242) Xie Y, Chopin D, Morin C, Hardouin P, Zhu Z, Tang J, Lu J.Evaluation of the osteogenesis and biodegradation of porous biphasic ceramic in the human spine. *Biomaterials.* 27:2761-7: 2006

- 
- 243) Bloemers FW, Pakta P, Bakker HJ, Wippermann BW, Harmann HJ. The use of calcium phosphates as a bone substitute material in trauma surgery. *Osteosynthesis and Trauma Care*. 10:33-7:2002
- 244) Erkoçak A. *Genel Histoloji*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları; 1980 236-257.
- 245) Raghoobar G.M., Schortinghuis J., Liem R.S.B., Ruben J.L., Van Der Wal J.E., Vissink A.: Does platelet-rich plasma promote remodelling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor?: *Clin. Oral Impl. Res.*,16,349-356:2005
- 246) Marx R.E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M., Schimmele S.R., Strauss J.E., Georgeff K.R.: Platelet-rich plasma Growth factor enhancement for bone grafts: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*,85,638-646:1998
- 247) Oyama T., Nishimoto S., Tsugawa T., Shimizu F.: Efficacy of Platelet Rich Plasma in Alveolar Bone Grafting; *J Oral Maxillofacial Surg.*,62,555-558:2004
- 248) Butterfield K.J., Bennett J., Gronowicz G., Adams D.: Effect of Platelet Rich Plasma with Autogenous Bone Graft for Maxillary Sinus Augmentation in a Rabbit Model; *J Oral Maxillofacial Surg.*,63,370-376:2005
- 249) Fennis J.P.M., Stoelinga P.J.W., Jansen J.A.: Mandibular reconstruction: A clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma; *Int. J. Oral and Maxillofacial Surg.*, 31,281-286:2002
- 250) Robiony M., Polini F., Costa F., Politi M.: Osteogenesis Distraction and Platelet-Rich Plasma for Bone Restoration of the Severely Atrophic Mandible: Preliminary Results; *J Oral Maxillofacial Surg.*,60,630-635:2002
- 251) Aghaloo T.L., Moy P.K., Freymiller E.G.: Investigation of Platelet-Rich Plasma in Rabbit Cranial Defects: A Pilot Study; *J Oral Maxillofacial Surg.*, 60,1176-1181:2002
- 252) Jaksen., Tangl S., Gilli R., Berghold A., Lorenzoni M., Eskıcı A., Haas R., Pertl C.: Influence of PRP on autologous sinus grafts. An experimental study on sheep; *Clinical Oral Implants Research.*,14,578-583:2003
- 253) Furst G., Gruber R., Tangl S., Sanroman F., Watzek G.: Effects of fibrin sealant protein concentrate with and without platelet-released growth factors on bony healing of cortical mandibular defects. An experimental study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research.*,15,301-307:2004
- 254) Belli E., Longo B., Balestra F.M.: Autogeneous Platelet-Rich Plasma in Combination With Bovine Derived Hydroxyapatite Xenograft for Treatment of a Cystic Lesion of the Jaw; *The Journal of Craniofacial Surgery.*, 16(6),978-980:2005
- 255) Kassolis J., Rosen P., Reynolds M.: Alveolar Ridge and Sinus Augmentation Utilizing Platelet Rich Plasma in Combination with Freze-Dried Bone Allograft: Case Series; *J Periodontol.*,71(10),1654-1661:2000
- 256) Zechner W., Tangl S., Tepper G., Furst G., Bernhart T., Haas R., Mailath G., Watzek G.: Influence of Platelet-rich Plasma on Osseous Healing of Dental Implants: A Histologic and Histomorphometric Study in Minipigs; *Int. J. Oral and Maxillofacial Implants.*,18,15-22:2003

- 
- 257) Anitua E.: Plasma Rich in Growth Factors: Preliminary Results of Use in the Preparation of Future Sites for Implants; *Int. J. Oral and Maxillofacial Implants.*, 14,529- 535:1999
- 258) Valle A.D., Sammartino G., Marenzi G., Tia M., Lauro A.E., Ferrari F., Muzio L.: Prevention of Postoperative Bleeding in Anticoagulated Patients Undergoing Oral Surgery: Use of Platelet-Rich Plasma Gel; *J. Oral Maxillofac Surg.*,61,1275-1278 ;104: 2003
- 259) Sammartino G., Tia M., Marenzi G., Espedito Di Lauro A., D'agostino E., Claudio P.R.: Use of Autologous Platelet-Rich Plasma (PRP) in Periodontal Defect Treatment After Extraction of Impacted Mandibular Third Molars: *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 63,766-770:2005
- 260) Hanna R., Trejo P.M., Weltman R.L. Treatment of intrabony defects with bovine-derived xenograft alone and in combination with platelet-rich plasma: a randomized clinical trial. *Journal of Periodontology*, 75(12),1668-1677:2004
- 261) Arpornmaeklong P., Kochel M., Depprich R., Kübler N.R., Würzler K.K. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 33(1), 60–70:2004
- 262) Döri F., Huszar T., Nikolidakis D., Arweiler N.B., Gera I., Sculean A. (a). Effect of platelet-rich plasma on the healing of intra-bony defects treated with a natural bone mineral and a collagen membrane. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(3), 254-261:2007
- 263) Christgau M., Moder D., Wagner J., Glässl M., Hiller K.A., Wenzel A., Schmalz G. (b). Influence of autologous platelet concentrate on healing in intra-bony defects following guided tissue regeneration therapy: a randomized prospective clinical split-mouth study. *Journal of Clinical Periodontology*, 33(12), 908-921:2006
- 264) Jensen T.B., Rahbek O., Overgaard S. Platelet rich plasma and fresh frozen bone allograft as enhancement of implant fixation. An experimental study in dogs. *Journal of Orthopaedic Research* : 22(3), 653–658:2004
- 265) Choi B.H., Im C.J., Huh J.Y., Suh J.J., Lee S.H.. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *International journal of oral and maxillofacial surgery*, 33(1), 56-59:2004
- 266) Çetin Ç. Kemik Defektlerinin İyileşmesinde Non-Rezorbe Biyomateryaller İle, Trombositten Zengin Plazma (PRP) ve Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR)'nun Etkilerinin Deneysel Olarak Araştırılması. Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi. Diyarbakır:2008
- 267) Yamada Y., Ueda M., Naiki T., Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clinical Oral Implants Research*, 15(5), 589-597:2004
- 268) Nasr H.F., Aichelmann-Reidy M.E., Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontology 2000*, 19, 74-86:1999
- 269) Giannobile W.V., Lee C.S., Tomala M.P., Tejeda K.M., Zhu Z. Platelet-derived growth factor (PDGF) gene delivery for application in periodontal tissue engineering. *Journal of Periodontology*, 72(6), 815–823:2001

- 
- 270) Jin Q.M., Anusaksathien O., Webb S.A., Rutherford R.B., Giannobile W.V.. Gene therapy of bone morphogenetic protein for periodontal tissue engineering. *Journal of Periodontology*, 74(2), 202–213:2003
- 271) Kawaguchi H., Hirachi A., Hasegawa N., Iwata T., Hamaguchi H., Shiba H., Takata T., Kato Y., Kurihara H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *Journal of Periodontology*, 75(9), 1281-1287:2004
- 272) Kramer P.R., Nares S., Kramer S.F., Grogan D., Kaiser M. Mesenchymal Stem Cells Acquire Characteristics of Cells in the Periodontal Ligament *in vitro*. *Journal of Dental Research*, 83(1), 27-34:2004
- 273) Maria O.M., Khosravi R., Mezey E., Tran S.D. (2007). Cells from bone marrow that evolve into oral tissues and their clinical applications. *Oral Diseases*, 13(1), 11-16.
- 274) Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 441, 1060:2006
- 275) Rosenthal N Prometheus's vulture and the stem-cell promise. *The New England journal of medicine*, 349(3), 267–274:2003
- 276) Baum C.M., Weissman I.L., Tsukamoto A.S., Buckle A.M., Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(7), 2804– 2808:1992
- 277) Alison M.R., Golding M., Sarraf C.E. Liver stem cells: when the going gets tough they get going. *International journal of experimental pathology*, 78(6), 365–381:1997
- 278) Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*, 276(5309), 71–74:1997
- 279) Johansson C.B., Svensson M., Wallstedt L., Janson A.M., Frisen J. (1999). Neural stem cells in the adult human brain. *Experimental cell research*, 253(2), 733–736.
- 280) Janes S.M., Lowell S., Hutter C. Epidermal stem cells. *The Journal of pathology*, 197(4), 479–491:2002
- 281) Marshman E., Booth C., Potten C.S. The intestinal epithelial stem cell. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 24(1), 91–98:2002
- 282) Chen J.C., Goldhamer D.J. Skeletal muscle stem cells. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*, 1, 101:2003
- 283) Miura M., Gronthos S., Zhao M., Lu B., Fisher L.W., Robey P.G., Shi S. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(10), 5807–5812:2003
- 284) Seo B.M., Miura M., Gronthos S., Bartold P.M., Batouli S., Brahimi J., Young M., Robey P.G., Wang C.Y., Shi S. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364(9429), 149-155:2004
- 285) Matsubara T., Suardita K., Ishii M., Sugiyama M., Igarashi A., Oda R., Nishimura M., Saito M., Nakagawa K., Yamanaka K., Miyazaki K., Shimizu M., Bhawal U.K., Tsuji K., Nakamura K., Kato Y. Alveolar bone marrow as a cell source for regenerative medicine: differences between alveolar and iliac bone marrow

- 
- stromal cells. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 20(3), 399- 409:2005
- 286)** Akintoye S.O., Lam T., Shi S., Brahim J., Collins M.T., Robey P.G. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*. 38(6), 758-68:2006
- 287)** Phinney D.G., Kopen G., Righter W., Webster S., Tremain N., Prockop D.J. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of cellular biochemistry*, 75(3), 424–436:1999
- 288)** Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A., Robey P.G., Storms R.W., Gimple J.M. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology*, 189(1), 54–63:2001
- 289)** Shi S., Bartold P.M., Miura M., Seo B.M., Robey P.G., Gronthos S. The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthodontics & craniofacial research*, 8(3), 191-199:2005
- 290)** Rubio D., Garcia-Castro J., Martin M.C., de la Fuente R., Cigudosa J.C., Lloyd A.C., Bernad A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer research*, 65(8), 3035–3039:2005
- 291)** Miura M., Miura Y., Padilla-Nash H.M. Molinolo A.A., Fu B., Patel V., Seo B.M., Sonoyama W., Zheng J.J., Baker C.C., Chen W., Ried T., Shi S. Accumulated chromosomal instability in murine bone marrow mesenchymal stem cells leads to malignant transformation. *Stem Cells*, 24(4), 1095–1103:2005
- 292)** Mulder P.O., Willemse P.H., Aalders J.G., de Vries E.G., Sleijfer D.T., Sibinga C.T., Mulder N.H. High-dose chemotherapy with autologous bone marrow transplantation in patients with refractory ovarian cancer. *European journal of cancer & clinical oncology*, 25(4), 645–649:1989
- 293)** Le Blanc K.C., Tammik K., Rosenthal E., Zetterberg and O. Ringde'n., HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol*. 31: 890–896:2003
- 294)** Maitra B., Szekely E., Gjini K. et al., Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* , 33: 597–604:2004
- 295)** Miura M., Miura Y., Sonoyama W., Yamaza T., Gronthos S., Shi S. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells for regenerative medicine in craniofacial region. *Oral Diseases*, 12(6), 514–522:2006
- 296)** Liechty K.W., MacKenzie T.C., Shaaban A.F., Radu A., Moseley A.M., Deans R., Marshak D.R., Flake A.W. Human mesenchymal stem cells engraft and demonstrate site-specific differentiation after in utero transplantation in sheep. *Nature Medicine*, 6(11), 1282-1286:2000
- 297)** S., Zand S., Vacanti J.P., Fauza D.O. Cartilage engineering from ovine umbilical cord blood mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*, 23(7), 958–964:2005
- 298)** Awad H.A., Butler D.L., Harris M.T., Ibrahim R.E., Wu Y., Young R.G., Kadiyala S., Boivin G.P. In vitro characterization of mesenchymal stem cell-seeded collagen scaffolds for tendon repair: effects of initial seeding density on contraction kinetics. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(2), 233- 240:2000

- 
- 299)** Ochi M., Uchio Y., Tobita M., Kuriwaka M. Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. *Artificial organs*, 25(3), 172-179:2001
- 300)** Iwasa J., Ochi M., Uchio Y., Katsube K., Adachi N., Kawasaki K. Effects of cell density on proliferation and matrix synthesis of chondrocytes embedded in atelocollagen gel. *Artificial organs*, 27(3), 249-255:2003
- 301)** Kotobuki N., Hirose M., Takakura Y., Ohgushi H. Cultured Autologous Human Cells for Hard Tissue Regeneration: Preparation and Characterization of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow. *Artificial Organs*, 28(1), 33–39:2004
- 302)** Ohgushi H., Okumura M., Yoshikawa T., Inoue K., Senpuke N., Tamai S. Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *Journal of biomedical materials research*, 26(7), 885–895:1992
- 303)** Ohgushi H., Dohi Y., Kaduda T., Tamai S., Tabata S., Suwa Y. In vitro bone formation by rat marrow cell culture. *Journal of biomedical materials research*, 32(3), 333–340:1996
- 304)** Kitamura S., Ohgushi H., Hirose M., Funaoka H., Takakura Y., Ito H. Osteogenic differentiation of human bone marrow derived mesenchymal cells cultured on alumina ceramics. *Artificial organs*, 28(1), 72–92:2003
- 305)** Yamada Y., Boo J.S., Ozawa R., Nagasaka T., Okazaki Y., Hata K., Ueda M. Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cells and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, 31(1), 27-33:2003
- 306)** Yamada Y., Ueda M., Naiki T., Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clinical Oral Implants Research*, 15(5), 589-597:2004
- 307)** Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D., Sangiorgi L., Cenacchi A., Del Vento A.M., Meotti C., Bertoja A.Z., Giardino R., Fornasari P.M., Mercuri M., Picci P. Platelet derived growth factors enhance proliferation of human stem cells. *Biomaterials*, 24(18), 3095–3100:2003
- 308)** Pieri F, Lucarelli E, Corinaldesi G, Fini M, Aldini NN, Giardino R, Donati D, Claudio M: Effect of Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on the Healing of Standardized Bone Defects in the Alveolar Ridge: A Comparative Histomorphometric Study in Minipigs, *J Oral Maxillofac Surg* 67:265-272:2009
- 309)** Khojasteh A., Eslaminejad M. B., Nazarian H. Mesenchymal stem cells enhance bone regeneration in rat calvarial critical size defects more than platelet-rich plasma, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 106:356-62:2008
- 310)** Jafarian M., Eslaminejad M. B., Khojasteh A., Abbas F. M., Dehghan M. M., Hassanizadeh R., Houshmand B. Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic calcium phosphate and natural bone mineral, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 105:e14-e24:2008
- 311)** Dallari D., Fini M., Stagni C., Torricelli P., Nicoli Aldini N., Giavaresi G., Cenni E., Baldini N., Cenacchi A., Bassi A., Giardino R., Fornasari P.M., Giunti A. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells,

---

platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 24(5), 877-888:2006

- 312)** Özcelik 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

---

## 8. ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında Kayseri'de doğdum. İlkokul, orta okul ve lise öğrenimimi Kahramanmaraş'ta tamamlayarak 2000 yılında Dicle Ün. Diş Hekimliği Fakültesinde öğrenimime devam ettim. 2005 yılında Dicle Ün. Diş Hekimliği Fakültesi Ağız-Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi A. D. Doktora eğitimime başladım ve devam etmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.