

T.C.

İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CARRAHİSİ ANABİLİM DALI

**TAVŞAN KALVARYUMU MODELİNDE YENİ KEMİK
OLUŞUMU ÜZERİNE STROMAL VASKULER FRAKSİYON
İLE LOKAL VE SİSTEMİK OZON KULLANIMININ
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

DT. EMRULLAH ÖZEN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. MURAT ULU

ORTAK DANIŞMAN

PROF. DR. SEVTAP GÜNBAY

2018-OCAK

İZMİR

T.C.
İZMİR KÂTİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CARRAHİSİ ANABİLİM DALI

**TAVŞAN KALVARYUMU MODELİNDE YENİ KEMİK
OLUŞUMU ÜZERİNE STROMAL VASKULER FRAKSİYON
İLE LOKAL VE SİSTEMİK OZON KULLANIMININ
ETKİNLİĞİNİN KARŞILAŞTIRMALI OLARAK
ARAŞTIRILMASI**

DT. EMRULLAH ÖZEN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. MURAT ULU
ORTAK DANIŞMAN
PROF. DR. SEVTAP GÜNBAY

2018-OCAK

İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 16 / 01 / 2018

Tez Danışmanı: Yrd. Doç.Dr. Murat ULU(Danışman)

Üye: Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU(Manisa Celal Bayar Üniversitesi)

Üye: Doç. Dr. Şükrü ENHOŞ(İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi)

Üye: Yrd. Doç. Dr.Hüseyin AKÇAY(İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi)

Üye: Yrd. Doç. Dr. Ahmet Emin DEMİRBAŞ(Erciyes Üniversitesi)

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet KOYU

Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Tavşan kalvaryumu modelinde yeni kemik oluşumu üzerine stromal vasküler fraksiyon ile lokal ve sistemik ozon kullanımının etkinliğinin karşılaştırılması olarak araştırılması amaçlanan doktora tezi çalışmamın her aşamasında bana yol gösteren, doktora eğitimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen, anlayış ve hoşgörüsüyle desteğini her daim hissettiğim tez yöneticim değerli hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Murat ULU'ya,

Araştırmamın histopatolojik ve stereolojik değerlendirme kısmını gerçekleştirmemde destek ve yardımlarını esirgemeyen Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER'e, Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Mehmet İbrahim TUĞLU'ya

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.B.D başkanımız sayın Prof. Dr. Nergiz Yılmaz'a,

Doktora eğitimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi A.B.D öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKÇAY'a ve diğer değerli öğretim üyelerimize,

Doktora eğitimim ve tezimin hazırlanma süreci boyunca her türlü desteklerini yanımda hissettiğim sevgili asistan arkadaşlarıma ve tüm kürsü personeline,

Doktora eğitimim boyunca ve tez çalışmamın her aşamasında fedakârlıkla bana destek veren ve hep yanımda duran, tüm aile fertlerime, manevi güç kaynaklarım sevgili eşim Latife ÖZEN'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve onay	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
Şekiller Dizini	x
Resimler Dizini	xi
Tablolar Dizini	xiii
1. GİRİŞ	
2. GENEL BİGİLER	
2.1. KEMİK DOKUSU	4
2.1.1 Kemik Dokusu Hücreleri	4
2.1.1.1 Osteoblastlar	4
2.1.1.2.Osteositler	5
2.1.1.3.Osteoklastlar	6
2.1.2. Kemik Matriksi	7
2.1.2.1. İnorganik Matriks	7
2.1.2.2. Organik Matriks	8
2.1.3. Periosteum ve Endosteum	8
2.1.4. Kemik Tipleri	9
	iv

2.1.4.1. Lameller Kemik	9
2.1.4.2. Örgümsü (İmmatür) Kemik	10
2.1.5. Kemikleşme(Osteogenezis)	11
2.1.5.1. İntramembranöz Kemikleşme	12
2.1.5.2. Endokondral Kemikleşme	12
2.1.6. Kemik Büyümesi, Remodeling ve Onarımı	14
2.1.7. Ağız, Diş ve Çene Cerrahisinde Kemik Ogmentasyon Uygulamaları	15
2.1.7.1. Monokortikal Onlay Kemik Greftleri	15
2.1.7.2. Distraksiyon Osteogenezisi	16
2.1.7.3. Sandviç Osteotomi (İnterpozisyonel Greft Uygulaması)	17
2.1.7.4. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu	18
2.1.7.4.1. Bariyer membranlar	18
2.1.7.4.2. Greft Materyalleri	20
2.1.8. Kemik Doku Mühendisliği	23
2.2. KÖK HÜCRE	25
2.2.1 Kök Hücrelerin Genel Özellikleri	25
2.2.2. Kök Hücrelerin Sınıflandırılması	26
2.2.2.1. Farklılaşabilme Potansiyeline Göre Kök Hücreler	26
2.2.2.1.1. Totipotent Kök Hücreler	26
2.2.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreler	27
2.2.2.1.3. Multipotent Kök Hücreler	28
2.2.2.1.4. Unipotent Kök Hücreler	28
2.2.2.2. Elde Edilen Kaynağına Göre Kök Hücreler	28

2.2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler	28
2.2.2.2.2. Fetal Kök Hücreler	29
2.2.2.2.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri	29
2.2.2.2.4. Plasenta Kök Hücreleri	30
2.2.2.2.5. Amniyon Sıvısı Kök Hücreleri	30
2.2.2.2.6. Erişkin Kök Hücreleri	31
2.2.2.2.7. Hematopoetik Kök Hücreleri	31
2.2.2.2.8. Mezenkimal Kök Hücreler	32
2.2.2.2.8.1. Yağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücre	33
2.2.3. Kök Hücrelerin Klinikte Kullanım Alanları	34
2.3. STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON	36
2.3.1. Stromal Vasküler Fraksiyon Tarihçesi	36
2.3.2. Otolog Yağ Dokusundan Elde Edilen SVF'nin Kemik Rejenerasyonunda Güncel Klinik Uygulamaları	38
2.4. OZON	40
2.4.1. Ozonun Tarihçesi	40
2.4.2. Tıbbi Ozon Jenaratörü	40
2.4.3. Ozonun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	41
2.4.4. Klinik Uygulamada Ozonun Etki Mekanizması	42
2.4.5. Oksidatif stres ve antioksidan sistem	46
2.4.5.1. Reaktif Oksidan Türü Kaynakları	47
2.4.5.2. Antioksidan Savunma	48
2.4.6. Ozonun Klinik Kullanım Yolları	49

2.4.6.1. Major Otohemoterapi	50
2.4.6.2. Minor Otohemoterapi	51
2.4.6.3. Topikal Ozon Uygulaması	51
2.4.6.4. Ozon gazı Enjeksiyonu	51
2.4.6.5. Rektal Uygulama	51
2.4.7. Ozon Tedavisinin Endikasyonları	52
2.4.8. Ozon Tedavisinin Kontrendikasyonları	53
3.GEREÇ VE YÖNTEM	54
4. BULGULAR	72
5. TARTIŞMA	85
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
ÖZET	106
ABSTRACT	107
KAYNAKLAR	108
EK-1	121
ÖZGEÇMİŞ	122

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

IL-11: İnterlökin 11

M-CSF: Makrofaj koloni stimüle edici faktör

° C: Santigrad derece(sıcaklık birimi)

BMP: Bone morfojenetik protein

MSCs: Mezenkimal kök hücreler

ASCs: Yağ dokusu kaynaklı kök hücreler

BMSCs: Kemik iliği kaynaklı kök hücreler

SVF: Stromal vasküler fraksiyon

PLGA: Poliglikolik asid

MR: Manyetik rezonans

PRP: Trombositten zengin plazma

CD 34+: Hematopoietik progenitör hücre antijeni

LLLT: Düşük doz lazer tedavisi

CaP: Kalsiyum fosfat

LOP: Lipid oksidatif ürünleri

ROS: Reaktif oksidan türleri

PUFA: Çoklu doymamış yağ asitleri

HO-1: Heme oksijenaz-1

GSH: Glutatyon

H₂O₂: Hidrojen peroksit

β -TCP: Beta trikalsiyum fosfat

HA: Hidroksiapatit

TGF- β : Transforming growth factor beta

RANK: Reseptör aktivator nükleer faktör kappa B

RANKL: Reseptör aktivator nükleer faktör kappa B ligandı

BMPs: Bone morfojenetik proteinler

BMP-2: Bone morfojenetik protein-2

BMP-7: Bone morfojenetik protein-7

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü

VEGF: Vascular endothelial growth factor

b-FGF: Basic fibroblast growth factor

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör

M-CSF: Makrofaj koloni uyarıcı faktör

TNF : Tümör nekroz faktör

e-PTFE: Genişletilmiş politetrafloroetilen

PTFE: Politetrafloroetilen

AKM: Anorganik kemik matriksi

CD: Cluster of differentiation

GFP: Green fluorescent protein

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Kemik hücrelerinin şematik görseli.....	7
Şekil 2: a. örgümsü (immatür) kemik, b. lameller (matür) kemik yapısı.....	11
Şekil 3: Uzun kemiğin endokonral kemikleşme aşamaları	13
Şekil 4: ASCs'in farklılaştığı hücreler	34
Şekil 5: Yağ dokusu kaynaklı stromal vasküler fraksiyon ve içeriği.....	37
Şekil 6: Oksijen molekülünün ozon molekülüne dönüşümü	42
Şekil 7: Ozonun organik ortamlardaki temel reaksiyonu.....	44
Şekil 8: Ozon tedavisinin metabolik etkileri.....	45
Şekil 9: Oksidatif stres ve oluşturduğu etkiler	48
Şekil 10: Çalışma akış şeması ve grupların tanımı.....	56
Şekil 11: Hematoksilen & Eozin ile boyanan kesitlerden elde edilen görüntüler üzerinde noktalı alan cetveli kullanılarak (A') Cavalieri yöntemi ile hacim hesabı yapıldı. P(a): bir noktanın temsil ettiği alan.....	68
Şekil 12: Stereoloji analizi sonuçlarına göre, yeni kemik hacmi.....	77
Şekil 13: Stereoloji sonuçlarına göre, bağ dokusu hacmi.....	78
Şekil 14: Stereoloji sonuçlarına göre, kapiller hacim.....	79

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1: Ozon enjektörü ve medikal ozon jeneratörü.....	59
Resim 2: Titanyum bariyer ve teflon kapak.....	61
Resim 3: N-butil-2 siyanoakrilat (Histoacryl®).....	61
Resim 4: Cerrahi bölgenin açılması, dekortikasyon yapılması.....	62
Resim 5: Bariyerlerin kafatasına, doku yapıştırıcısı olan NBSA ile sabitlenmesi.....	62
Resim 6: Kulak arterinden kan aspirasyonu.....	62
Resim 7: Greft ile kök hücrenin karıştırılması ve titanyum bariyerin içerisine uygulanması.....	63
Resim 8: Kök hücre ve SVF'nin uygulanması.....	63
Resim 9: Kanın ozonlanması ve ozonlanmış kanın greft ile karıştırılması işlemi.....	64
Resim 10: Rektal ozon uygulanması.....	64
Resim 11: Titanyum bariyerlerin açığa çıkartılması.....	65
Resim 12: Titanyum bariyerlerin çıkartılarak frez ile kemikten ayrılması.....	65
Resim 13: a: doku takip cihazı, b: mikrotom, c: etüv, d: hematoksilen & eozin boyama seti, e: kamera ataçmanlı mikroskop ve görüntüleme sistemi.....	68
Resim 14: 5 µm kalınlığındaki örnek kesitte RANKL pozitif hücreler beyaz ok ile gösterilmiştir. (Orijinal büyütme: x400).....	70
Resim 15: Kan, SVF-Kan ve Sistemik ozon-kan gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları siyah ok başı ile gösterilmiştir. Bar: 100 µm.....	72

- Resim 16:** SVF, SVF-sistemik ozon ve SVF-lokal ozon gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları siyah ok başı ile gösterilmiştir. Bar: 100 µm.....73
- Resim 17:** Kök hücre, kontrol, sistemik ozon ve lokal ozon gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları siyah ok başı ile gösterilmiştir. Ayrıca lokal ozon grubunda görülen bağ doku infiltrasyonu diğer gruplara kıyasla daha fazla göze çarpmaktadır. Ayrıca kök hücre grubunda görülen yağ doku oranı stereolojik sayım sonuçlarını destekler niteliktedir. Bar: 100 µm.....74
- Resim 18:** Kan, SVF-Kan ve Sistemik ozon-kan gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin ile boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları (*) ile gösterilirken damarlar beyaz ok ile gösterilmiştir. Yeni kemik alanı etrafında bulunan osteoblastik aktivite de dikkat çekmektedir. Barlar: 50 µm ve 200µm.....74
- Resim 19:** SVF, SVF-sistemik ozon ve SVF-lokal ozon gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin ile boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları (*) ile gösterilirken damarlar beyaz ok ile gösterilmiştir. Osteoblastlar, x40lık büyütmede çekilen görüntülerde yeni kemik çevresinde görülmektedir. Barlar: 50 µm ve 200µm.....75
- Resim 20:** Kök hücre, kontrol, sistemik ozon ve lokal ozon gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin ile boyalı kesitlerde yeni kemik alanı etrafında bulunan osteoblastik aktivite beyaz ok başı ile gösterilmiştir. Barlar: 50 µm ve 200µm.....75
- Resim 21:** Siyah ok; yeni kemik, Yıldız; damar, Dikdörtgen alan; infiltrasyon alanı, Kesik çizgili alan; sınır.....76
- Resim 22:** Gruplara ait anti-BMP-2 pozitif boyanan hücreler siyah ok ile gösterilmiştir. Bar: 10 µm, Orijinal büyütme: x400.....80
- Resim 23:** Gruplara ait anti-BMP-7 pozitif boyanan hücreler siyah ok ile gösterilmiştir. Bar: 10 µm, Orijinal büyütme: x400.....81
- Resim 24:** Gruplara ait anti-RANKL pozitif boyanan hücreler siyah ok ile gösterilmiştir. Bar: 10 µm, Orijinal büyütme: x400.....81
- Resim 25:** G: greft, M:maturasyon, YK: yeni kemik. Gruplara ait mature olan kemik alanları(hematoksilen eozin boyama, barlar: 200 µm ve 25 µm).....82

TABLolar DİZİNİ

Tablo 1: Geft verici bölgeleri ve kemik tipleri.....	16
Tablo 2: Biyomateryallerin tipine göre yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda kullanılan membranların sınıflandırılması.....	19
Tablo 3: Farklılaşabilme potansiyeline göre kök hücrelerin farklılaşma yönleri.....	27
Tablo 4: SVF hücre popülasyonu(%).....	38
Tablo 5: Reaktif ksijen türleri.....	46
Tablo 6: Metabolik ROS kaynakları.....	47
Tablo 7: Hücre içi ve hücre dışı antioksidanlar.....	49
Tablo 8: Medikal ozon uygulama yöntemleri.....	50
Tablo 9: Çalışma ve kontrol grubu tablosu.....	57
Tablo 10: Parafin takip protokolü.....	66
Tablo 11: Boyama protokolü.....	67
Tablo 12: Stereolojik değerlendirme sonuçları; Yeni kemik, Bağ dokusu ve Kapiller hacim değerleri.....	76
Tablo 13: Gruplara ait immünohistokimyasal boyama skorları.....	79
Tablo14: Kontrol ile çalışma gruplarındaki yeni kemik hacminin, One Way ANOVA analizi ile karşılaştırılması.....	83
Tablo 15: Kontrol ile çalışma gruplarındaki bağ dokusu hacminin, One Way ANOVA analizi ile karşılaştırılması.....	83
Tablo 16: Kontrol ile çalışma gruplarındaki kapiller hacmin, One Way ANOVA analizi ile karşılaştırılması.....	84

GİRİŞ

Kemik defektlerinin rejeneratif yöntemlerle onarımı, oral ve maksillofasiyal cerrahinin temel uğraşı alanlarından biridir. Çenelerdeki kemik defektlerine bağlı; diş hareketleri, diş kaybı, okluzyonun bozulması, estetik, fonksiyon ve fonasyon kaybı meydana gelebilir. Çenelerde yetersiz kemik seviyesi implant yerleştirilmesi için sınırlayıcı bir faktördür. Defekt onarımı için monokortikal onlay kemik greftleme, distraksiyon osteogenezi, sandviç osteotomi, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ayrıca, bu yöntemler ile otogreftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik biyomateryaller tercih edilmektedir. Defekt onarımı ameliyatlarında, otolog kemiğin kullanımı osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerinden dolayı altın standarttır. Ayrıca, osteojenik hücreler içerir ve immün cevap oluşturmaz. Otolog kemiğin kullanılmasının en önemli dezavantajı, greftin elde edilme yöntemidir. Bu nedenle alternatif yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Dental implant yerleştirebilmek için kemik hacmini arttırmada; allojenik kemik, demineralize kemik matriksleri, seramik ve polimer greft materyalleri gibi çeşitli biyomalzemeler kullanılır(1). Alloplastik ve sentetik bir greft materyali olan beta-trikalsiyum fosfat (β -TCP) otolog kemik greftine alternatif olarak en sık kullanılan biyomateryallerdendir. Sinüs tabanı yükseltilmesi üzerine yapılan bir meta-analiz sonucuna göre, β -TCP'nin otolog kemik greftinden sonra greft materyalleri arasında en fazla kemik hacmi artışı sağladığı tespit edilmiştir(2).

Kemik defektlerinin tedavi edilmesinde en güncel yaklaşımlardan birisi kemik doku mühendisliğidir. Kemik doku mühendisliğinde, biyoaktif moleküller ve kök hücrelerin kombinasyonu kullanılarak kemik dokusu üretilmesi üzerine çalışılmaktadır. Doku mühendisliğinde kullanılan kök hücre kaynakları, elde edilmek istenen dokunun özelliğine göre değişkenlik gösterir. Kök hücreler kaynağına göre ve farklanma kapasitesine göre sınıflandırılabilir. Elde edildiği kaynağına göre; embriyonik, fetal, kordon kanı, plasenta, amniyon sıvısı, erişkin ve mezenkimal kök hücreler olarak ayrılabilir. Ayrıca farklılaşma kapasitesine göre, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olabilir. Günümüzde, multipotent erişkin kök hücreler klinik olarak kullanılmaktadır(3). Yağ dokusu kaynaklı kök hücreler(ACs), 2001 yılında Zuk et al.(4) tarafından keşfedilmiştir. Yağ dokusu vücudun birçok bölgesinde bulunmaktadır ve kolayca elde edilebilir. Bu durum yetişkin kök hücre kaynağı olarak ASCs'i, kemik iliği kaynaklı kök hücrelere (BMSCs) cazip bir alternatif haline getirmektedir(5). Ayrıca, yağ dokusu kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin, hücre yüzey

işaretleri, farklı hücelere değişim potansiyelleri ve büyüme özellikleri kemik iliği kaynaklı kök hücelere benzerlik göstermektedir(6, 7). Buna ek olarak kemik iliği toplanması işlemi; pelviks kemiğinde ağrı, şişlik ve ödem gibi verici alan morbiditesine neden olabilir(8).

Son yıllarda, yağ dokusu, rejeneratif tıp alanında hücrenel bir kaynak haline gelmiştir (9, 10). Yağ dokusunun enzimatik sindiriminden elde edilen stromal vasküler fraksiyon (SVF); endotel öncüleri ve ASCs de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerini içerir(11). İn vitro ortamda ASCs, adipojenik, kondrojenik ve osteojenik hücelere doğru değişim kapasitesine sahiptir(12).

Kemik oluşumunun anjiyogeneze bağlı bir süreç olduğu bilinmektedir(13). Yapılan çalışmalarda osteoblast öncüllerinin, yeni kemiği oluşturmak için kan damarlarının endotel yüzeyini kullanabileceği gösterilmiştir(14, 15). SVF'deki endotel ve mezenşimal progenitör hücrelerin kültürde idamesinin doğal kemik yenilenmesini arttırdığı gösterilmiştir(16). Yumuşak dokuyu (17) ve kıkırdak dokuyu (18) yenileyebilme yeteneğine sahip olan SVF'nin, aynı zamanda kemik büyümesini de arttırdığı bildirilmiştir(19, 20). SVF içindeki multipotent hücreler iskele materyaline çok hızlı bağlanıp, hızla çoğaldığı ve osteojenik hücelere dönüşebildiği gösterilmiştir(21).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda SVF'nin damarsal özellikleri, ossifikasyon için gerekli vasküler ağı sentezleyebilir ve destekleyebilir (22, 23). Bu nedenle, taze uygulanan SVF'nin (24, 25) kemik rekonstrüksiyon potansiyeli, toplama kolaylığı ve istenilen miktarda elde edilebilmesi sayesinde ASCs ve BMSCs'ye alternatif olarak düşünülebilir.

Oksidatif stres kemik rejenerasyon sürecini etkileyen faktörlerden birisidir. Reaktif oksijen ve nitrojen türleri doku içerisinde, antioksidanlar tarafından etkisiz hale getirilmektedir. Aksi durumda, dokunun zarar görme ihtimali ortaya çıkar ve bu durum oksidatif stres olarak tanımlanır(26). Normal süreçte, antioksidanlar oluşan oksidatif stresi ortadan kaldırmak için serbest radikalleri etkisiz hale getirir. Ancak organizmanın zayıf düştüğü durumlarda dışarıdan antioksidan takviyesi yapılabilir(27)

Son zamanlarda kemik iyileşmesinin mekanizması ile ilgili birçok çalışma yapılmış olup, bu çalışmalarda kemik iyileşmesinin hızlandırılması amaçlanmıştır(28-30) Yardımcı tedavi yöntemlerinin; iyileşme dokusu(kallus) oluşturmak, yeniden şekillenmeyi(remodeling) ve mineralizasyonu(kalsifikasyon) arttırmak suretiyle kemik iyileşmesini hızlandırdığı düşünülmektedir(31, 32). Kemik iyileşmesini desteklemek ve iyileştirmek amacıyla çeşitli

biyomateryaller ve yöntemlerden faydanılmaktadır. Bunlardan birisi antioksidan özelliğe sahip ozon uygulamasıdır(33). Ozon; üç oksijen atomu içeren ve doğada gaz halinde bulunan bir moleküldür. Ayrıca; ozon dünyadaki en güçlü oksitleyici ajanlar arasında üçüncü sıradadır(34). Ozon, bağışıklık hücrelerinin çoğalmasını ve immünoglobulin sentezini uyararak hücrel ve humoral bağışıklık sistemini etkiler. Makrofaj aktivasyonunu ve mikroorganizmaların fagositozunu artırır. Ozon, enflamasyonu azaltır ve yara iyileşmesinde yararlı olan interlökinler, lökotrienler ve prostaglandinler gibi biyoaktif maddelerin sentezlenmesini sağlar(35). Literatürde ozonun kemik rejenerasyonu üzerine etkilerini araştıran birkaç çalışma bulunmaktadır (33, 36-38).

Bu tez çalışmasının tasarlanmasında 3 ana hipotez temel oluşturmaktadır. Bu hipotezler;

- 1-SVF, YKR bölgesine uygulandığında yeni kemik hacmi ve matürasyonu oluşturmada kök hücre kadar etkili olacaktır.
- 2- Ozon uygulaması, YKR bölgesinde kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ve daha matür kemik dokusu oluşmasını sağlayacaktır.
- 3- SVF ile ozonun birlikte uygulanması, sinerjistik etki sayesinde tek başına kullanımlarına ve kök hücre grubuna göre YKR bölgesinde daha fazla yeni kemik hacmi ve matür kemik oluşmasını sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.KEMİK DOKUSU

Kemik, kalsifiye olmuş hücre dışı materyal, kemik matriksi ve üç ana hücre tipinden oluşan özel bir bağ dokusudur. Kemik kesitleri incelendiğinde, kompakt kemik ve süngerimsi kemik olmak üzere iki tipi olduğu görülür. Uzun kemiklerde, dış silindirik kısım yoğun kompakt kemiktir. Kompakt kemiğin kemik iliğine komşu iç yüzeyi ise süngerimsi kemiktir. Yenidoğanlarda, uzun kemiklerin ilik boşlukları kırmızıdır ve kan hücreleri üretir. Yetişkinlerde ise, uzun kemiklerin ilik boşlukları normalde sarıdır ve yağ hücreleri ile doludur(39). Yetişkin iskeletinin temel bileşeni olan kemik dokusu, vücut için sağlam bir destek sağlar, kafa ve göğüs boşluklarındaki hayati organları korur. Ayrıca kemik dokusu vücut sıvılarındaki konsantrasyonu korumak için kontrollü olarak salınabilen veya depolanabilen kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlar için depo görevi yapmaktadır. Bunlara ek olarak iskelet kasları ile birlikte vücudun hareket etmesini sağlar. Dolayısıyla kalsifiye olmuş kemik dokusu, iskelete mekanik ve metabolik işlevler kazandırır(40)

2.1.1 Kemik Dokusu Hücreleri

2.1.1.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar, tip I kollajen lifleri, glikoproteinler ve osteonektin gibi kemik matriksinin organik bileşenlerini sentezleyip salgırlar(Şekil 5). Ayrıca osteoblastlar kemikteki inorganik bileşenlerin birikimini etkiler. Olgun osteoblastlar genellikle yan yana dizilmiş şekilde kemik matriks yüzeylerinde bulunur. Aktif matriks sentezi sırasında, osteoblastlar kübik ya da

silindirik şekilli ve bazofilik sitoplazmaya sahiptir(41). Sentezleme aktiviteleri azaldığında osteoblastlar düzleşmeye başlar ve bazofilik özellikleri azalır. Endosteum ve periosteumdaki kemik astar hücrelerini aktif olmayan osteoblastlar oluşturur(40). Osteoblastlar ile mevcut kemik yüzeyi arasında osteoid olarak adlandırılan yeni kemik sentezlenir. Bu osteoid tabaka, henüz tam anlamı ile kalsifiye olmamıştır. Bu apozisyonel kemik büyüme süreci, kalsiyum tuzlarının yeni oluşan matrikse çökmesi ile tamamlanır(39).

2.1.1.2. Osteositler

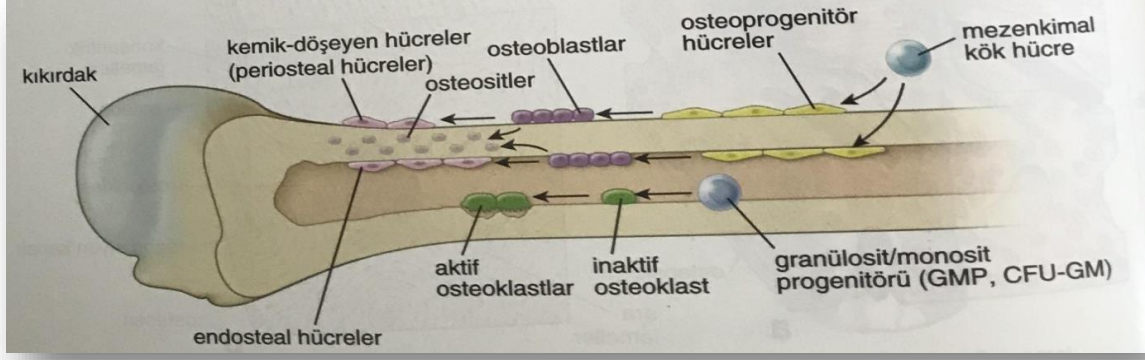
Birçok osteoblast, zamanla salgıladıkları osteoid tabaka ile kuşatılır ve mineralize matriks boyunca düzenli ve aralıklı olarak laküna adı verilen boşluklar içerisinde yerleşerek osteosit adını alırlar. Osteoblastlardan osteositlere geçen hücreler dendritik uzantı olarak adlandırılan, birçok hücresel uzantı oluşturur. Her lakünada 250-300 nm çaplı birçok hücresel uzantı bulunur. Osteositler ile kan damarları arasındaki metabolitlerin difüzyonu, kemik matriksi ile hücresel uzantılar arasındaki hücre dışı sıvılar yoluyla gerçekleşir(40). Osteositler osteoblastlarla karşılaştırıldığında, daha az granüllü endoplazmik retikulum, daha küçük golgi cisimcikleri ve daha yoğun nükleer kromatin yapı bulundurur(40, 41). Osteositler osteoblastlardan farklı bir dizi gen dizilimine sahiptir. Ayrıca, osteositler sklerostin proteini ve bazı sitokinler salgılayarak ile kemiğin yeniden şekillenmesini düzenler. Bu hücreler, kemik matriksini korur ve hızlı matriks rezorpsiyonu ölümlerine sebep olur. Osteositler geniş laküner ve kanaliküler ağ ile diğer tüm kemik hücreleriyle bağlantılar yapar. Bu sayede kalsiyum dengesini sağlar ve yeniden şekillenme sırasında kemik üzerindeki mekanik streslerin belirlenmesi için sensör vazifesi görürler(40).

2.1.1.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar kemik iliği kaynaklı hücrelerin birleşmesiyle meydana gelir. Osteoklastlar, çok çekirdekli, çok hareketli hücrelerdir ve kemik büyümesi, yeniden şekillenme sırasında matriks rezorpsiyonunda önemli bir rol oynamaktadır(40, 41).(Şekil 5) Osteoklast gelişimi için osteoblastlar tarafından iki polipeptit sentezlenmesi gerekir. Bunlar; makrofaj koloni uyarıcı faktör(M-CSF) ve reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B ligandı (RANKL). Reseptör aktivatör nükleer faktör kappa B (RANK), tümör nekroz faktör (TNF) reseptör süper ailesinin bir üyesidir. RANK' ın RANKL ile bağlanması hematopoetik monosit/makrofaj öncül hücrelerden osteoklastların farklılaşmasına (osteoklastogenez) ve olgun osteoklastların aktivasyonuna yol açar(39).

Aktif osteoklastların, kemik matriksine bakan yüzeylerinde düzensiz katlantılar oluşur. Bu katlantı bölgesinde aktin filamentler yoğun olarak bulunur. Bu çevresel yapışma bölgesi, osteoklast ile kemik rezorpsiyonu meydana gelen matriks arasında bir mikro çevre oluşturur. Osteoklastlar bu subselüler cebe, kollajenaz, katepsin K ve diğer enzimleri salgılar. Ayrıca, HA'nın çözünmesi ve matriks proteinlerinin sindirimini arttırmak için proton pompalayarak lokal olarak asidik bir ortam oluşturur(40). Osteoklastlar, Howship laküneri olarak adlandırılan rezorpsiyona uğrayan kemik alanlarında ve matriks içerisinde enzimatik olarak boşluklar içinde bulunur(39)

Osteoklast aktivitesi lokal faktörler ve hormonlar tarafından kontrol edilir. Osteoklastlar tiroid hormonu olan kalsitonine ait reseptörler bulundurulur. Paratiroid hormon ile aktive olan osteoblastlar, osteoklastların oluşumunu ve aktivitesini düzenleyen M-CSF, RANKL ve diğer faktörleri üretir(40).



Şekil 1: Kemik hücrelerinin şematik görseli(42)

2.1.2. Kemik Matriksi

2.1.2.1 İnorganik Matriks

İnorganik madde, kemik matriksinin kuru ağırlığının yaklaşık % 50' sini oluşturur. İnorganik matriksin içeriğinde en fazla kalsiyum HA bulunur, bunun yanı sıra bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum iyonları da bulunur. Önemli miktarlarda amorf (kristal olmayan) kalsiyum fosfat da mevcuttur. HA kristali etrafındaki su tabakası, mineral ve vücut sıvıları arasında iyon değişimini kolaylaştırır. Kalın kollajen fiberlerin HA kristalleri ile birleşmesi, kemiğin sertliğini ve dayanıklılığını sağlar. Ek olarak, paratiroid bezinden salınan paratiroid hormonu ve tiroid bezinden salınan kalsitonin hormonlarının etkisi ile kandaki ideal mineral dengesi sağlanır(39).

2.1.2.2. Organik Matriks

Kalsifiye olmuş matrikse gömülü olan organik madde, tip I kollajen, proteoglikan ve osteonektin gibi yapışkan glikoproteinleri içerir. Özellikle osteonektin, osteokalsin gibi kalsiyum bağlayıcı glikoproteinler ve osteoblastlar tarafından matriks veziküllerinden salınan fosfatazlar matriks mineralizasyonunda önemli rol oynar. Tip I kollajen içeren diğer dokular osteokalsin veya matriks vezikülleri içermez ve normalde kireçlenmezler. (40). Diğer bir matriks proteini olan sialoprotein, osteoblastları plazma membran proteinlerin integrinleri vasıtasıyla hücre dışı matrikse bağlar(39).

2.1.3. Periosteum ve Endosteum

Kemik dış ve iç yüzeyleri sırasıyla periosteum ve endosteum olarak adlandırılan kemik yapımında önemli rolü olan doku katmanları ile örtülüdür.(Şekil 5) Periostun, dış tabakasında yoğun bağ dokusu, küçük kan damarları, kollajen demetleri ve fibroblastlar yer alır. Sharpey lifleri olarak adlandırılan periosteum kollajen lif demetleri, kemik matriksine nüfuz eder ve periosteumu kemiğe bağlar. Osteoblastlar ve osteoprogenitör hücreler bulunduran periosteumun iç bölgesi daha hücreli bir katmandır. Osteoprogenitor hücreler çoğalma ve osteoblastlara dönüşme potansiyeli ile kemik büyümesinde ve kemik onarımında önemli rol oynamaktadır. Periosteumun temel fonksiyonları; kemik dokusunu beslemek, apozisyonel kemik büyümesi veya onarımı için sürekli yeni bir osteoblast kaynağı sağlamaktır. İç kısımda çok ince bir katman olan endosteum, kemik trabeküllerini ve kemik iliği boşluklarını örter. Endosteum, periosteumdan oldukça ince olmasına rağmen, osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve kemik astar hücreleri içerir(39, 41).

2.1.4. Kemik Tipleri

Kemik yapısı makroskopik olarak incelendiğinde, yüzeyde kompakt (kortikal) kemik ve daha derinde süngerimsi kemik olduğu görülür(40). Uzun kemiklerde bulunan epifizyal plak, ince bir kompakt kemik tabakası ile örtülü süngerimsi kemikten oluşur(Şekil 3). Diyafiz adı verilen silindirik kısım, neredeyse tamamen kompakt kemikten oluşur ve kemik iliğinin etrafındaki iç yüzeyde ince bir süngerimsi kemik alanı vardır. Bilek ve ayak bileği gibi kısa kemikler genellikle kompakt kemik ile tamamen sarılmış süngerimsi kemik çekirdeğine sahiptir. Kalvaryumu oluşturan düz kemikler, diploe adı verilen daha kalın bir süngerimsi kemik tabakası ile ayrılmış iki kompakt kemik tabakasına sahiptir. Kemik dokusunun mikroskopik muayenesinde iki tipi vardır: lamellar(matür) kemik ve örgümsü(immatür) kemik(40, 41).

2.1.4.1. Lameller Kemik

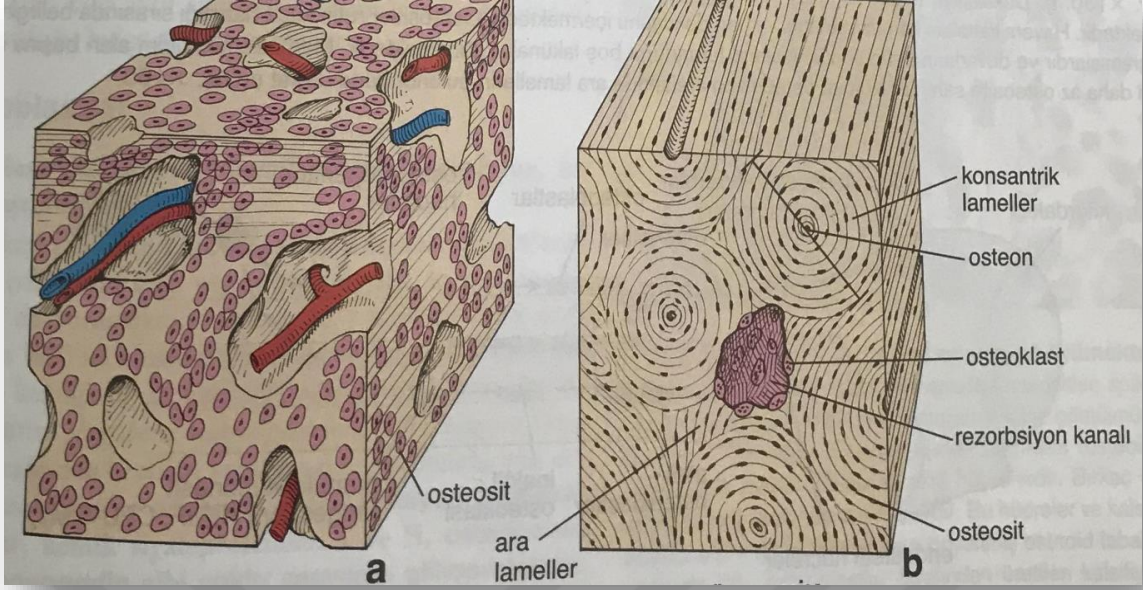
Yetişkinlerde, kompakt veya kansellöz olan çoğu kemik, her biri 3-7 µm kalınlığında kalsifiye olmuş, çok tabakalı lamellar yapıdadır. Lameller birbirine paralel veya merkezi kanalın çevresinde yoğunlaşmış olarak bulunur. Her lamelde, tip I kollajen lifler paralel olarak uzanır ve liflerin yönü ardışık tabakalarda ortogonal (yaklaşık 90 derece) olarak bulunur. Havers sistemi(osteon), kan damarları, sinirler, gevşek bağ dokusu ve endosteum içeren küçük merkezi kanalı çevreleyen ortak merkezli ince lameller kompleksidir. Her birinde bir osteosit bulunan lakünalar, dendritik uzantılar içeren kanaliküler ile birbirine bağlanır(41). Hücre uzantıları, bağlantı kanalları(gap junction) yoluyla temas halindedir ve bir osteonun tüm hücreleri, merkezi kanaldaki mikrodamar sisteminden besin ve oksijen desteği alır. Havers sisteminin(osteon), dış sınırı, sement hattı olarak adlandırılan kollajen bakımından daha zengin bir katmandır. Merkez kanallar, kemik iliği boşluklarıyla ve periosteumla bağlantısını birbirine çapraz uzanan Volkmann kanalları ile sağlar (40).

Sağlam kemiklerde dağınık olarak interstisyel lameller denilen, düzensiz şekilli paralel lamel grupları bulunur. Bu yapılar, osteonların, osteoklastlar tarafından kemik büyümesi ve

yeniden şekillenmesi sırasında kısmen tahrip edilmesi sonucu kalan lamellerdir. Kemik remodelingi yaşam boyu devam eder ve kemik yıkımı ve yapımı aynı anda gerçekleşir(40). Kompakt kemikte, yeniden şekillenme sırasında, eski osteon parçaları absorbe edilir ve yenileri üretilir. Rezorpsiyon, osteoklastların hareketlerini içerir ve osteoklastlar çoğunlukla tünel benzeri boşluklarda eski kemiğin rezorpsiyonu için gruplar halinde çalışırlar. Bu tür tüneller, endosteum veya periosteumdan gelen birçok osteoprogenitör hücreler ve filizlenen kılcal damarlar tarafından hızla doldurulur. Osteoblastlar gelişir, tünellerin duvarına sıralanır ve kemikteki konsantrik tabakayı oluşturan osteoidi kendilerini kuşatacak şekilde salgılamaya başlar. Sağlıklı erişkin bireylerde kemik dokuda yıllık % 5 -10 oranında yenilenme (turn over) meydana gelir.(39, 40)

2.1.4.2. Örgümsü (İmmatür) Kemik

Lameller yapıda olmayan örgümsü kemik tip I kollajen liflerin rastgele dizilmesi ile meydana gelir. Embriyonik gelişimde ve kırık onarımında görünen ilk kemik dokusudur. Örgümsü kemik genellikle geçicidir ve erişkinlerde lameller kemik ile yer değiştirir. Yetişkinlerde, kalvaryumun sutura bölgelerinde, tendonların kemiğe giriş yerlerinde ve oral bölgedeki alveol soketlerde örgümsü kemik bulunur. Alveol soketlerde bulunması sayesinde ortodontik tedavideki diş hareketleri sağlanabilir. İmmatür kemik, fetüs dönemi dışında yetişkinlerde kemiğin yeniden şekillendirildiği alanlarda da bulunur. Düzensiz, iç içe geçmiş kollajen lif dizisine ek olarak, bu tür kemiklerin mineral içeriği düşüktür (x-ışınları tarafından daha kolay nüfuz eder) ve lamellar(matür) kemiğe oranla birim alandaki hücre sayısı daha fazladır(40, 41). Bu özellikler örgümsü(immatür) kemiklerin daha hızlı üretildiğini, ancak lameller kemikten daha az mukavemeti olduğunu göstermektedir. İmmatür kemik matriksi, matür kemiğin matriksine göre daha çok ara madde bulundurur. İmmatür ve matür kemik matrikslerinin boyanma karakterleri farklıdır. İmmatür kemik matriksi hematoksilin ile matür kemiğin matriksi eozin ile daha yoğun boyanır(40).



Şekil 2: a. örgümsü (immatür) kemik, b. lameller (matür) kemik yapısı(42)

2.1.5. Kemikleşme (Osteogenesis)

Kemik gelişimi veya osteogenesis süreci iki farklı şekilde oluşur:

- İntramembranöz kemikleşme; osteoblastlar doğrudan mezenkimden farklılaşır ve osteoid salgılamaya başlar.
- Endokondral kemikleşme; hyalin kıkırdığın matriksi aşındırılır, osteoblastlar tarafından işgal edilir ve osteoid üretimine başlanır(40).

Kemikleşme tipi isimleri, başlangıçta kemiğin oluştuğu mekanizmalara atıfta bulunur; Her iki süreçte de ilk ortaya çıkan kemik dokusu örgümsü(woven) kemiktir ve kısa süre içinde daha güçlü lameller kemik ile yer değiştirir. Tüm kemiklerin büyümesi sırasında örgü (woven) kemik alanları, kemik rezorpsiyon alanları ve lameller kemik alanları birbirine bitişik olarak bulunur(39, 40).

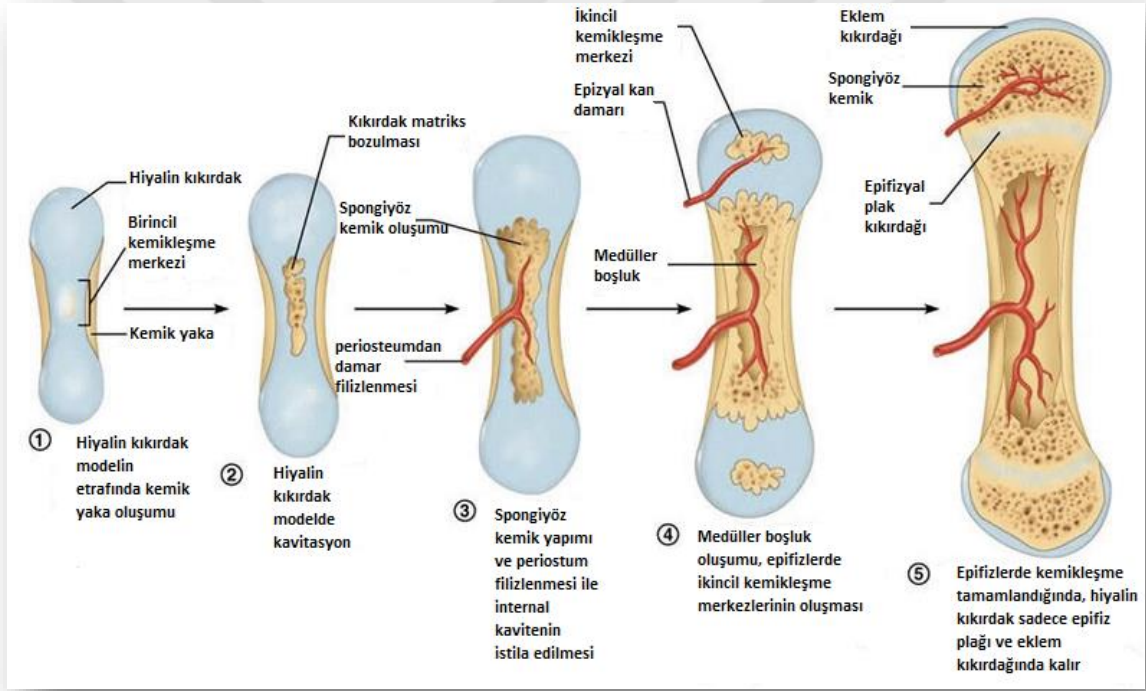
2.1.5.1.İntramembranöz Kemikleşme

Embriyonik mezenkimal dokunun yoğunlaşması membranlar içinde gerçekleştiği için intramembranöz kemikleşme olarak adlandırılmıştır. Vücuttaki birçok yassı kemik, intramembranöz kemikleşme ile oluşur. Kafatasının frontal ve parietal kemiklerinin yanı sıra oksipital ve temporal kemiklerin bazı parçaları ile mandibula ve maksilla intramembranöz kemikleşme ile oluşur. Mezenkim tabakasının yoğunlaştığı bölgelerde, kemik oluşumunun başlangıç noktalarına kemikleşme merkezleri adı verilir. Bu alanlarda mezenşimal hücreler osteoprogenitör hücrelere farklılaşır, çoğalır ve geliştirmekte olan kılcak damar ağının etrafında osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar, kan damarları yüzeyi boyunca, osteoid bileşenlerini salgılar ve örgümsü(woven) kemik trabekülleri oluşturur. Matriks lakünası içinde farklılaşan osteositler, kanaliküller içerisindeki ince sitoplazmik uzantıları vasıtasıyla hücreler arası iletişimlerini sağlar. Salınımı devam eden matriksin kalsifikasyonu ve sonrasında meydana gelen trabeküler büyüme sayesinde komşu ossifikasyon merkezlerinin kaynaşması gerçekleşir. Kemik iliği ve daha büyük kan damarları, kansellöz kemiği çevreleyecek şekilde kompakt kemik katmanlarını oluşturur(40). Kafatası yassı kemiklerinde, hem iç hem de dış yüzeylerde meydana gelen kemik oluşumu, kemik rezorpsiyonundan baskındır. Böylece orta bölüm (diploe), süngerimsi yapısını korurken, iki kompakt kemik tabakası (iç ve dış plaklar) ortaya çıkar. Yenidoğan bebeklerin kafa kemikleri arasında fontanella(bıngıldak) veya "yumuşak alanlar", henüz kemikleşmemiş olan bağ doku alanlarıdır(39).

2.1.5.2. Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme başlangıcında, hiyalin kıkırdaktan minyatür bir model oluşturulur ve bunu takip eden süreçte kıkırdak modelin yerini kemik doku alır. Başta uzun kemikler olmak üzere vücuttaki birçok kemik, endokondral kemikleşme ile oluşur.(şekil 6) İlk kemik dokusu, kıkırdak modelinin diyafizini çevreleyen bir yaka olarak görülür.(39) Bu kemik yaka, perikondriumda oluşan osteoblastlar tarafından üretilir. Yaka, dejeneratif değişiklikleri teşvik etmenin yanı sıra oksijen ve besin maddelerinin alttaki kıkırdağa

difüzyonunu engeller. Kondrositler alkalin fosfataz üretmeye başlar ve lakünalarını genişleterek şişirirler(hipertrofi). Bu değişiklikler matriksi dar trabeküller haline sıkıştırmakta ve bu yapılar da kemikleşmeye neden olmaktadır. Kondrositlerin ölümü ile kıkırdak kalıntılarında oluşan gözenekli bir yapı oluşur ve bu kıkırdak kalıntıları osteoblast tabakası ile kaplanır. Daha sonra periosteum adını alacak perikondriumdaki kan damarları kemik yakasından nüfuz ederek osteoprogenitor hücreleri gözenekli merkez bölgesine getirir. Daha sonra osteoblastlar kıkırdak matriksin kalıntılarına bağlanır ve örgümsü(woven) kemik üretir. Bu aşamadaki kalsifiye olmuş kıkırdak, bazofilik görünür ve yeni kemik daha asidofiliktir(40).



Şekil 3: Uzun kemiğin endokondral kemikleşme aşamaları(43)

Diyafizdeki bu süreçte, hamileliğin ilk üç ayı kadar erken dönemde başlayarak birçok kemikte birincil ossifikasyon merkezi oluşur. İkincil ossifikasyon merkezleri daha sonra kıkırdak modelinin epifizinde görülür ve benzer şekilde gelişir. Büyüme ve yeniden şekillenme(remodeling) sırasında, birincil ve ikincil kemikleşme merkezleri, yavaş yavaş kemik iliği ve süngerimsi kemik trabekülleri ile dolu boşluklar üretir(şekil 5).

Sonuç olarak hiyalin kıkırdak model iki bölge hariç tamamen kemikleşir;

- Eklem içini örten kıkırdak tabakası,
- Epifizi diyafizle birleştiren, büyüme plağı olarak da bilinen, epifizyal kıkırdak tabakası(39)

Özetle kemik uzunluğunda artış, epifiz plağındaki kondrositlerin çoğalmasıyla oluşur. Bununla birlikte, diyafizdeki kondrosit matriksi kireçleşir ve hücreler ölür. Osteoblastlar, kalsifiye olmuş kıkırdak matriksi üzerinde yeni bir tabaka oluşturur. Bu iki karşıt olay (proliferasyon ve destrüksiyon) yaklaşık olarak eşit olduğundan, epifiz plağı kalınlığı değişmez. Bunun yerine, diyafizden uzaklaşarak kemiğin uzunluğu büyümektedir(40). (Şekil 5)

2.1.6. Kemik Büyümesi, Remodeling ve Onarımı

Kemik dokuda hayat boyu devam eden döngü, daha önce oluşturulmuş kemik dokusunun kısmen rezorpsiyonunun yanı sıra yeni kemik yapımını içerir. Büyüyen bir kemikte osteoblast ve osteoklast aktivitelerinin toplamı, kemik şekillenmesi sürecini oluşturur. Kemik şekillenmesi sırasında, kütlede artış meydana gelmesine rağmen kemiğin genel şekli korunur(41). Kemik döngü hızı, küçük çocuklarda yetişkinlerden 200 kat daha fazladır. Yetişkinlik döneminde de osteoblastlar ve osteoklastlar koordineli olarak kemikte yapım ve yıkım faaliyetlerini devam ettirirler(40).

Kemik dokusu, sertliğine rağmen plastisiteye ve değişen stres karşısında içyapısını değiştirebilme yeteneğine sahiptir. Kemik plastisitesinin en iyi bilinen örneği, çene kemiğinde ortodontik kuvvet uygulanması ile diş pozisyonlarının değiştirilebilmesidir. Gerilim uygulanan tarafta kemik yapımı, basınç uygulanan tarafta kemik yıkımı oluşmaktadır. Bu şekilde, dişler çene boyunca hareket ederken kemik yeniden şekillenir. Kafa kemiklerinin büyümesi, suturalar ile dış kemik yüzeyi arasındaki periosteum tarafından kemik dokusunun oluşması ile meydana gelir. Aynı zamanda, iç yüzeyde rezorpsiyon gerçekleşir. Kemiklerin esnekliği, beynin büyümesine ve böylece yeterli boyutta bir kafatası oluşmasına izin verir. Periosteum, endosteum ve kemik iliği osteoprogenitör kök hücre içeriği ve yüksek

vaskülarizasyonu sayesinde, kemik dokusu onarımında mükemmel bir kabiliyete sahiptir. Kemik kırıklarının ve diğer hasarların onarımı; hücreler, sinyal molekülleri ve kemik şekillenmesinde etkin olan mekanizmalar ile gerçekleşir. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu amacıyla cerrahi olarak oluşturulan kemik boşlukları, sağlıklı periosteal doku varlığında yeni kemikle doldurulabilir(40).

2.1.7. Ağız, Diş ve Çene Cerrahisinde Kemik Ogmentasyon Uygulamaları

2.1.7.1. Monokortikal Onlay Kemik Greftleri

Yetersiz alveol kretler, kortikal ve süngerimsi otojen kemikten oluşan onlay greftler kullanılarak başarılı bir şekilde ogmente edilebilir. Greft kökeninin endokondral veya membranöz olmasının ogmentasyon başarısına etkisi tartışma konusudur. Otojen greftler ağız içi ve ağız dışı bölgelerden elde edilebilir(44)(Tablo 5). Hayvan modelleri kullanılan bir çalışmada membranöz kemiğin, endokondral greftlere kıyasla (tavşanlarda %65-% 19,5 maymunlarda% 88 - % 17,2) rezorpsiyona daha dirençli olduğu gösterilmiştir(45). Bu çalışmanın sonuçlarında membranöz kemiğin üstün iyileşme ve boyutunu koruma kapasitesine sahip olduğunu rapor edilmiştir(45). Kortikokansellöz blok greftler, kortikal bileşeni ile alıcı bölgeye anında yapısal destek sağlarken, süngerimsi bileşeni ile greftin daha hızlı yeniden damarlanmasını sağlar. Böylece greft rezorpsiyonunu sınırlandırır. Ayrıca, blok greftler kullanılarak bariyer membrana ihtiyaç duyulmaksızın, büyük defektler tedavi edilebilir. Membrana ihtiyaç duyulmama sebebi; grefte desteklik sağlayan kortikal kemik bileşenidir. Blok greftteki kortikal kemik yetersizliği, rezorpsiyonu artırır ve yeniden damarlanmayı azaltır(46).

Tablo 1: Geft verici bölgeleri ve kemik tipleri(44)

<i>Verici Bölge</i>	<i>Kemik Tipi</i>
Mandibular simfiz	Kortikokansellöz
Mandibular ramus	Kortikokansellöz
Koronoid çıkıntı	Kortikal
Zigomatik çıkıntı	Kortikal
Maksiller tüber	Kortikokansellöz
Maksiller torus	Kortikokansellöz
Mandibular torus	Kortikokansellöz
Kalvaryum	Kortikal
Klavikula	Koritkal
İliak	Kortikokansellöz
Fibula	Kortikokansellöz
Kosta	Kortikokansellöz

2.1.7.2. Distraksiyon Osteogenezisi

Gavril Ilizarov distraksiyon osteogenezini tanımlamış ve geliştirmiştir(47). Distraksiyon osteogenezisi, başlangıçta uzun kemiklerin boyunun arttırılmasında kullanılmıştır. Günümüzde implant yerleşimi öncesinde mevcut kemik hacminin arttırılması için de uygulanmaktadır(48). Distraksiyon osteogenezisi aşamaları; latent faz, distraksiyon fazı ve konsolidasyon(pekiştirme) fazıdır. Latent faz cerrahi sonrası kuvvet uygulanmayan 7 günlük bekleme aşamasıdır. Distraksiyon fazı, kuvvet uygulanarak kemik uçlarının, günlük 1 mm birbirinden uzaklaştırıldığı aşamadır. Daha sonra, kemik plakları arasındaki boşluğun rejenere kemik ile dolduğu konsolidasyon(pekiştirme) fazı gerçekleşmektedir. Konsolidasyon evresinin uzunluğu boşluğun büyüklüğüne bağlıdır ve oluşturulan her 1 mm için 5 gün gereklidir(49).

Bu teknik sadece, anatomik yapıların üzerinde 6-7 mm kemik yapısı bulunan oral bölgelerde kullanılabilir(48). Distraksiyon osteogenezisi hakkında literatürde yer alan hayvan

çalışmalarında, distraksiyon osteogenezinin kemik boyutunu vertikal olarak 9 mm'ye kadar arttırdığı gösterilmiştir. Histolojik incelemelerde bu yöntem ile sağlıklı yeni kemiğin oluştuğu rapor edilmiştir(50, 51).

2.1.7.3. Sandviç Osteotomi (İnterpozisyonel Greft Uygulaması)

Schettler et al.(52) tarafından 1976'da atrofik mandibularların ogmentasyonu için tanımlanmış bir yöntemdir. Başlangıçta anterior bölgenin ogmentasyonu için önerilmiş, ancak son zamanlarda posterior atrofik mandibulada tedavisi için de başarılı şekilde uygulanmaktadır(53, 54). Bu yöntem ile mandibuların osteotomize edilen segmentinin koronal olarak yükseltilmesinden sonra elde edilen boşluğa blok kemik grefti yerleştirilir. Yükseltilecek kemik segmenti, lingual tarafta periosteumdan ayrılmaz ve böylece kemik greftinin yeniden şekillendirilmesi için yeterli kan akımı sağlanır(55, 56). Koronal segment, bazal kemiğe 2.0 mm' lik mini plaklar ve vida kullanılarak sabitlenir(56).

Sandviç tekniği, inferior alveolar sinire paralel olarak gerçekleştirilen yatay bir osteotominin uygulanmasını gerektirir. Sandviç osteotomi yöntemi; genellikle mandibular atrofik posterior bölgede uygulandığı için yükseltilecek segment mandibular kanalın güvenliği için çok ince olabilir. Bu belirgin atrofik durumlarda, fiksasyon sırasında çok ince olan koronal segmentin kırılma riski vardır(57). Bu nedenle, yükseltilecek segmentin yeterli kalınlığa sahip olması önemlidir. Sonuç olarak, sandviç osteotominin uygulanabilmesi için mandibular kanalın üzerinde en az 6 mm alveol kemik yüksekliği olması tavsiye edilmektedir. Böylece, hem yükseltilecek segmentin yeterli kalınlıkta olması hem de osteotomi hattının alveol sinirden uzakta kalması sağlanabilecektir(53).

2.1.7.4. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu rezorbe olabilen veya olmayan bariyer membranlar kullanılarak hızlı çoğalan epitel ve bağ dokusu hücrelerini uzaklaştırarak yavaş çoğalan kemik hücrelerinin büyümesini teşvik etme prensibine dayanmaktadır(58). İlk kez 1980'lerin başında Nyman ve Gottlow tarafından genişletilmiş politetrafloroetilen(e-PTFE) bariyer membran kullanılarak tanımlanmıştır(59, 60). Ağız içindeki iyileşme sürecinin ilk aşaması sırasında, dört farklı doku hücresi arasında rekabet vardır: (1) dişeti dokusu; (2) periodontal bağlar; (3) bağ dokusu; (4) sement. Bunların arasında, gingival epitel hücrelerinin ulaştığı 0.5 mm/gün büyüme oranı diğer üç hücre tipinden önemli ölçüde daha fazladır. Bu nedenle, periodontal kemik defekti sonunda uzun bağlantı epiteli ile birleşir.(61)

YKR işlemlerinden sonra, belirli olaylar dizisinden sonra kemik rejenerasyonu gelişir. Bu sürece bakıldığında, ilk 24 saat içerisinde bariyer membran ile oluşturulan boşluk kan pıhtısı ile dolar. Daha sonra kan pıhtısından nötrofilleri ve makrofajları çekmek için büyüme faktörleri (örneğin trombosit kaynaklı büyüme faktörü) ve sitokinler (örneğin interlökin-8) serbest bırakılır. Oluşturulan boşlukta önce süngerimsi kemikten bir çatı oluşturulur. Daha sonra bu yapının mineralizasyonu ile lameller kemik oluşur. Bu başlangıç yapının değişimi kompakt ve süngerimsi kemiğin bulunduğu olgun kemik dokusu oluşana kadar devam eder. Bu olaylar cerrahiden sonra yaklaşık 3-4 ay sürer(62).

2.1.7.4.1. Bariyer Membranlar

YKR de bariyer membran tedavinin temel unsurudur. Günümüze kadar farklı malzemeler ve modifikasyonlar kullanılmıştır(Tablo 1). YKR için kullanılan bariyerden beklenen özellikler; biyouyumluluk, konak dokulara entegre olabilmesi, klinik kullanım kolaylığı, boşluk oluşturabilme özelliği, yeterli mekanik ve fiziksel özellikte olmasıdır(62).

Birinci nesil bariyer membranları temel olarak PTFE ve e-PTFE oluşturmaktadır. Genel olarak bu membranlar biyouyumluluk ve boşluk oluşturma özelliği gösterirler. Fakat bu

membranlar rezorbe olmadıklarından ikinci bir cerrahi yapılması gerekmektedir. Daha sonra ikinci nesil olarak rezorbe olabilen membranlar geliştirilmiştir. Bu membranların da çeşitli avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır(58).(Tablo 1)

Tablo 2: Biyomateryallerin tipine göre YKR için kullanılan membranların sınıflandırılması(58).

<i>Membran Grupları/Materyaller</i>	<i>Temel Avantaj</i>	<i>Temel Dezavantaj</i>
Sentetik polimerler/ Politetrafloroetilen	Biyolojik sistemde inert ve kararlı polimer	Rezorbe olmaması
Alifatik polyesterler/ polilaktik asid, poliglikolik asit, polikaprolakton	Biyoemilim, işlenebilirlik, kullanım kolaylığı ve ilaç kapsülleme	Yetersiz sertlik ve stabilizasyon
Doğal polimerler/ Sığır, domuz ve insan kaynaklı kollajen ve hücre dışı matrisler, Kitosan,Alginat	Biyoemilim, düşük immün cevap, İlaç kapsüle edebilme özelliği, biyolojik bileşenlerin bir araya getirilmesi	Yetersiz sertlik ve stabilizasyon
Metaller/ Titanyum ve titanyum alaşımları Kobalt-krom alaşımları	Yüksek dayanıklılık, şekil alabilme yeteneği	Rezorbe olmaması
İnorganik bileşikler/ Kalsiyum sülfat, Kalsiyum fostat	Biyoemilim, osteokondüktif olması	Düşük dayanıklılık, düşük şekil alabilme yeteneği

Klinik açıdan, YKR sonucunun tahmin edilmesi zordur. Başarılı YKR için, epitelyum ve bağ dokusunun defekt bölgesinden uzak tutulması, boşluk oluşturulması, fibrin pıhtının stabilizasyonu ve açıklık kalmayacak şekilde cerrahi alanın kapatılması şeklindeki dört ilkeye uyulması gerekir(63).

2.1.7.4.1.1.Titanyum Bariyerler

YKR membranları, ortadan şiddetliye kadar kemik defektlerin tedavisinde kullanılabilir. Bariyerin doğal fiziksel özelliğine bağlı olarak ve yumuşak dokuların basıncıyla membran defekte doğru çökme meydana gelebilir, bu durum oluşan yeni kemik miktarını öngörülemez hale getirir(62, 64). Titanyum bariyerin temel avantajları; YKR alanını korur, esnektir ve bükülebilir. Kemik rejenerasyonuna yardımcı olabilmesi için şekillendirilebilir ve uyarlanabilir. Ayrıca oral dokularla biyolojik olarak uyumludur(62). Sert titanyum bariyer ile YKR, birçok in vivo çalışmada kemik dokusunu güçlendirmek için başarıyla kullanılmıştır. YKR bölgesinde kortikal kemik perforasyonu oluşturulmasının anjiyojenik ve osteoblastik hücrelerin kapalı alana hareket etmesini sağladığı rapor edilmiştir(65-69).

2.1.7.4.2. Greft Materyalleri

Kemik rejenerasyonu üç farklı mekanizma ile gerçekleştirilebilir: osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon. Osteogenez, lokal diferansiye olmamış mezenkimal kök hücrelerin(MSCs) olmadığı durumlarda bile kemiğin oluşması ve gelişmesidir. Osteoindüksiyon, sadece canlı kemikte bulunan büyüme faktörleri yoluyla, farklılaşmamış MSCs'in osteoblast veya kondroblastlara dönüşümüdür. Osteokondüksiyon ise, yeni kemiğin oluşması ve mezenkimal hücrelerin greft üzerinde çoğalması için biyolojik iskele sağlanmasıdır(45).

Kemik greft materyalleri otogreftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik greftler olarak sınıflandırılır. Tüm greft türleri osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon mekanizmasından bir veya daha fazlasına sahiptir. Greftlerin etki mekanizmaları, kökeni ve bileşimine bağlıdır. Hastadan toplanan kemik ile osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon ile yeni kemik oluşturulur. Kadavralardan toplanan allogreftler osteokondüktif ve muhtemelen osteoindüktif özelliklere sahiptir, ancak osteojenik değildir. Ksenogreftler ve alloplastik greftler genellikle osteokondüktiftir(46).

2.1.7.4.2.1. Otojen Greftler

Otojen kemik osteojeniktir ve greft malzemelerinin altın standardı olarak kabul edilir. Otojen kemikle yapılan greftleme işleminin başarısını artıran faktörler; içeriğinde protein, kemik arttırıcı substratlar, mineraller ve canlı kemik hücrelerinin bulunmasıdır(67). Otogreft, aynı kişide bir bölgeden diğerine aktarılan dokudur. Otojen kemiğin toplanabileceği alanlar, iliak, fibula kemiği gibi ekstraoral bölgeler ve mandibular simfiz, maksiller tüber, çekimden 8-12 hafta sonraki soketler(70), ramus, toruslar veya ekzostozlar(71) gibi intraoral bölgelerdir. Otojen kemik blok veya partiküllü otogreft olarak toplanabilir. Donör bölgelerinden kemik toplanmasında yüksek veya yavaş hızdaki el aletleri, keskiler, trefan frezler, piezocerrahi aletleri, kemik pensleri veya kemik kazıyıcıları kullanılabilir. Toplanan otojen kemik, trabeküler(süngerimsi), kortikal veya kortikotrabeküler olabilir. Genel olarak, trabeküler kemiğin, hematopoetik kemik iliği içeriği sayesinde kortikal kemikten daha fazla osteojenik potansiyele sahiptir ve trabeküler kemikte daha fazla multipotent hücre bulunmaktadır(62).

Otojen greftin kortikal tabakası trabeküler bölümüne göre daha az osteojenik hücre içerir, ancak kortikal tabaka alıcı bölgeye kemik morfojenetik proteinini (BMP) sağlar. BMP, konak mezenşimal kök hücreleri osteoblastlara dönüştürür. Buna ek olarak, BMP yumuşak dokunun içeri doğru büyümesini engelleyerek greft yapısının resorpsiyonunu azaltır ve aynı zamanda kan damarlarının greftin içine doğru gelişmesi için gerekli süreyi uzatabilir. Kortikotrabeküler blok greftler alıcı bölgeye göre şekillendirilebilir ve trabeküler kısım alıcı yatağına bakacak şekilde yerleştirilir(72).

Ancak birçok avantajına rağmen, otojen kemikle ilgili bazı olumsuz durumlar vardır. Bunlar; ikinci bir cerrahi alanın gerekliliği, muhtemel hasta morbiditesi ve özellikle intraoral bölgelerden yeterli miktarda elde etme zorluğudur. Bu kısıtlamalar, greft materyali elde edilmesi konusunda alternatif arayışına girilmesine sebep olmuştur(71).

2.1.7.4.2.2. Allogreftler

Bir kişiden, aynı türe ait genetik olarak benzer olmayan başka bir kişiye aktarılan doku allogreft olarak adlandırılır. Allogreftin avantajları, ikincil bir donör alanının olmaması, cerrahi sürenin, kan kaybının ve konakçı morbiditesinin azalmasıdır. Bununla birlikte, allogreftler osteojenik değildir, kemik oluşumu genellikle daha uzun sürer ve bu nedenle otojen greftlerden daha az rejenerasyon oluşturular. Allogreft uygulaması ile hastalık bulaşması hakkında endişeler bulunmaktadır. Ancak, hassas bir verici tarama ve örnek işleme yöntemleri ile risk oldukça düşürülmüştür(73). Allogreftler, demineralize ve mineralize dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti olmak üzere iki formda kullanılabilir. Mineralize formu, demineralize olana göre daha yavaş rezorpsiyona uğrar ve mezenkimal dokulara implante edildiğinde daha osteokondüktif bir iskele oluşturur(62).

2.1.7.4.2.3. Ksenogreftler ve Alloplastik Greftler

Ksenogreftler, konakçı dışında bir türden elde edilen doku greftleridir. En çok bilinen ksenogreftler HA ve anorganik kemik matriksidir(AKM). Ksenogreftler yeni kemik oluşumu için bir iskele görevi gören inert osteokondüktif materyallerdir. Doğal HA, hayvan kemiklerinden elde edilir. Doğal kemiğin üç boyutlu mikroyapısına sahiptir ve komşu sert ve yumuşak dokulara oldukça biyouyumludur. AKM, sığır kökenli inorganik bir kemiktir. İnsanlarda doğal kemik minerallerine benzer bir kalsiyum/fosfat oranına ve kristal yapıya sahiptir. Zamanla AKM greft materyali insan kemiği ile bütünleşir ve zamanla yeni oluşan kemik ile yer değiştirir. Bununla birlikte, yeniden şekillendirme süreci uzun zaman alır ve çalışmalar 18 aydan sonra bile defekt alanında AKM bulunduğunu göstermiştir(62). Sinüs ogmentasyonundan sonra yapılan biyopsilerde, AKM'nin ameliyattan sonra 10 yıla kadar ortamda bulunduğu görülmüştür(74). Ksenogreftlerin dezavantajları, konak bağışıklık cevabı, kırılabilirlik ve kolay migrasyon riskidir(71). Ksenogreftler doğal kemikle bütünleşmiş gibi görünmektedir, ancak düşük rezorpsiyon hızı greftlenmiş bölgenin iyileşmesini olumsuz etkileyebilir ve rejenerasyonun mekanik ve biyolojik özelliklerini tehlikeye atabilir(62).

Alloplastlar inert bir sentetik greft malzemeleridir. En sık kullanılan alloplast materyalleri; kalsiyum karbonat, kalsiyum sülfat, biyoaktif cam polimerler ve sentetik seramik malzemelerdir. HA ve trikalsiyum fosfat (TCP) sentetik seramik materyaller arasındadır(62).

2.1.7.4.2.3.1. Trikalsiyum Fosfat(TCP)

Sentetik biyoseramik bir greft materyali olan trikalsiyum fosfat(TCP), kemiğin %60-70'ini oluşturan inorganik bileşenlerine benzer yapıdadır. Organizmada HA'ya dönüştürülebilir(75). TCP, kemik rejenerasyonu için iskele vazifesi görme konusunda çok başarılıdır. Literatürde, TCP'nin kök hücreler için başarılı bir iskele materyali olduğu rapor edilmiştir(76). Makro gözenekli yapısı kemik büyümesini ve yeni damarların filizlenmesini kolaylaştırır. TCP, hayvan çalışmalarında uygun biyokimyasal, osteokondüksiyon ve rezorpsiyon özellikleri göstermiştir(77, 78). HA'ya göre daha çabuk rezorbe olur ve yerini yeni kemiğe bırakır. Çok yüksek oranda biyouyumlu olduğu için YKR çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir(79).

2.1.8. Kemik Doku Mühendisliği

Kemik doku mühendisliğinde biyoaktif moleküller ve kök hücrelerin kombinasyonu kullanılarak kemik dokusu üretilmesi için çalışılmaktadır. Doku mühendisliğinde kök hücre kaynakları, elde edilmek istenen doku özelliğine göre değişkenlik gösterir. Kök hücreler, embriyonik, fetal, kordon kanı, plasenta, amniyon sıvısı, erişkin ve mezenkimal kaynaklı olabilir. Ayrıca farklanma kapasitesine göre, totipotent, pluripotent, multipotent ve unipotent olabilir. Günümüzde, multipotent erişkin kök hücreler klinik olarak kullanılmaktadır. Kemik doku mühendisliğinde en avantajlı kök hücre kaynakları, elde edilirken en düşük morbiditeye neden olan ve tüm süreçler boyunca farklanma potansiyelini koruyanlardır. Yağ dokusu kemik rejenerasyonu için tekrarlanabilir bir MSCs kaynağıdır(3, 80). Kemik iliğinde

osteojenik hücreler, hematopoietik hücreler ve yağ hücreleri bulunduğu için adipogenez ile osteogenez arasında ilişki olduğu bildirilmiştir(80). MSCs adipositlere farklılaşabilir, daha sonra in vitro olarak osteoblastlara dönüşebilir. İnsan kemik iliğindeki kök hücreler, düşük yoğunlukta bulunurken, adipoz kök hücreler yağ dokusundan çok sayıda elde edilebilir ve in vitro olarak kolayca çoğaltılabilir. Doku mühendisliği modelinde, hastalardan otojen adipoz kök hücreleri hasat etmek ve yeniden emilebilir bir iskele üzerine yerleştirmek mümkündür(3).

Kemik dokusu mühendisliğinde çeşitli biçim ve tipteki biyomalzemeler iskele görevi görebilir. Bunlar içerisinde blok ve partikül formda biyomateryaller bulunmaktadır. Yük taşıyabilme yeteneği olmamasına rağmen partikül formlar hücreleştirme için daha büyük bir yüzey alanı sunar. Partiküler form blok formlarına göre konak dokulara daha hızlı yerleştirilir ve blok formlarında daha yavaş remodeling gelişir. Granül kalsiyum fosfat seramikler ve HA'lar, makro ve mikro yapı özellikleri ile doku mühendisliğinde potansiyel biyomalzemeler haline gelmiştir. Bu özellikleri ile doku mühendisliğinde hücresel bileşenin, hayatta kalmasını, sinyal vermesini, büyümesini ve çoğalmasını etkiler(81).

2.2. KÖK HÜCRE

Kök hücreler, kendini yenileme, in vivo ve in vitro şartlarda uygun uyarana maruz kaldıklarında çeşitli hücelere dönüşme özelliği olan farklılaşmamış hücrelerdir(82). 1960'larda hematopoetik kök hücrelerin bulunması ile başlayan araştırmalar MSCs bulunması ile devam etmiştir. 1990'lı yıllara gelindiğinde ise birçok organdaki(karaciğer, beyin v.s.) kök hücrelerin varlığı bilimsel olarak gösterilmiştir. Güncel yaklaşımda üç ana kök hücre kaynağı vardır. Bunlar; yetişkin kök hücreler, kordon kanından üretilen kök hücreler ve embriyonik kök hücrelerdir. Köken aldıkları dokuların hücrelerine dönüşebilmenin yanı sıra çeşitli sinyallere maruz bırakıldıklarında birçok farklılaşmış doku hücresine dönüşebilirler(83).

2.2.1. Kök Hücrelerin Genel Özellikleri

2.2.1.1. Farklanma (Plastisite), Kendini Yenileme ve Köklülük

Farklanma, kök hücrelerin büyüme faktörleri, hücrelerarası etkileşimin, hücre dışı matriks protein ve sitokinlerin birlikte etkisiyle geçirdikleri birçok farklılaşmayı ifade eder. Farklanmaya hazırlanan hücre, bölünmeyi durdururken etrafından gelen sinyallere cevap vermek için hazırlık yapar. Aktivasyon yolakları, hücre içi reseptörler ve enzim bağımlı yüzey reseptörlerin meydana gelmesiyle çeşitli olayların başlamasını sağlar. Böylece hücre, çevreden gelen sinyallere cevap verebilir(84). Bir çalışmada, Notch sinyalizasyonuna maruz bırakılan nöral kök hücrelerin gliya prekürsörlerine farklandığı rapor edilmiştir(85). Ayrıca, farklanmanın onkogen ürünler nedeniyle geri dönmesi ve malign tümör oluşturması mümkündür. Örnek olarak AIDS bulgularından olan, herpesvirüs 8'in oluşturduğu "Kütanoz Kaposi's Sarkoma" verilebilir(84).

Farklılaşmaya uğramadan önce kendisini kopyalama kök hücrelerin temel özelliklerindedir. Kök hücreler bir taraftan bir hücreye özelleşirken diğer taraftan kendini kopyalamak suretiyle yedeğini oluşturarak asimetrik hücre bölünmesine uğrar. Böylece kök

hücre sayısı tüm hayat boyunca değişmeden kalır. Bu duruma örnek olarak, *Drosophila* yumurtalıklarındaki çoğalma gösterilebilir(82).

Kök hücrelerin ayırt edilmesi için kullanılan bazı molekül ve hücre düzeyindeki farklılıklar köklülük olarak tanımlanır. Kök hücreler bu özelliklere(özel gen ifadeleri ya da translasyonu takiben bazı değişimler) sahip oldukları için çok karakteristik yapılarını ve işlevlerini devam ettirebilirler. Farklanma kümeleri (CD, Cluster of differentiation) adı altında toplanan ayıraçlar kullanılarak kök hücre tipi belirlenebilir. CD33 ve CD45 hematopoetik kök hücrelerin, CD29,CD79,CD105 MSCs ayırıcı belirteçleridir. Ayrıca büyüme faktörleri, transkripsiyon faktörleri ve enzimler de kök hücre ayırıcı olarak kullanılmaktadır(86, 87).

2.2.2..Kök Hücrelerin Sınıflandırılması

Kök hücre sınıflandırılması yapılırken kökeni ve farklılaşma kabiliyeti dikkate alınır. Farklılaşma kabiliyetine göre *totipotent*, *pluripotent*, *multipotent* ve *unipotent* olarak adlandırılır. Kökenine göre ise *kordon kanı*, *fetal*, *erişkin*, *placenta*, *embriyonik* olarak tanımlanır(88).

2.2.2.1. Farklılaşabilme Potansiyeline Göre Kök Hücreler

2.2.2.1.1. Totipotent Kök Hücreler

Totipotent kök hücreler, organizmanın tamamını oluşturabilme potansiyeli olan hücrelerdir. Morula safhasındaki blastomerin her biri tek başına tüm embriyonik yapıları meydana getirebilir. Bu yüzden blastomerler totipotent potansiyele sahiptir(89). Totipotent hücreler, embriyo, embriyo sonrası tüm doku ve organlar gibi yapıları oluşturabilecek sınırsız potansiyele sahiptir. İlk sekiz blastomerin totipotent potansiyeli vardır(83).

2.2.2.1.2. Pluripotent Kök Hücreler

Döllenmenin yaklaşık beşinci gününde kompaksiyon ve blastosist oluşumu gerçekleşir. Blastosistin iç hücre kitlesindeki hücreler pluripotenttir. Embriyonal kök hücre kaynağı blastosistin iç hücre kitlesidir. Embriyonel kök hücrelerin sınırsız proliferasyon potansiyeli, çok miktardaki telomeraz aktivitesinden kaynaklanmaktadır(83).

Tablo 3: Farklılaşabilme potansiyeline göre kök hücrelerin farklılaşma yönleri(84)

<i>Adı</i>	<i>Hücre Tipi(Yerleşim)</i>	<i>Farklanma yönü</i>	<i>Farklanma Etkinliği</i>
Embriyonik kök hücre	Morula aşamasındaki hücreler	Totipotent	Embriyo ve embriyo dışı dokular
Embriyonik kök hücre	Blastosist aşamasındaki iç hücre kitlesi hücreleri	Pluripotent	Embriyo gövdesi(tüm somatik ve germ hücreleri)
Embriyonik kök hücre	Gastrula aşamasındaki epiblast hücreleri	Pluripotent	Endoderm, mezoderm ve ektoderm hücreleri
Embriyonik kök hücre	Ektoderm endoderm ve mezoderm hücreleri	Pluripotent	Tüm somatik hücreler
Embriyonik kök hücre	Özgün doku hücreleri	Multipotent	Dokuya göre bir veya daha fazla hücre
Yetişkin kök hücre	Bir dokudaki yerleşik hücreler	Unipotent	Bir hücre tipi

2.2.2.1.3. Multipotent Kök Hücreler

Fetal yaşamda görülen kök hücrelerdir ve özel hücre tiplerine farklılaşabilme kabiliyeti vardır. Multipotent hücreler, karakteristik olarak buldukları doku hücrelerine farklılaşırlar. Multipotent hücrelere örnek olarak kordon kanı ve yetişkin kök hücreleri verilebilir(83).

2.2.2.1.4. . Unipotent Kök Hücreler

Sadece tek bir hücre çeşidine dönüşebilen kök hücrelerdir. Endotelyal progenitör hücreleri, kornea epitelyal hücreleri, spermatogonium ve oogonium hücreleri unipotent kök hücrelere örnek olarak verilebilir(90).

2.2.2.2. Elde Edilen Kaynağına Göre Kök Hücreler

2.2.2.2.1. Embriyonik Kök Hücreler

Embriyonik kök hücrelerin kaynağı blastosistin iç hücre kitlesidir. Bu hücreler vucuttaki tüm hücrelere farklılaşabilir(91). 1981 yılında, Evans and Kaufman(92) fare embriyosundan, 1998 yılında Thompson et al.(91) insan embriyosundan in vitro olarak kök hücre üretmeyi başarmıştır. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp alanında, embriyonik kök hücreler çok önemli bir araştırma alanıdır. Embriyolojik kök hücreler, blastosistin iç hücre kitlesinden özel immünolojik ve mekanik yöntemler kullanılarak ayrıştırılır. Daha sonra özel besi yeri ve büyüme faktörleri içeren ortamlara ekilerek elde edilirler. Embriyonik kök hücreler pluripotent kök hücrelerdir. Uygun uyaran verildiğinde organizmada yaklaşık 200 hücre çeşidine dönüşebilir. Embriyonik kök hücreler kendini yenileme yoluyla farklılaşmaksızın çoğalması ve indüklendiklerinde farklı hücre tiplerine dönüşebilme özelliklerinden dolayı rejeneratif tıp alanında çok önemli bir noktaya gelmiştir(83).

Embriyonik kök hücreler, yakın bir gelecekte tedavi edilemeyen birçok rahatsızlık için yapılan çalışmalarda umut vaat eden sonuçlar vermiştir. Multiple skleroz, Parkinson hastalığı, diyabet, kanser, alzheimer hastalığı, travma sonrası felç, bağışıklık sistemi rahatsızlıkları, osteoartrit, kalp kası yetmezliği gibi hastalıklar bunlar arasında sayılabilir(93-95).

Öte yandan, etik ve tıbbi açıdan kök hücre uygulamalarının bazı sakıncaları bulunmaktadır. Uygulama için hayvan kaynaklı olan malzeme ve kültür ortamı kullanılması, çapraz kontaminasyon riskini ortaya çıkarır. İnsan embriyonik kök hücreleri çok anstabil olduğundan, uzun dönemde öngürülmesi mümkün olmayacak şekilde farklılaşabilirler. Bunun dışında farklılaşmış kök hücreler, bağışıklık cevabına neden olabilecek moleküller üretebilirler.

Tedavi öncesi cevaplanması gereken iki temel soru vardır. Bunlar;

- Özel hücre çeşidine farklılaşmış hücreler hastada uygun bölgeye nasıl nakledilecek?
- Uygun fonksiyona adapte olmaları nasıl sağlanacak?(84)

2.2.2.2.2. Fetal Kök Hücreler

Sonsuz sayıda bölünebilen, kendini yenileme kabiliyetine sahip olan ve kaynağı düşük yapan kadınlar olan pluripotent kök hücrelerdir. Gelişimin daha ileri aşamasında üretildiği için embriyonik kök hücre gibi tek başına tüm vücudu oluşturabilme kapasitesine sahip değildir. Ancak farklılaşarak yumurta veya sperm hücresine dönüşebilir(96).

2.2.2.2.3. Kordon Kanı Kök Hücreleri

1990'lı yılların başında yapılan kök hücre çalışmalarında, plasenta ve göbek kordonunun hematopoietik kök hücre açısından çok zengin bir kaynak olduğu görülmüştür.

Kordon kanı ancak 100 ml gibi düşük miktarda olduğundan alıcıları genellikle çocuklardır. Fakat son yıllarda, birkaç bebekten alınan kanın bir bireye uygulanabildiği tespit edilmiş ve böylece doku uyumu gösteren yetişkinlere de uygulanması mümkün hale gelmiştir. En sık uygulandığı kişiler, ailesinde ve çevresinde uygun donör bulunamayan ve kök hücre nakli yapılması gereken hastalardır(84, 97).

2.2.2.2.4. Plasenta Kök Hücreleri

Amniyon zarı ve koryonda bulunan kök hücrelerin kökeni embriyo dışı mezodermdir. Amniyon zarı kök hücreleri, çoğu zaman doğum anında alınır. Yüzey özellikleri, kemik iliği, MSCs ve kordon kanı kaynaklı olan kök hücrelere benzerdir. İlave olarak embriyonik kök hücre yüzey özellikleri taşıdığı için daha yüksek farklılaşma kapasitesine sahiptir(88).

2.2.2.2.5. Amniyon Sıvısı Kök Hücreleri

Hamileliğin 15-18. haftalarında genetik tarama için amniyosentez yapılmaktadır. Alınan amniyon sıvısındaki kök hücreler özel yöntemler ile ayrıştırılıp, izole edilebilir ve daha sonra kültüre edildiğinde 36 saat periyodunda kendini yenilediği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda, uygun uyarılar altında amniyon sıvısı kök hücrelerinin her üç germ yaprağına dönüşebildiği gösterilmiştir(88).

2.2.2.2.6. Erişkin Kök Hücreleri

Erişkin kök hücreler(somatik kök hücreler), bulunduğu doku içerisindeki özel hücrelere dönüşebilme yeteneği ile hücre ölümü ve doku hasarı durumunda fonksiyon görürler(98). Vücudun olgunlaşması ile birlikte kök hücre ve öncül hücrelerin sayısı azalarak sadece belirli anatomik bölgelerde sınırlı kalırlar. Bu nedenle dokunun yenilenme kapasitesi, yaşla birlikte azalır. Organizmada hasar gören dokuların tamiri iki yoldan gerçekleşir. Birincisi, farklılaşmış ve işlev gören hücrelerin uyarılarak çoğalmasındır. Bu duruma örnek olarak iskelet kasları, karaciğer ve damar endotel hücreleri verilebilir. İkincisi; yetişkin kök hücrelerin farklılaşarak dokudaki hasarı gidermesidir. Bu duruma örnek olarak kemik iliği kök hücreleri, periferik kök hücreleri, MSCs ve organlarda bulunan erişkin kök hücreler verilebilir(99-101).

2.2.2.2.7. Hematopoetik Kök Hücreleri

Hematopoetik kök hücreler, kandan veya kemik iliğinden elde edilebilen multipotent özellikte ve apoptoza uğrayabilen hücrelerdir. Bu hücreler, 'Niş' olarak adlandırılan kemik iliğinde bulunan özel mikroçerçevelerde çeşitli süreçlerden geçerek fonksiyon kazanırlar. Nişler hücre dışı matriks elemanları, osteoblastları, osteoklastları, stromal hücreleri, faktörleri, sitokinleri barındırırlar. Nişi oluşturan hücre ve ortam sayesinde hematopez(kan yapımı) sağlanır(84).

Hematopietik kök hücre klasik olarak anestezi altında kalça kemiğinden şırınga ile aspirasyon yapılarak elde edilmektedir. Bu yöntemle elde edilen hücrelerden 1/10-100000 kadarı hematopietik kök hücredir. Kemikten alınan parçanın direkt kemik iliği naklinde kullanılabilmesi fikri ilk başta büyük ilgi uyandırmıştır. Son zamanlarda bu fikir, hematopietik kök hücrenin kaynağından periferik atılması şeklinde uygulanmaktadır. Kan dolaşımında az sayıda progenitor ve kök hücre olduğu uzun süredir bilinmektedir. Son on yılda yapılan çalışmaların sonuçlarına göre; granülosit koloni uyarıcı faktör(G-CSF) benzeri sitokinleri donöre uygulayarak birçok hücrenin kemik iliğinden periferik dolaşıma katılması sağlanabilir. Hücre toplama prosedüründe, G-CSF enjeksiyonundan birkaç gün sonra donör

veni içerisine filtre sistemi yerleştirilir. Filtre içerisinde CD34+ hücre içeren lökositler toplanır ve eritrositler dolaşıma geri katılır. Filtre sayesinde toplanan hücrelerin %5-10'u kök hücredir. Toplanan CD34+ hücreler farklı seviyelerde olgunlaşmış lökositler, kök hücre ve progenitor hücrelerden oluşan bir karışımdır. Son birkaç yılda otolog ve allojenik kemik iliği naklinde, kemik iliğinden daha çok periferik yöntem ile elde edilen lökositler tercih edilmektedir. Lösemi ve lenfoma tedavisi için de uygulanmıştır. Bu hastaların tedavi prosedüründe, kanseröz hematopoetik hücreler kemoterapi veya radyasyon kullanılarak öldürülür. Daha sonra donörün periferik dolaşımından elde edilen hematopoetik kök hücreler hastaya nakledilir(102).

2.2.2.2.8. Mezenkimal Kök Hücreler

İlk kez 1976 yılında Fredenstein(103) tarafından tanımlanan MSCs, birçok hücreye (ligament, yağ, kemik, kıkırdak, kas, tendon hücresi gibi) dönüşebilen yetişkin kök hücrelerdir. MSCs, diğer adıyla stromal kök hücreler, yüzey antijenlerinin ekspresyonu, plastiğe yapışma, stromal karakteri, multipotent farklılaşma potansiyeli değerlendirilerek ayırt edilir(104, 105).

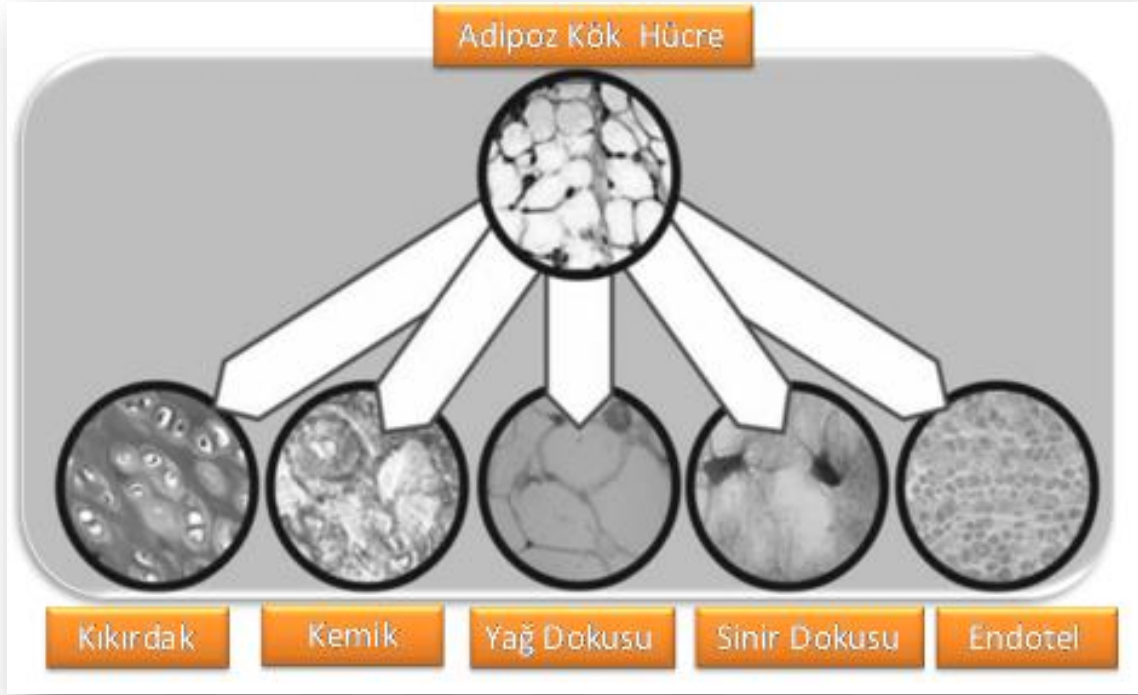
MSCs en fazla kemik iliğinde olmakla birlikte, kas dokusu, kemik, periost, diş pulpası, karaciğer, kan ve yağ dokusu aspirasyon materyallerinde de bulunmaktadır. MSCs mezenkimal dokulara(osteoblastik, kondrojenik ve adipojenik) ek olarak nöral ve kardiyomiyojenik dokulara da farklılaşabildiği gösterilmiştir. MSCs'in bazı ortak özellikleri vardır. Bunlar; plastik kültür kaplarına yapışma, fibroblast benzeri yapıya sahip olma, bazı yüzey özellikleri(%95 den fazla oranda CD10, CD73, CD90) ve multipotent farklılaşma potansiyelidir(86, 94).

MSCs, proliferasyon ve farklılaşma yeteneğini kaybetmeden laboratuvar ortamında çoğalmaya uygundur. Hasarlı hücre ile birleşme özelliğine sahip olmaları, biyoaktif maddeler ve büyüme faktörleri gibi çözünür faktör salınımı yapabilmeleri, migrasyon yapabilme ve immünmodülatör, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve anjiyogenik özellikleri sayesinde dokuda meydana gelen tahribatın tedavi edilmesine yardımcı olurlar. Hasarlı bölgeden salınan stromal

kökenli faktör-1, monosit kemoatraktan protein-1 gibi çözümler faktörlerin salınmasıyla, kök hücreler nişlerinden hedef dokuya göç ederler(106).

2.2.2.8.1. Yağ Dokusu Kaynaklı Kök Hücre

Adipoz doku erişkin MSCs'in en fazla bulunduğu ve en rahat elde edilebildiği kaynaktır. Yağ dokusu içindeki kök hücrelerin sıklığı, 1/ 100 ile 1/1500 hücre arasındadır. Yağ dokusu, kemik iliğinden çok daha fazla mezenkimal kök hücre yoğunluğuna sahiptir. Ayrıca, yağ dokusu özel sinyaller ile uyarıldığında, adipojenik(107), kondrojenik(108), miyojenik(109), osteojenik(110) ve nörojenik(9) hücrelere farklılaşma kapasitesine sahip olan bir multipotent hücre kaynağı olarak tanımlanmıştır(Şekil 6). Başarılı bir adipoz doku anjiogenezisi için, tübüler yapıda bir iskeleye ihtiyaç vardır. Adipoz kök hücre için kullanılan iskele yapıları, genel olarak doku hacmini koruyacak şekilde ve dokuya benzer olmalıdır(111).



Şekil 4: ASCs'in farklılaştığı hücreler(111)

2.2.3. Kök Hücrelerin Klinikte Kullanım Alanları

Organ nakillerinde ve diğer hastalıkların tedavi edilmesinde, kök hücrelerin kendini yenileyebilme, farklılaşabilme ve doku/organ oluşturabilme özelliklerinden faydalanılmaktadır. Embriyo, kan, kemik iliği ve yağ dokusu başta olmak üzere birçok kaynaktan kök hücre üretilebilmektedir. Embriyonik kök hücrelerin parkinson, diyabet, medulla spinalis yaralanmaları, kalp yetmezliği, osteogenezis imperfekta gibi hastalıkların tedavisinde kullanımı deneysel seviyededir. Bu durum, nakil sonrası kök hücre davranışlarını öngörmenin çok zor olmasından kaynaklanmaktadır. Bu yüzden, klinik kullanıma şüphe ile yaklaşılmaktadır(112-114).

Kemik iltihapları, gelişimsel bozukluklar, travma, dejeneratif rahatsızlıklar(osteoartrit, osteoporoz) ve tümörler gibi iskelet sistemi hastalıklarında MSCs kullanılması için çalışmalar yürütülmektedir. Kemik ve kıkırdak tamiri gerektiren durumlarda, travma ve yaşlılık nedeniyle gelişen osteoartritte, MSCs uygulanması olumlu sonuçlar vermektedir. MSCs, osteoporozla bağlı kırık tedavisinde ve osteoartrit gelişen vakalarda kemik ve kıkırdak

rejenerasyonu için başarıyla kullanılmıştır. Ayrıca, miyokard enfarktüsü sonrası kalp dokusunun onarımında etkili olmuştur. MSCs'in immünsüpresif özellikleri, graft versus host hastalığı ve romatoid artrit komplikasyonlarını azaltmak için kullanılmıştır(115).

İn vivo çalışmalarda, MSCs'in osteoblastik faaliyeti ve kemik yapımını arttırdığı rapor edilmiştir(116, 117). Taguchi et al.(118) kemik iliği hücrelerinin in vivo migrasyonu ve kemik tamirine olan etkisini değerlendirmek için kimerik farede femur kırık modeli oluşturmuşlardır. Kuyruk veninden GFP(green fluorescent protein) kemik iliği hücreleri verildikten sonra kırık bölgesinde oluşan kallus dokusundaki ve kemik çeperindeki hücrelerin tamamının GFP pozitif olduğu görülmüştür. Bu sonuç, kök hücrelerin osteoblastlara farklılaştığını ve MSCs'in kemik iyileşmesiyle ilgisinin olduğunu kesin bir şekilde kanıtlamaktadır.

MSCs çalışmalarda, bir iskelet görevi gören, doğal ve sentetik biyomateryaller ile birlikte kullanılmaktadır(119, 120). Kon et al.(121) koyunlarda defektif tibia kırık modeli üzerinde hidroksiapatit(HA) taşıyıcılar ile HA+kemik iliği kaynaklı osteoprogenitör hücre gruplarını karşılaştırmışlardır. 2 ay sonunda HA verilen grupta çok az miktarda kemik yapımı görülürken, HA+kemik iliği kaynaklı osteoprogenitör hücre grubunda daha fazla kemik oluşumu gözlenmiştir. Mevcut çalışmalar kemik defektlerinin kansellöz greftlere alternatif olarak iskele görevi gören greftlerle tedavi edilebileceğini göstermektedir(122, 123).

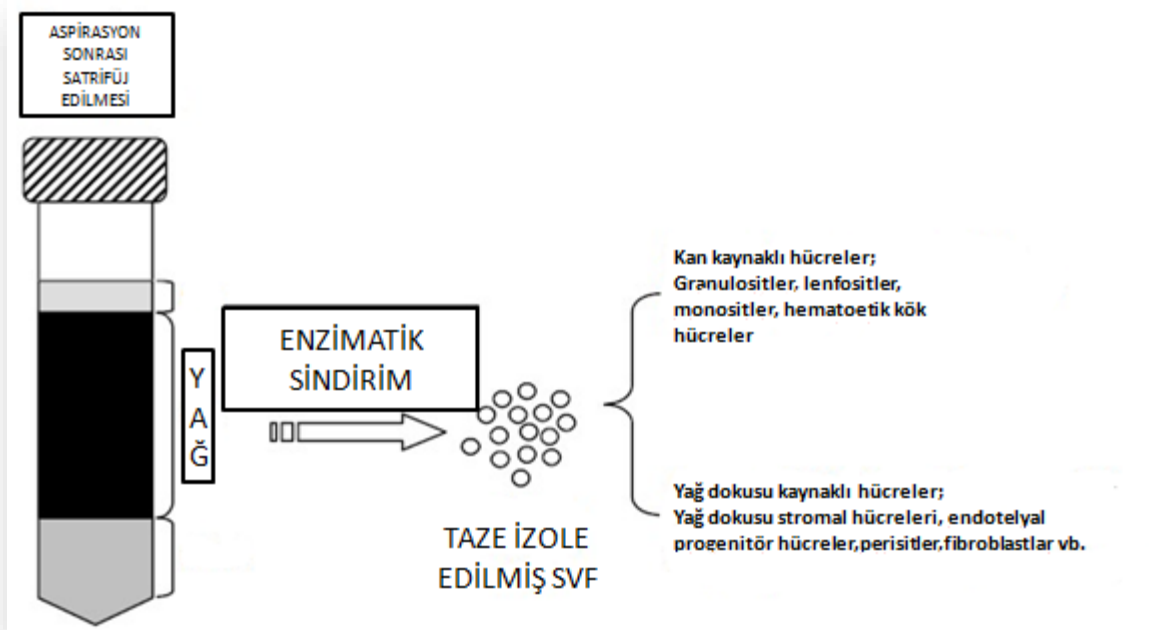
2.3. STROMAL VASKÜLER FRAKSİYON

2.3.1. Stromal Vasküler Fraksiyon Tarihçesi

Stromal vasküler fraksiyon(SVF); literatürde ilk kez yağ dokusunun hücre açısından zengin stromal bölümü olarak, Rodbell M. Tarafından 1964 yılında tanımlanmıştır(124). Stromal vasküler fraksiyonun içeriğinde, progenitör hücrelerin bulunduğunu ve adipositlere dönüştükleri daha sonra gösterilmiştir(125). Ailhud et al.(126) 1992 yılında SVF'nin miks bir karışım olduğunu ve içerisinde progenitör hücreler, perisitler, düz kas hücreleri, preadipositler, fibroblastların bulunduğunu rapor etmiştir. SVF içerisinde multipotent kök hücrelerin bulunduğu Zuk et al. tarafından 2002 yılında gösterilmiştir(9). 2004 yılında Lendeckel et al.(127) tarafından, yaygın travmatik kalvaryum defektlerini tedavi etmek için bir cerrahi prosedür ile otolog yağ dokusundan elde edilen SVF'nin ilk klinik uygulaması bildirilmiştir(127) Pak, 2011 yılında insan hastalarda cerrahi prosedür olmaksızın, kırık ve kemik rejenerasyonu için otolog yağ dokusundan elde edilen SVF'yi başarıyla kullanmıştır(128). SVF ve ASCs güncelliğini korumaktadır ve doku mühendisliği alanında çalışmalar son yıllarda artış göstermiştir.

2.3.2. Stromal Vasküler Fraksiyon İçeriği

Yağ dokusu, mezenkimal bağ dokudan kaynaklanan adipositlerden oluşur. Adipositler tek tek veya bağ dokusu içinde gruplar halinde bulunur. Adipositler, damarsal olarak zengin bağ dokusu ile ayrılmış lobüller oluşturur. Santrifüj edilmiş yağ dokusu çeşitli fraksiyonlar içerir. Ortadaki fraksiyon, preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler içeren stromal vasküler fraksiyon (SVF) olarak bilinir(129).(Şekil 2)



Şekil 5: Yağ dokusu kaynaklı stromal vasküler fraksiyon ve içeriği, SVF: stromal vasküler fraksiyon (130)

Stromal vasküler fraksiyonu(SVF) vasküler endotelial büyüme faktörü(VEGF), temel fibroblast büyüme faktörü ve Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör(GM-CSF) gibi birçok sitokin, anjiyogenetik ve antiapoptotik faktör içerir. VEGF'nin endotelial hücre büyümesi ve anjiyogenez üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir(9). Adipokinler, yağ dokusundan salgılanan, endokrin, parakrin ve otkrin etkileri olan proteinlerdir. Adipoz dokuya spesifik bir sitokin olan monobütinin, anjiyogenetik ve endotelial proliferasyonda etkili olduğu gösterilmiştir. SVF'de ayrıca, kollajen, proteoglikan ve elastin sentezleyen fibroblastlar da mevcuttur. Trombosit büyüme faktör- β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü, fibroblastlardan kaynaklanan diğer önemli faktörlerdir(129).

Tablo 4: SVF içeriğindeki hücre popülasyonu(%)(131)

Hücre Tipi	%
Hematopoetik Hücreler	
• Kök ve progenitor hücreler	< 0,1
• Granulositler	10-15
• Monositler	5-15
• Lenfositler	10-15
Endotel Hücreleri	10-20
Perisitler	3-5
Stromal Hücreler	15-30

Bireysel yağ dokusunda farklılıklara ek olarak, kollajenaz miktarı SVF'deki kök hücrelerin etkinliğini ve yaşayabilirliğini etkileyen önemli bir rol oynayabilir. Yüksek dozaj veya uzun süren kollajenaz maruziyeti kök hücreler için toksik olabilir. Bununla birlikte, yetersiz miktarda kollajenaz, verimsiz ve yetersiz miktarda kök hücre ile sonuçlanabilir. Dolayısıyla, doğru miktarda kollajenazın kullanılması çok önemlidir. Buna ek olarak, doğru tür kollajenaz kullanımı da önemlidir(132).

2.3.2. Otolog Yağ Dokusundan Elde Edilen SVF'nin Kemik Rejenerasyonunda Güncel Klinik Uygulamaları

Kemik dokusu, doğuştan rejenerasyon yeteneğine sahiptir. Kırık oluştuğunda konak progenitor kök hücreler skarsız iyileşme oluştururlar. Ancak, birkaç klinik durumda, kemik onarımı ve yenilenmesini kolaylaştırmak için terapötik girişimler gerekir(128).

2.3.2.1. Femur Başı Osteonekrozu

Femur başının osteonekrozu, etyolojisi bilinmeyen, genellikle genç erkeklerde görülen, kalça eklemine çökmesine neden olabilen, iskelet sistemi rahatsızlığıdır ve hastalıklı eklem yerine total kalça protezi yerleştirilmesi gerekebilir. Literatürdeki mevcut çalışmalarda, adipoz kaynaklı SVF femur başında osteonekroz olan hastaların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır(128, 133, 134).

2.3.3.2.2. Kemik Kırıkları

Literatürde kemik kırıklarının adipoz kaynaklı SVF kullanılarak başarılı olarak tedavi edildiğini gösteren raporlar mevcuttur(19, 135). Tedaviden 12 ay sonra alınan biyopsilerde, yapısal olarak kemikten morfolojik olarak ayrılan ve SVF hücrelerinin osteojenik yapısını düşündüren kemik ossikülleri olduğu görülmüştür. Bu şekilde otolog adipoz SVF'nin, kırık mikro ortamında spontan kemik dokusu ve damar oluşturduğu gösterilmiştir(19).

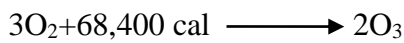
2.4 OZON

2.4.1. Ozonun Tarihçesi

Farklı bir kimyasal bileşik olan ozon ilk kez 1839'da Schönbein tarafından tarif edilmiştir. Schönbein "elektrik maddesinin kokusu" olarak tanımladığı ozonun pozitif elektrodta karakteristik bir koku ürettiğini bildirmiştir. Schönbein, yeni madde için Yunanca kökenli ve anlamı koku kaynağı olan ozon adını önermiştir(136). 19. yüzyılın sonlarında, ozonun çok sayıda organik bileşiği oksitleyebildiği ve kontamine atık sulardaki bakterileri inaktive edebildiğini gösteren birçok rapor yayınlanmıştır(137). Bu özellikler ozonu, su dezenfeksiyonunda kloru alternatif hale getirmiştir. Ozonun keskin açılı moleküler yapısı 20. yüzyılda tanımlanmıştır(138). Ozon klinik olarak 1915 yılında kullanılmıştır. İlk zamanlarda ozon topikal olarak uygulanarak, Birinci Dünya Savaşı'nda yaralanan askerlerdeki gangrenler, kemikteki kırık, apse ve iltihaplar başarı ile tedavi edilmiştir(137). Ozonlanmış kanın intravenöz uygulaması ilk kez Wolff(139) tarafından gerçekleştirilmiştir. 1958'de Hänslar(140) değişken oranlarda ve istikrarlı ozon/oksijen karışımı üretebilen ilk tıbbi ozon jeneratörü modelini geliştirmiştir. Bu buluş ozonlanmış otohemoterapi prosedürünün başlangıcı olarak düşünülmekte ve son 40 yılda ozon tedavisinin yaygınlaştırılması için temel oluşturmaktadır. (Tablo 2)

2.4.2. Tıbbi Ozon Jeneratörü

Tıbbi ozon jeneratörü, saf oksijenin yüksek bir voltajdan(5-13 mv) geçirilmesiyle aşağıdaki tepkimeyi meydana getirerek ozon üretir.



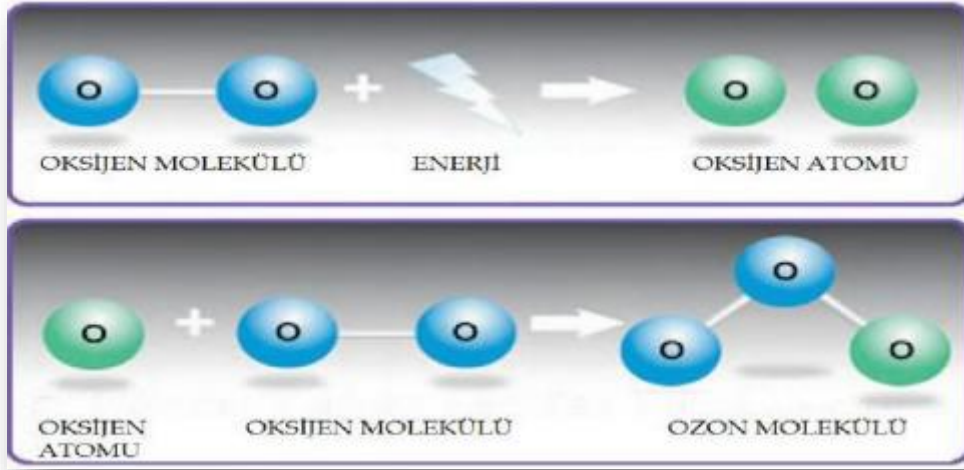
Tıbbi ozon jeneratörünün, ozon üretimi yapan kısımları inert malzemelerden(çelik, alüminyum, seramik, cam, teflon) üretilmesi gerekir. Ozon vermek için kullanılan aparatlar

ise polietilen, teflon, polipropilen veya camdan yapılması gerekir. Hava ile temasının kesilmesinin nedeni; hava ile reaksiyonu sonucu oluşan nitrozoksidin(N_2O_2) toksik olmasıdır. Sonuç olarak, her zaman % 95'den az oksijen ve % 5'den fazla ozon içermeyen bir gaz karışımı elde edilir(34).

Medikal ozon cihazlarında ozon yoğunluğu fotometre ile ölçülür. Bunun için mor ötesi dalga boyuna yakın 254 nm bandı baz alınır. Ozon tedavisinde genellikle kullanılan "gama" birimi 1 mL ozon/oksijen karışımında 1 µg ozonu ifade eder(141).

2.4.3. Ozonun Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Doğada, fırtınalar sırasında elektrik boşalmaları nedeniyle oksijen molekülü(O_2) ile serbest oksijen atomunun(O) reaksiyonu sonucu ozon(O_3) oluşur(128).(Şekil 6) Ozon, oksijene göre 1,6 kat daha yoğun ve 10 kat fazla suda çözünür (100 mL 0 °C suda 49 mL çözünür). Ozon radikal bir molekül olmasa da, flor ve persülfattan sonra en güçlü üçüncü oksidandır. Ozon depolanamayan, stabil olmayan bir gazdır ve 20°C'de yarılanma ömrü 40 dk olduğu için bir kerede kullanılmalıdır. Ozon tartışmalara konu olan bir gazdır çünkü stratosfere tehlikeli B ve C ultraviyole radyasyonlarını absorbe ederek çok yararlı olmasına rağmen troposferdeki karbon monoksit (CO), N_2O_2 ile karıştığında toksiktir. Gözler ve akciğerler ozona karşı çok hassastır, çünkü antioksidan ve nötrleştirme yetenekleri azdır ve bu nedenle ozon bu organlarla hiçbir zaman temas etmemelidir(34).



Şekil 6: Oksijen molekülünün ozon molekülüne dönüşümü(142)

2.4.4. Klinik Uygulamada Ozonun Etki Mekanizması

Ozonun etki mekanizması ile ilgili temel kavramlar;

a) Ozon sıcaklık, basınç ve ozon konsantrasyonuyla ilişkili olarak saf suda fiziksel olarak çözünür. Ancak bu durumdaki ozon reaksiyona girmez ve sıkıca kapatılmış bir cam şişede, ozonlanmış su birkaç gün aktif kalır.

b) Ozon, biyolojik sıvılarda (fizyolojik salin, plazma, lenf, idrar) ısıya, basınca ve konsantrasyona bağlı olarak saniyeler içinde çözünerek reaksiyon verir;

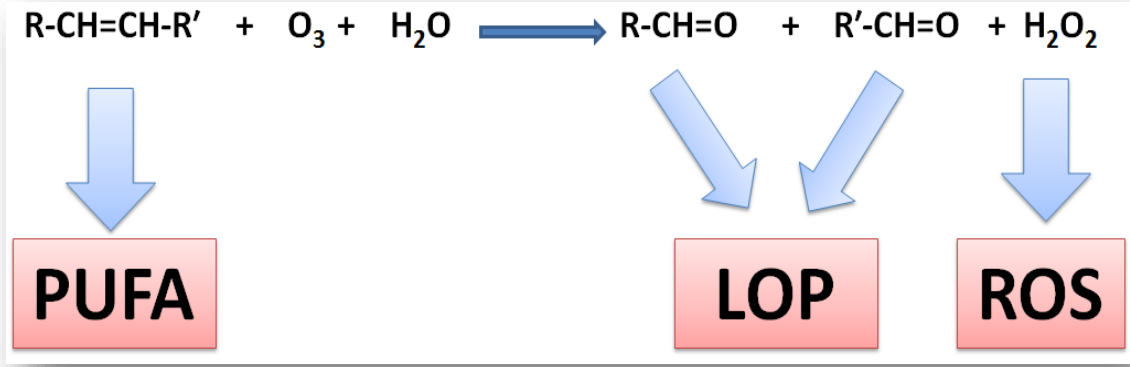


Ozon gazı biyolojik molekülü oksitlerken ortama son derece reaktif oksijen atomu yayar. Ozonun cilt ve mukozadan nüfuz ettiği veya hücrelere girdiği konusundaki yanlış inançların aksine, belirtilen reaksiyonun ardından ozonun artık var olmadığı görülmektedir. Ozon ilk olarak, çoklu doymamış yağ asitleri (polyunsaturated fatty acids-PUFA), askorbik ve ürik asitler gibi antioksidanlar, sistein gibi indirgeyici glutatyon (GSH) ve albumin gibi -SH gruplu tiyol bileşikleri ile reaksiyona girer. Ozon dozuna bağlı olarak karbonhidratlar, enzimler, DNA ve RNA da etkilenebilir. Bu bileşiklerin tümü elektron verici olarak hareket eder ve oksidasyona uğrar.

c) Ana reaksiyonda, bir mol hidorjen peroksit(reaktif oksijen ürünü-ROS) ve iki mol lipid oksidasyon ürününden(LOP) oluşmaktadır.(Şekil 7) Temel reaktif oksidasyon molekülü hidrojen peroksittir(H_2O_2) ve radikal olmayan bir oksidandır ve çeşitli biyolojik ve terapötik etkileri meydana getiren sorumlu ürün olarak ortaya çıkabilir. Başlangıçta ROS' un her zaman zararlı olduğu kavramı düşünülmekteydi. Fizyolojik miktarlarda ROS'un, sinyal iletim düzenleyicisi ve konak savunması için önemli mediatörlerlerden olduğu anlaşıldıktan sonra bu düşünce değişmiştir(34). Bunun yanı sıra, ROS'un ömrü bir saniyeden az olsa da önemli hücre bileşenlerine zarar verebilir ve bu nedenle hasar oluşturmadan biyolojik etki elde etmek için uygulanan ozon dozu dikkatli ayarlanmalıdır. Uygun doz, kan antioksidan kapasitesine göre belirlenebilir. Antioksidan kapasitesi arttırmak amacıyla, ozon tedavisi öncesinde ve boyunca antioksidanlar ağızdan kullanılabilir(34).

Plazmada ROS oluşumu son derece hızlıdır ve ozon dozuna bağlı olarak antioksidan kapasitesinin geçici ve küçük bir azalması (% 5-25) eşlik eder. Bu durumun 15-20 dakika içinde normale dönebilmesi, oksitlenmiş bileşiklerin etkili bir şekilde geri dönüşmesine (deaskorbik asidin askorbik aside dönüşmesi gibi) bağlıdır(143).

H_2O_2 , plazmadan hücrelere kolayca dağılır ve sitoplazmada aniden ortaya çıkması, tetikleyici uyarıyı temsil eder. Hücre türüne bağlı olarak, farklı biyokimyasal yollarla eritrositleri, lökositleri ve trombositleri eşzamanlı olarak aktive edilebilir ve birçok biyolojik etkiye neden olabilir.(Tablo 5) Hücre sitoplazmasına girdiğinde hızlı bir şekilde antioksidanlar tarafından yok edilir. Sitoplazmadaki konsantrasyonu, plazmadaki konsantrasyonun en fazla %10'u kadardır. Suya hızlı bir şekilde indirgenme, GSH, katalaz ve glutatyon peroksidazın yüksek konsantrasyonu ile gerçekleştirilir; bununla birlikte, birkaç biyokimyasal yolun aktive edilmesi için H_2O_2 eşik konsantrasyonunun üzerinde olmalıdır(144).(Tablo 5)

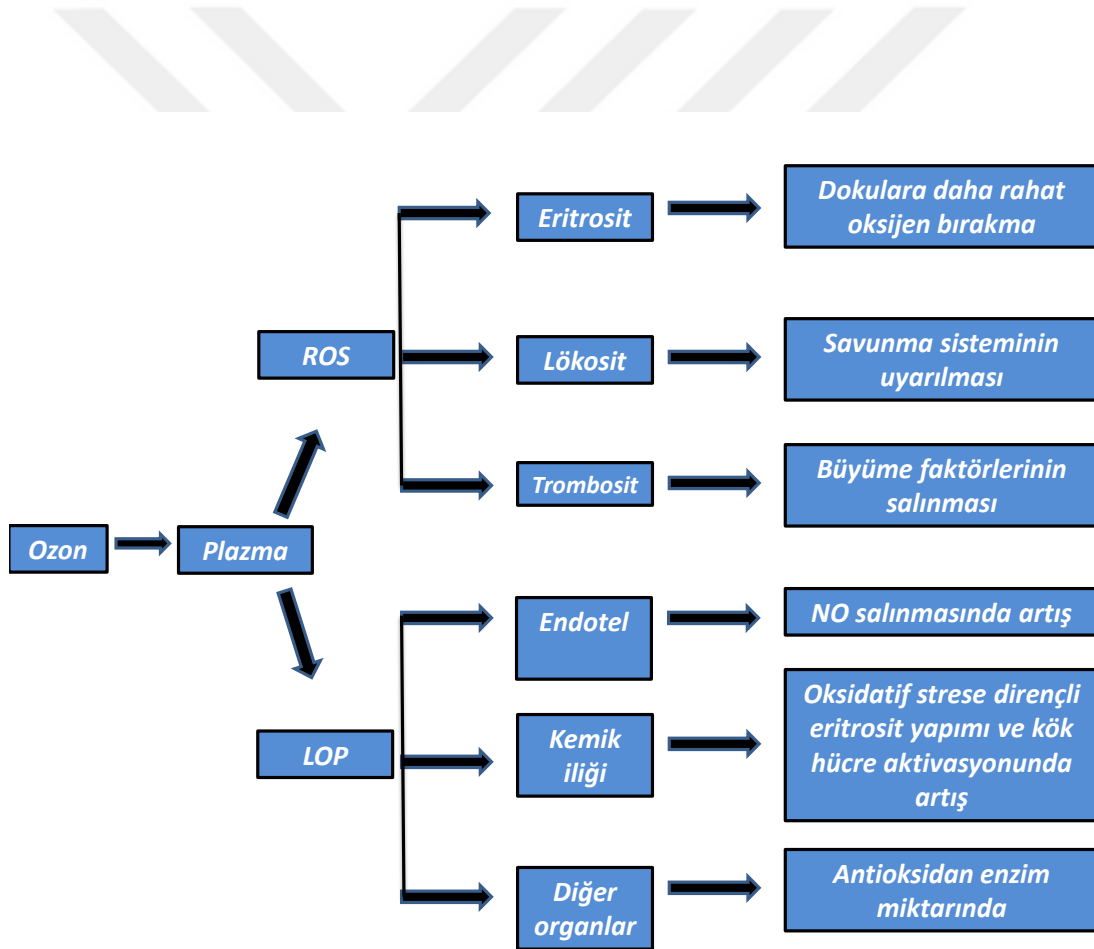


Şekil 7: Ozonun organik ortamlardaki temel reaksiyonu, PUFA-çoklu doymamış yağ asitleri (Polyunsaturated fatty acids), LOP-lipit oksidatif ürünleri (Lipid oxidation products), ROS-reaktif oksijen türleri(34)

d) LOP oluşumu, plazmada bulunan PUFA'nın peroksidasyonunu takiben gelişir(şekil 7). PUFA; heterojen olup lipoperoksitler, alkoksil radikaller, lipohidroperoksitler, izoprostanlar ve alkenaller olarak sınıflandırılabilir; bunların arasında 4-hidroksi- 2,3 transnonenal ve malondialdehit sayılabilir. Radikaller ve aldehytler esasen toksiktirler ve çok düşük konsantrasyonlarda oluşmalıdır. Bu radikaller ROS'dan çok daha kararlı yapıdadır ancak neyse ki, kana karıştıklarında, vücut sıvıları, idrar ve safra yoluyla atılımda belirgin miktarda seyreltilir ve GSH-transferaz ve aldehyd dehidrojenazlar tarafından metabolize edilirler. Bu nedenle, sadece submikromolar konsantrasyonları, akut oksidatif stres sinyali oluşturacak şekilde, özellikle kemik iliği, karaciğer, merkezi sinir sistemi, endokrin bezlere ulaşabilirler. Bu şekilde organlarda düşük derecede oksidatif strese neden olurlar(145). Ayrıca LOP'lar hem oksijenaz-1(HO-1) gibi oksidatif stres proteinlerini de indükler. HO-1 hem molekülünü parçalayarak antioksidan özellikteki bilirubin ve karbonmonoksit(CO) oluşumunu sağlar(146). Oksidatif stres sonrası HO-1'in indüksiyonu birçok çalışmada en önemli antioksidan koruma enzimden biri olarak tanımlanmıştır. Tedaviler boyunca LOP, kemik iliği mikro ortamlarında akut oksidatif stres faktörleri olarak davranarak metalloproteinazların salınımını aktive edecek ve bu şekilde özellikle kök hücrelerin ayrılmasını ve dolaşıma katılmasını sağlayabilecektir.(Tablo 5) Bu hücreler, yaralanma (travma veya iskemik dejeneratif olay) gerçekleşen yerlere göç edebilir. Bu yöntem, kemik iliği toplamaya doğal, düşük maliyetli ve etkili bir yenilik getirdiği için öneme sahiptir(34).

Submikromolar LOP seviyelerinin uyarıcı ve faydalı olabileceği, bunun yanında yüksek düzeylerin toksik olduğu vurgulanmaktadır. Birçok deneysel veriye(145) dayanan bu sonuç, optimum ozon konsantrasyonlarının terapötik bir sonuç elde etmek için kritik olduğunu

gösterir. Çok düşük konsantrasyonlarda pratik olarak yararsızdır. Doz çok yüksek olursa negatif bir etki (bitkinlik, yorgunluk) ortaya çıkarabilir. Toksikite olmaksızın, biyolojik etkileri tetikleyebilen akut, tamamen geçici oksidatif stres yaratmak için, dozun eşik seviyesinin biraz üzerinde olması gerekir. Sonuç olarak, hem kanda, hem de intradiskal ya da kas dokusunda ozonlama prosesi akut bir oksidatif stres oluşturmaktadır. Bununla birlikte, ozon dozu dikkatli hesaplandığı sürece, zararlı değildir, hatta birçok yararlı biyolojik tepki ortaya çıkarma yeteneğine sahiptir. Yaşlanma, kronik enfeksiyonlar, şeker hastalığı, ateroskleroz, osteonekroz, hepatik iskemi ve kansere karşı yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir (34, 147-149). Ozon tedavisi süresince antioksidan enzimlerin ve HO-1 düzeyinin arttığı bulguları çalışmalar ile desteklenmektedir. Bu sayede viral enfeksiyonların, iskemi ve hücre dejenerasyonunun üstesinden gelebileceği öne sürülmektedir (149).



Şekil 8: Ozon tedavisinin metabolik etkileri (150)

2.4.5. Oksidatif Stres ve Antioksidan Sistem

Kararlı atomlarda elektronlar çiftler halinde bulunur. Ancak atom, molekül ve iyonlarda, eşleşmemiş elektron varsa diğer moleküller ile çok hızlı bir şekilde elektron alışverişi yaparlar. Bu moleküllere 'reaktif oksidan türleri(ROS)' denir. Sıklıkla lipit yapılarla oluşmasına karşın organizmada birçok yolla ROS oluşabilir.(tablo 5) H_2O_2 , çiftlenmemiş elektron taşımamasına rağmen, membranlardan rahatlıkla geçip hücrelerde birçok fizyolojik etkiler oluşturabilir. H_2O_2 , süperoksit(O_2^-), hidroksil(OH^-) ile birlikte reaktif oksijen türleri olarak adlandırılır. Bir başka ROS grubu 'singlet oksijen' olarak adlandırılan ve orbitallerinde eşleşmiş 2 adet elektron bulunduran moleküldür.(Tablo 2) Singlet oksijen hücre mebranındaki doymamış yağ asitleri ile hızlı bir şekilde reaksiyona girer ve lipit peroksidleri oluşturur(151).

Tablo 5: Reaktif oksijen türleri(152)

1. Radikaller
<ul style="list-style-type: none">• Süperoksit radikal (O_2^-)• Hidroksil radikal(OH^-)• Alkoksil radikal(LO^-)• Peroksil radikal(LO^-)
2. Radikal olmayanlar
<ul style="list-style-type: none">• Hidrojen peroksit(H_2O_2)• Lipid hidroperoksit($LOOH^-$)• Hipoklorik asit($HOCl$)
3. Singlet oksijen (1O_2)

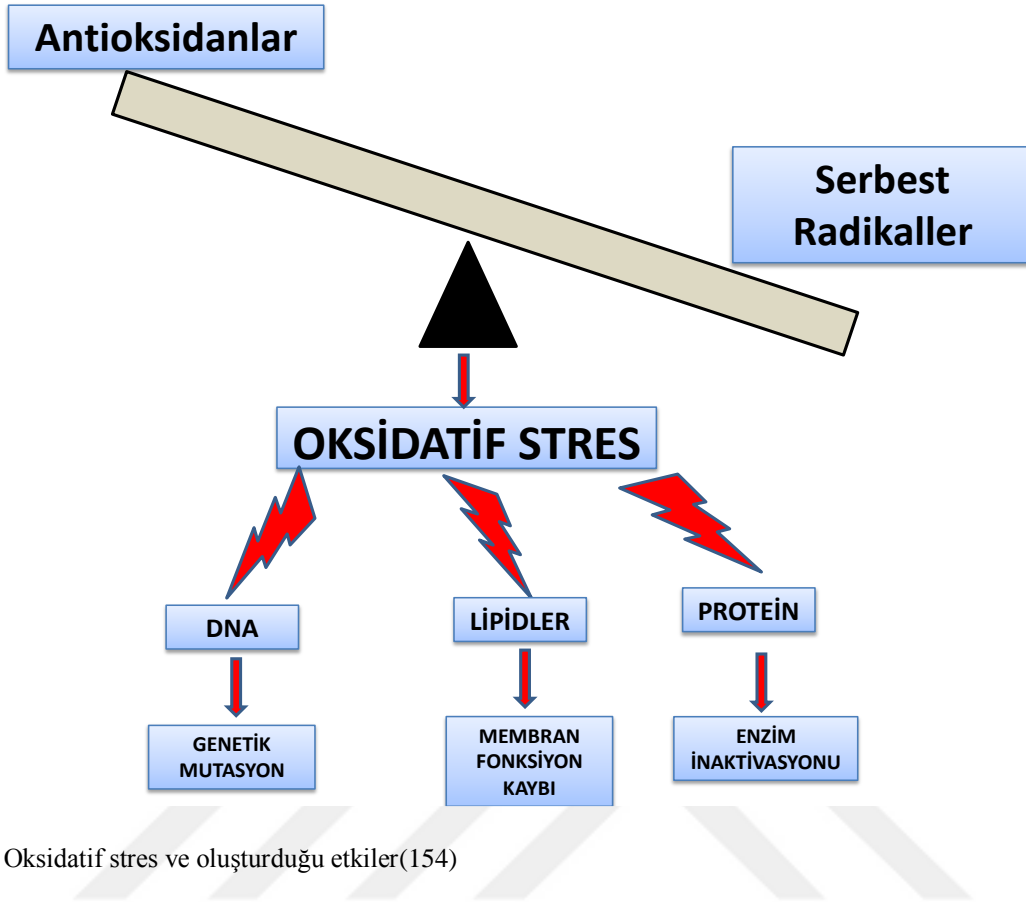
2.4.5.1. Reaktif Oksidan Türü Kaynakları

Aerobik hayat için gerekli olan oksijen molekülü, solunum ve enerji metabolizması için zorunlu olmasının yanı sıra bazı olumsuz durumlara da neden olmaktadır. Oksijenli solunumda ve birçok anabolik ve katobolik reaksiyon mitokondrilerde gerçekleşirken, molekül seviyesinde elektron kaçışları meydana gelir. Bu şekilde ROS'lar oluşur(153).(Tablo 6)

Tablo 6: Metabolik ROS kaynakları(153)

1. Normal Biyolojik İşlemler
<ul style="list-style-type: none">• Oksijenli solunum• Anabolik ve katabolik işlemler
2. Oksidatif Stres Yapıcı Durumlar
<ul style="list-style-type: none">• İskemi, hemoraji, travma, radyoaktivite, intoksifikasyon• Ksenobiotik maddelerin etkisi(ilaç, alkol vb)• Stres ile artan ketakolamin oksidasyonu• Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma(monosit, makrofaj vb)• Uzun süreli metabolik hastalıklar• Diğer nedenler(sıcak şoku, güneş ışını, sigara)
3. Yaşlılık

Hemoraji, iskemi, travma ve radyoaktivite mitokondrideki dengeleri bozmak suretiyle daha fazla ROS oluşmasına neden olur. Ayrıca yaşlanma ile birlikte organik reaksiyonlarda aktif olan enzimlerin azalması ile ROS miktarı artar.(Tablo 6) Diabet hastalığında kandaki glikoz seviyesi uzun süre yüksek seyredir. Glikoz molekülü proteinlerle reaksiyona girerek ROS miktarını arttırarak hastalarda 'oksidatif stres' oluşturur. Ayrıca enfeksiyon ile vücudun mücadele etmesi için ihtiyaç duyulan ROS'lar gerektiğinden fazla salgılanırsa faydadan ziyade zarara neden olabilir(152).



Şekil 9: Oksidatif stres ve oluşturduğu etkiler(154)

2.4.5.2. Antioksidan Savunma

Organizmayı oluşturan yapıların (karbonhidrat, lipid, DNA v.b.) ROS'lar tarafından oksidasyon riski yaşam boyu devam etmektedir. Bu durumu engelleyen ya da geciktiren maddelere antioksidan ve bu sürece de antioksidan savunma adı verilir. Hücre içi ve hücre dışı antioksidan ajanlar vardır.(151).(Tablo 6)

Tablo 7: Hücre içi ve hücre dışı antioksidanlar(151)

1. İn Vivo- Hücre İçi Antioksidanlar
<ul style="list-style-type: none">• Süperoksit Dismutaz• Katalaz• Glutasyon Peroksidaz
2. İn Vivo- Hücre Dışı Antioksidanlar
<ul style="list-style-type: none">• E ve C Vitamini• Transferrin• Haptoglobin• Seruloplasmin• Albumin• Bilirubin• P – Karoten• A-L Antitripsin

2.4.6. Ozonun Klinik Kullanım Yolları

Topikal ozon tedavisi, tıp alanında ilk ozon uygulama yöntemidir. Dezenfekte etmek için yüksek konsantrasyonda, epitelizasyon ve iyileşmeyi hızlandırmak için düşük konsantrasyonda kullanılmaktadır. Ozon solunum yolu hariç birçok yoldan kullanılabilir(34).(Tablo 8)

Tablo 8: Medikal ozon uygulama yöntemleri(34)

Eksternal uygulama yöntemleri
<ul style="list-style-type: none">• Ozonlu antiseptik salinlerin kullanımı• Ozonlu merhemler ve ozonlanmış bitkisel yağların uygulanması• Alçak basınç altında ozon ile havalandırılan plastik torbalar (Gaz torbaları)• Balneoterapi
Parenteral uygulama yöntemleri
<ul style="list-style-type: none">• Ozonlanmış kanla major ve minör otohemoterapi• Ekstrakorporal plazma ve lenf tedavisi• Biyolojik olarak aktif noktalardaki deri altı ozon enjeksiyonları• Paravertebral, intramüsküler enjeksiyonlar• Ozonlanmış fizyolojik çözeltinin intravenöz infüzyonları• Bölgesel uygulamalar(nasal, tubal, aurikular, oral, nazal, vajinal, rektal)

2.4.6.1.Major otohemoterapi

Bu protokolda, hastadan 200-270 cc kan alınmasını takiben uygun doz kabın içine verilir. 5-10 dakika beklendikten sonra, 15 dakika süre zarfında ozonlanmış kan damar yoluyla hastaya tekrar geri verilir. Ozon dozu olarak, 15-80 µg/ml tavsiye edilmektedir. 90 µg/ml üzerindeki dozlarda eritrositlerin %4-5 'i hemoliz olur. Antioksidan etkinin olduğu eşik değer 15-20 µg/ml olduğu rapor edilmiştir. Haftada iki seans yapılması tavsiye edilmektedir. Ancak uygun şartlarda iki günde bir hatta gerekli durumlarda günde üç seans bile yapılabileceği bildirilmiştir(34).

2.4.6.2.. Minor Otohemoterapi

Hastadan 5 ml kan alındıktan sonra aynı hacimde ozon ile karıştırılır. Daha sonra beklenilmeden gluteal bölgeye intramuskuler enjeksiyon yapılır(149).

2.4.6.3.Topikal Ozon uygulaması

Birinci Dünya Savaşı'nda yaralar oksijen ve ozon gazı karışımı kullanılarak tedavi edilmiştir. Güncel yaklaşımda bunun yanı sıra, ozonlanmış damıtık su, ozonlanmış yağ ve kremler de kullanılmaktadır. Günümüzde bölgesel ozon terapisi kutanöz ülserlerin/yaraların, yanıkların ve yüzeysel enfeksiyonların, osteomyelit, diyabetik ayak, yatak yaraları, herpes enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır(34).

2.4.6.4.Ozon gazı enjeksiyonu

Ozonun lipid oksidasyonu yapması özelliğiyle, bölgesel yağ eritme amacıyla direkt doku içerisine enjekte edilir. Ayrıca kas ağrılarında antienflamatuvar etkilerinden dolayı kas içerisine enjekte edilebilir(34).

2.4.6.5. Rektal uygulama

Bu yöntem damar yolu problemi olanlarda veya çocuklarda daha sık tercih edilir. Rektal olarak ozon-oksijen karışımı verilir. Yetişkin dozu 10-25 µg/ml olacak şekilde 150-300 ml, çocuklarda 10-20 µg/ml 10-30 ml hacminde gaz enjeksiyonu tavsiye edilir. Enjeksiyon rektal tüp aracılığıyla yavaş bir şekilde yapılmalıdır(141).

2.4.7. Ozon Tedavisinin Endikasyonları

Cerrahide ozon kullanımı

- Genel/diffüz/lokal peritonit peritonit
- Yumuşak dokunun kontamine yaraları
- Uzun kemiklerin osteomyeliti
- Artroampiyez(eklem boşluğuna cerahat birikmesi)
- Tropik/bası ülserleri
- Osteoartrit
- Perferik arter hastalığı

İç Hastalıklarda ozon kullanımı

- Ateroskleroz ve İskemik Kalp Hastalığı
- Hipertansiyon
- Diabet
- Kronik bronşit ve bronşial astım
- Kronik piyelonefrit
- "B" Tipi Kronik Gastrit
- Ülser
- Mide/Duedonum Ülseri
- Kronik Nonülseratif Kolit
- Kronik Hepatit
- Jinekolojik hastalıklar(adneksit, endometrit, parametrit, pelvioperitonitis gibi)
- Dermatolojik hastalıklarda(egzama, akneiform erüpsiyonlar, piyoderma, herpes, sedef hastalığı, mantar hastalığı)
- Nörolojik hastalıklar(kronik form serebrovasküler yetmezlikler, spinal osteokondroz nörolojik belirtileri, enflamatuar beyin hastalıkları, migren, iskemik ve kompresyon tipi mono- polinöropatileri)(155).

2.4.8. Ozon Tedavisinin Kontrendikasyonları

- Kan pıhtılaşma bozukluğu olan tüm vakalar
- Trombositopeni
- Ozon Allerjisi/intoleransı
- Hemorajik veya Apoptik İnme
- ACE inhibitörleri ile tedavi olan hastalar
- Gebelik(özellikle ilk dönem)
- Glikoz-6-fosfat-dehidrojenaz eksikliği (favizm)
- Hipertiroidi
- Ağır anemi
- Şiddetli miyasteni
- Aktif kanama(142, 149).

Ayrıca, düşük konsantrasyonlarda ozonun pıhtılaşmayı azalttığı bilinmektedir, bu nedenle kan pıhtılaşmasını azaltan tüm ilaçlar (antikoagülanlar, aspirin, vb.) Ozon tedavisi süresince kesilmelidir. Kadınlarda menstrüel dönemlerinde ozon tedavisine ara verilmelidir(155).

Çalışmamızın hipotezleri;

1- SVF, YKR bölgesine uygulandığında yeni kemik hacmi ve matürasyonu oluşturmada kök hücre kadar etkili olacaktır.

- SVF içerisindeki anjiogenetik antiapoptik sitokinler ve büyüme faktörleri sayesinde daha fazla kök hücre aktivasyonu, kemik dokusu üretileceği öngörülmüştür.

2- Ozon uygulamasının yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu bölgesinde kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ve daha matür kemik dokusu elde edilecektir.

- Ozon uygulaması ile YKR bölgesinin oksijenlenmesi, büyüme hormonlarının salınımı, antienflamatuar sistemin uyarılması ve kök hücre aktivasyonunun artışı sağlanarak daha fazla miktarda ve daha matür bir kemik dokusu oluşması beklenmektedir.

3- SVF ile ozonun birlikte uygulanması sinerjik etkileşimi sayesinde, tek başına kullanımlarına ve kök hücre grubuna göre YKR bölgesinde daha fazla yeni kemik hacmi ve matür kemik oluşturacaktır.

- Ozon uygulaması, SVF içeriğinde bulunan progenitör hücreler, sitokin ve büyüme faktörleri üzerinde uyarıcı etki oluşturarak potansiyelize edecektir.

Ayrıca, çalışmaya pozitif kontrol grubu olarak yağ dokusu kaynaklı kök hücre dâhil edil

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışmada 2,5-3 kg ağırlığındaki 30 adet beyaz, erişkin, erkek Yeni Zelanda tavşanı (Saki Yenilli Deneysel Hayvanları Üretim Laboratuvarı, Ankara) kullanılmıştır. Bu çalışmanın deneysel aşamaları, deneklerin bakımı ve sakrifikasyonu Afyonkocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Çalışmada kullanılmak için yağ dokusu kaynaklı kök hücreler Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan elde edilmiştir. Örneklerin sterolojik ve immünohistokimyasal değerlendirilmesi Samsun 19 Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan titanyum bariyerler (Elektron Medikal, Ankara, Türkiye) yüksekliği 4 mm, iç çapı 8 mm, kenar kalınlığı 0,3 mm olan standart sertlikte düz yüzeyli kenarları kıvrık, yarım küre şeklinde ve üzerindeki 3 mm çapındaki deliğe uygun teflon kapak yaptırıldı.(Resim 2) Ozon üretmek için kullanılan medikal ozon cihazı(Turkozone® Blue S Medikal Ozon Jeneratörü, Ozon Sağlık Hizmetleri İç ve Dış Ticaret Sanayi Ltd.Şti, İstanbul)(Resim 1) dışarıdan temin edildi.

3.1.Etik Kurul

Çalışmaya başlamadan önce, 30.12.2015 tarih ve 49533702/128 sayılı Afyonkocatepe Üniversitesi Deneysel Hayvanları Etik Kurul onayı alınmış ve çalışma sırasında Afyonkocatepe Üniversitesi Etik Kurulu yönergelerinin 13. maddesinde belirtilen “Etik kurallara uygunluk esası” kararına uyulmuştur.

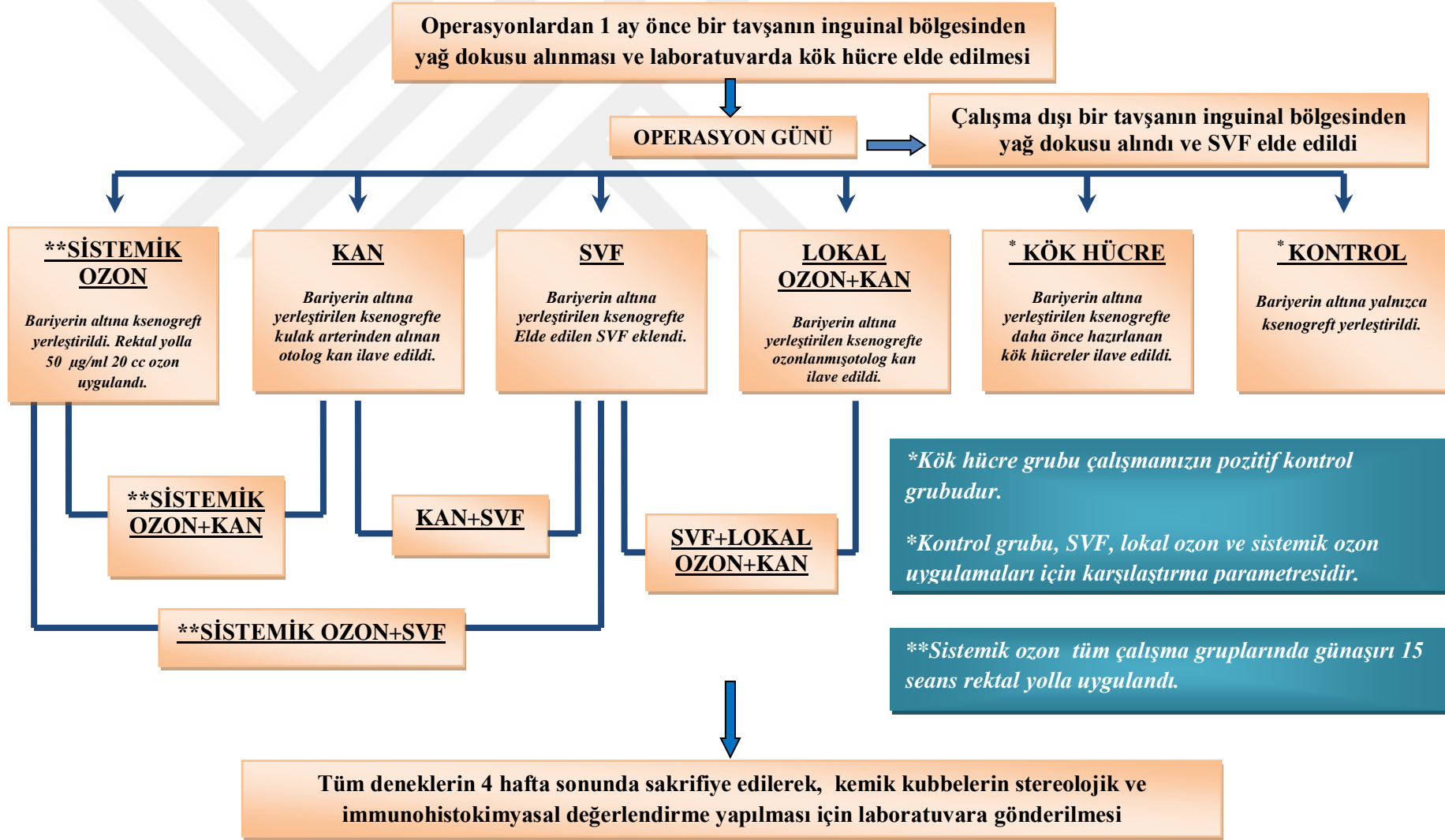
3.2. Deneysel Hayvanlarının Hazırlanması

Tavşanlar, birbirlerinden ayrı olacak şekilde standart deneysel kafesleri içerisine konuldu ve tavşanlara takip süresince hayvan odasında (22–24 °C, % 55–70 nem, 1 atm basınç, 12 saat aydınlık/karanlık oda) standart laboratuvar diyeti uygulandı. Tavşanların laboratuvar ortamına

uyum sağlayabilmeleri için, tavşanlar deneyden iki hafta önce kafeslerine yerleştirildi ve gözlem altına alındı.

3.3.Çalışma Dizaynı

Çalışmada kullanılacak denek sayısı, İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Bölümü'nde istatistiksel güç analizi sonrası belirlenmiştir. Benzer birkaç makale (65, 68) verileri referans olarak alınarak, istatistiksel güç tahmin edilmiştir. Gpower ver. 3.1.9.2. programına göre en az %80 istatistiksel güç için her grupta 4 örnek yeterli olmaktadır. Çalışmada denek kaybedilme riski göz önüne alınarak her grup için 6 adet örnek yapılmasına karar verilmiştir.



Şekil 10: Çalışma akış şeması ve grupların tanımı

Tablo 9: Çalışma ve kontrol grubu tablosu

Grup Adı	Örnek Sayısı
Kontrol	6
Sistemik ozon	6
Kök hücre	6
Lokal ozon+Kan	6
Kan	6
SVF	6
SVF-Lokal ozon+Kan	6
SVF-Kan	6
Sistemik ozon-Kan	6
SVF-Sistemik ozon	6

3.3.1. Cilt Altı Yağ Dokusunun Elde Edilmesi

Titanyum bariyerlerin yerleştirileceği operasyon günü, bir adet tavşan 50 mg/kg ketamin + 10 mg/kg xylazin karışımla uyutuldu. Denekler ameliyat masasına sırt üstü yatırılarak her iki kasık bölgesi tıraş edildi. Bölge daha sonra betadin solüsyonla temizlenerek sağ kasıktan sol kasık bölgesine kadar U şeklinde yapılan insizyonla cilt katı geçildi. Tavşanın kasık bölgesinde bulunan cilt altı yağ dokusunun tamamı cerrahi olarak alındı.

3.3.2. Yağ Doku Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Kültürü

Titanyum bariyerlerin yerleştirilmesinden yaklaşık bir ay önce, bir adet tavşanın inguinal bölgesinden alınan yağ dokusundan ayrıştırılan hücreler 25 cm² lik hücre kültür kabı içine alındı. Sonrasında bu hücrelerin 37 °C de ve %5 CO₂ koşulunda çoğalması ve konfluent olmasını sağlamak için % 15 fetal buzağı serumu (S0113, Biochrom, Berlin, Germany), 50 µgr./ml. Gentamisin (A2712, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. penisilin ve 100 UI/ml. Streptomisin (A2213, Biochrom, Berlin, Germany), 100 UI/ml. Amfoterisin (A2612,

Biochrom, Berlin, Germany) ve 200 mM L-glutamin (K0282, Biochrom, Berlin, Germany) içeren α -MEM (F0915, Biochrom, Berlin, Germany) kültür ortamına bırakıldı. Üç gün sonra kök hücreler ve yüzeye tutunmayan hücreler besi ortamının değiştirilmesi sonucu ortamdan uzaklaştırıldı. Daha sonra hücre kültür kabına yapışan hücrelerin vasatı konfluent olana kadar iki günde bir defa değiştirildi(156).

Yaklaşık 16-18 gün sonra, inverted mikroskop (IX71, Olympus, Japan) altında hücrelerin üremeleri kontrol edildi; kültür kabının tabanı %70-80 oranında hücre ile doldurulduğunda (%70-80 konflüente ulaşıldığında) alt-kültür (pasaj) işlemine geçildi. Birincil kültür sıfırıncı pasaj (P0) kabul edilerek, birincil kültürü takip eden her alt-kültür işlemi sonrası pasaj sayıları P1, P2, P3 şeklinde belirtildi(157). Çalışmamızda P3'teki hücreler Thoma lamında sayılarak her bir uygulama için 1×10^6 hücre olacak şekilde besiyeri içerisinde ppd enjektörlerinde hazırlandı.

3.3.3. Yağ Doku Kaynaklı Stromal Vasküler Fraksiyonun Elde Edilmesi

İşlem günü çalışma dışı bir tavşanın inguinal bölgesinden alınan yağ dokusu laboratuvarında makas ile petri kabına kıyıldı. Üzerine 20 ml amfoterisin B, penisilin ve streptomisin içeren Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (Sigma, USA) konuldu ve 2 dakika boyunca yağ dokusunun sıvıda askıda kalmasına izin verildi. Yağ dokusu sıvının üst fazında askıda kalıyor olmasından dolayı alttaki tüm sıvı uzaklaştırıldı. Bu işlem 5 kere tekrarlanarak kan ve diğer yapıları yağ dokusundan uzaklaştırıldı. Yağ dokusu 75 mm²'lik hücre kültür kabına aktarıldı. Üzerine HBSS içerisinde hazırlanmış % 0,2 kollajenaz solüsyonu(Sigma, USA) eklendi. 37 °C 'de 150 dakika karıştırılarak bekletildi. Fetal bovin serum ile kollajenaz inaktive edildi. 5000 rpm hızında 10 dakika santrifüj yapıp, üstte kalan sıvı atıldıktan sonra alttaki hücre pelleti ile çalışmaya devam edildi. Hücre pelleti içerisindeki eritrositleri uzaklaştırmak için 20 ml hücre liziz tamponu(Merck, USA) eklenip oda sıcaklığında 10 dakika beklemeye bırakıldı. Hücre süspansiyonu önce 40 mm çapa sahip delikli yapıdan süzdürüldü. Daha sonra 50 ml'lik tüpte toplanan hücreler 100 mm çapa sahip delikli yapıdan süzdürüldü. Böylelikle hücre dışındaki büyük yapılar uzaklaştırıldı. 5000 rpm hızında 5 dakika santrifüj yapılarak hücrelerin ayrılması sağlandı. Santrifüj sonrası en üstte

beyaz bulutumsu bir tabaka dikkatlice çekilip yeni bir tüpe aktarıldı. Bu hücre süspansiyonunun üstte kalan sıvı kısmı atıldıktan sonra tüpün tabanında bulunan pellet, mikropipet aracılığı ile taze bir şekilde titanyum bariyerlerin altına yerleştirildi(158).

3.3.4. Ozon Uygulaması

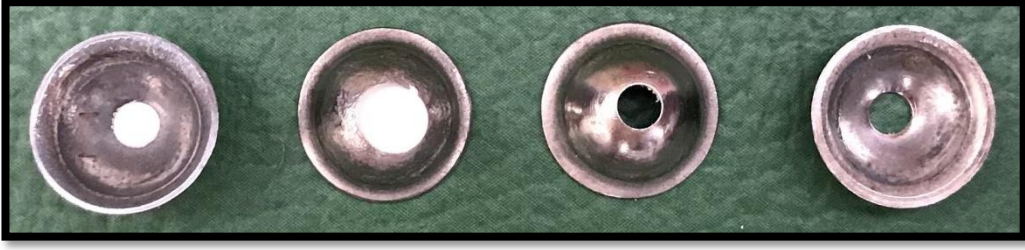
İşlem günü başlanmak üzere rektal olarak 50 µgr/ml, medikal ozon jeneratörü (Turkozone® Blue S Medikal Ozon Jeneratörü, Ozon sağlık Hizmetleri İç ve Dış Ticaret Sanayi Ltd.Şti, İstanbul)(Resim 6) ile lateks içermeyen silikonize enjektörlere(Resim 6) her hayvan için 20 cc gaz karışımı (%3 O₃ + %97 O₂) çekildi. Gaz konsantrasyonu 254 nm'de ayarlanmış dahili bir ultraviyole spektrofotometre kullanılarak ölçülmüştür. Kanül aracılığıyla rektal olarak ozon uygulaması her bir tavşan için günde bir, 2 dakika içerisinde ve kademeli bir şekilde gerçekleştirildi.(Resim 8) Rektal ozon uygulaması titanyum bariyerlerin yerleştirilmesinden sonraki 4 hafta boyunca günde bir, 15 seans uygulanmıştır. Ozon dozu ve uygulama yolu önceki çalışmalara göre belirlenmiştir(159-162).



Resim 1: Ozon enjektörü ve medikal ozon jeneratörü

3.3.5. Cerrahi Teknik

Titanyum bariyerler paketlenip 2,2 atm basınçta 134 °C’de 15 dakika otoklavda (ERS–5512 S, Eryiğit Tıbbi Cihazlar A.g. Ankara) steril edildi. Tüm cerrahi işlemler steril cerrahi koşullar altında asepsi, antisepsi ve sterilizasyon kurallarına dikkat edilerek gerçekleştirildi. Genel anesteziyi sağlamak için deney hayvanlarının hepsine Xylazine (Rompun, Bayer, Almanya) 10 mg/kg ve Ketamin hidroklorür (Ketasol % 10, Richter Pharma AG, Avusturya) 50 mg/kg enjeksiyonu intramüsküler yolla yapıldı. Anestezi sonrası, tavşanların kafatasları üzerinde insizyonun yapılacağı bölge tıraş edildi. Operasyon sırasında ve sonrasında 3 gün boyunca 24 saatte 1 kez olacak şekilde Baytril-K 50 cc I.M. (Rocephin, Roche, Basel, İsviçre) ve enjeksiyonu yapıldı. Operasyon sahası povidon iyot (Batticon standart solüsyon, Adeka, Türkiye) ile temizlendikten sonra steril örtüler ile operasyon sahası açıkta kalacak şekilde örtüldü. Tavşanın kafatası üzerinde, orta hat boyunca yaklaşık olarak 4 cm uzunluğunda longitudinal deri insizyonunu takiben periost kesilerek, tam kalınlıklı kutanöz flep kaldırılıp tavşanın kafatası kemiği açığa çıkartıldı.(Resim 2) Bariyerin ortasında kalacak kemikte kanlanmayı sağlamak amacıyla, kortikal kemik üzerinde, serum fizyolojik soğutması altında çapı yaklaşık 1,5 mm olan çelik rond frezle çift taraflı olarak 9’ar tane delik açıldı.(Resim 4) Bariyerler orta suturen her iki yanında birer tane olacak şekilde, her tavşan için iki adet yerleştirildi. Bariyerler kafatasına, doku yapıştırıcısı olan NBSA (Histoacryl®, B. Braun, Melsungen, Almanya)(Resim 3) kullanılarak sabitlendi.(Resim 5) Bu işlem ile aynı zamanda, titanyum bariyerlerin içerisine yumuşak doku invazyonunun da engellenmesi sağlandı. Kontrol grubunda, kemikte sadece dekortikasyon işlemi yapılarak titanyum bariyerler ile sentetik kemik grefti (Suprabone, 1-2 mm, BMT CALSIS Sağlık Teknolojisi, Ankara, Türkiye) yerleştirildi. Deney grubundakilerde ise titanyum bariyerlerin içerisine; tavşanın kulak arterinden alınan kendi kanı (Resim 6) yani otojen kan ile kemik grefti, sentetik kemik grefti ile lokal ozon uygulaması, kemik grefti ile sistemik ozon uygulaması, sentetik kemik grefti ile stromal vasküler fraksiyon (SVF) ve bu materyallerin kombinasyonları kullanıldı. Yapılan çalışma uygulamaları ve hayvan sayıları Tablo 9’da gösterilmiştir. Titanyum bariyerler NBSA ile tavşanın kafatasına fikse edildikten sonra, deney gruplarındaki uygulamalar bariyerlerin üzerindeki delikten yerleştirildi.(Resim 7) Delikler teflon kapak ile kapatılacak ve sonrasında teflon kapağın fazla olan kısmı çelik separe ile kesilerek çıkartıldı. Titanyum bariyerlerin kapladığı hacimden dolayı dikilmesi imkansız olan periost dikilmeden bırakıldı. Cilt ve cilt altı dokular 3/0 poliglaktin 910 (Vicryl, Ethicon, ABD) ile dikildi. Cerrahi işlem sonrası üç gün boyunca analjezi sağlamak için diclofenac sodyum 2,5 mg/kg subkütan ve Enrofloxasin %5 çözelti intramusküler yolla 24 saatte bir 3 gün boyunca verildi.



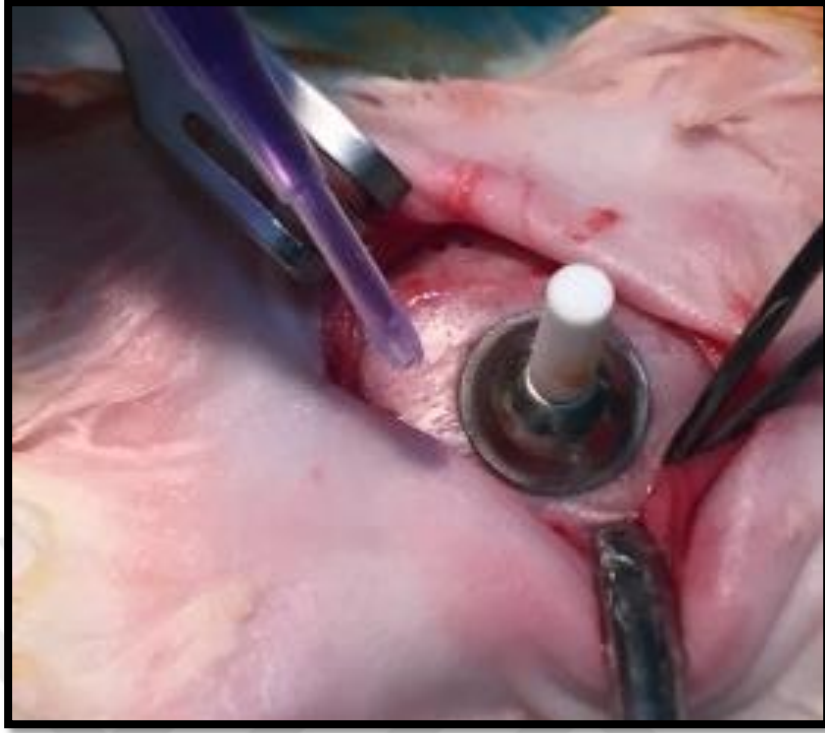
Resim 2: Titanyum bariyer ve teflon kapak



Resim 3: N-butil-2 siyanoakrilat (Histoacryl®)



Resim 4: Cerrahi bölgenin açılması, dekortikasyon yapılması



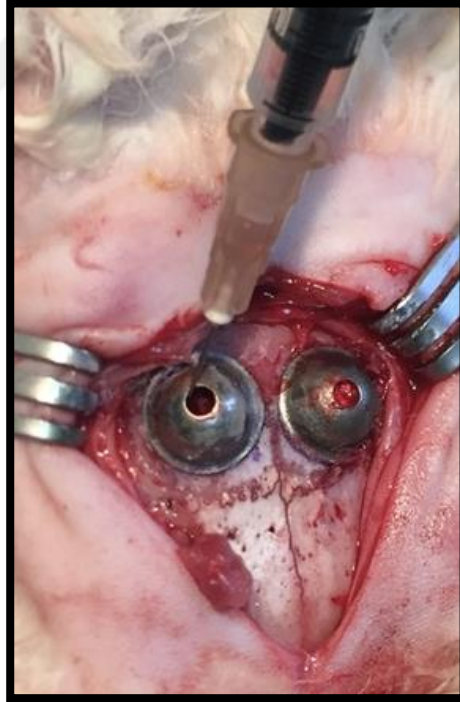
Resim 5: Bariyerlerin kafatasına, doku yapıştırıcısı olan NBSA ile sabitlenmesi



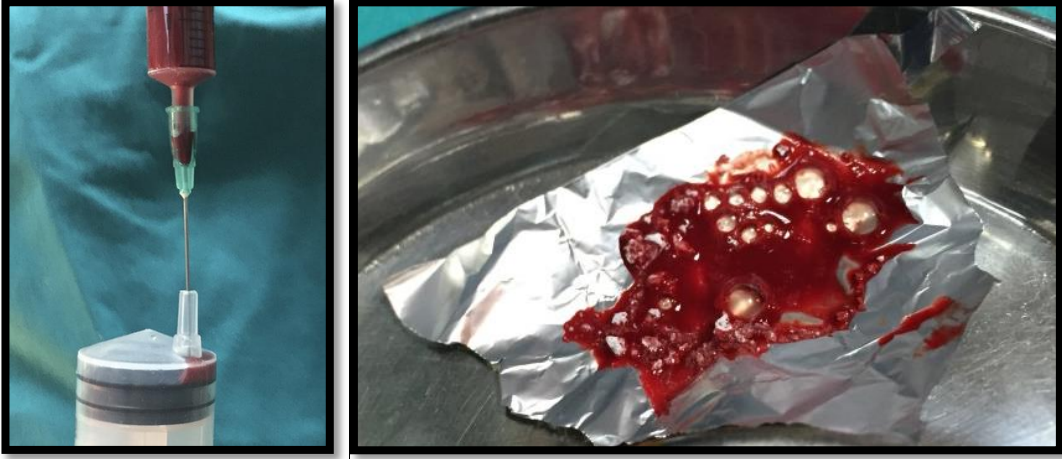
Resim 6: Kulak arterinden kan aspirasyonu



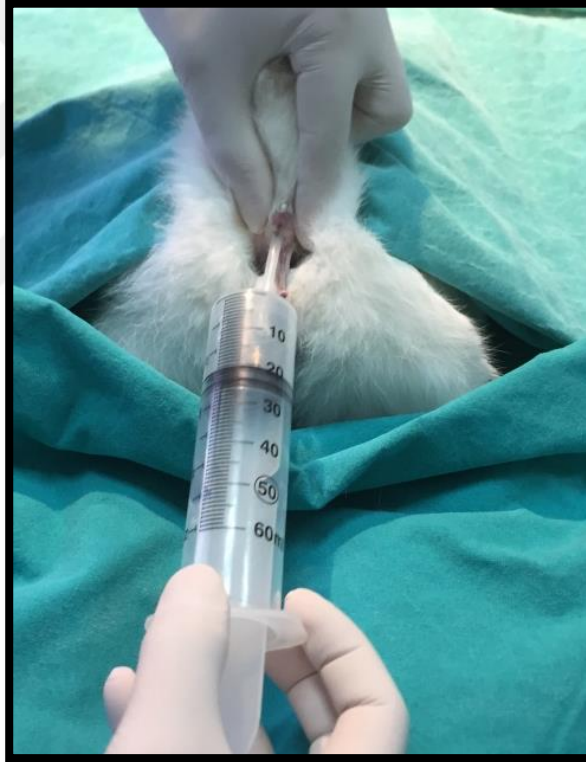
Resim 7: Greft ile kök hücre ve SVF'nin karıştırılması ve titanyum bariyerin içine uygulanması



Resim 8: Kök hücre ve SVF'nin uygulanması



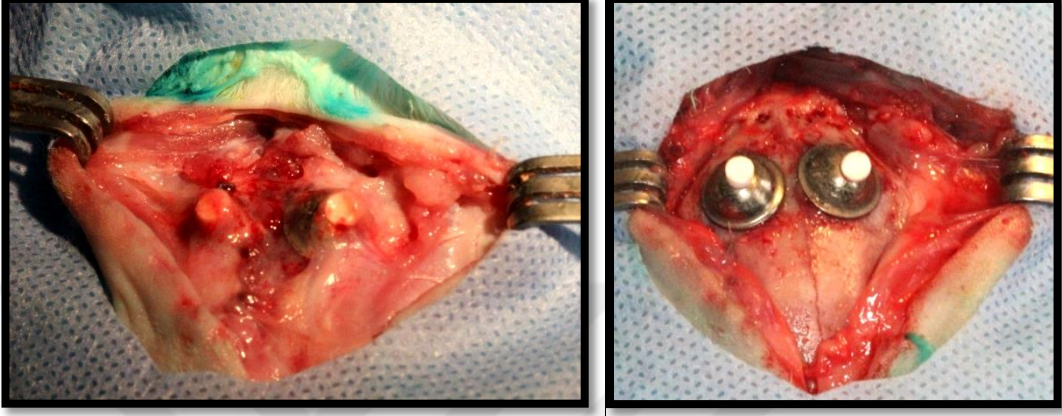
Resim 9: Kanın ozonlanması ve ozonlanmış kanın greft ile karıştırılması işlemi



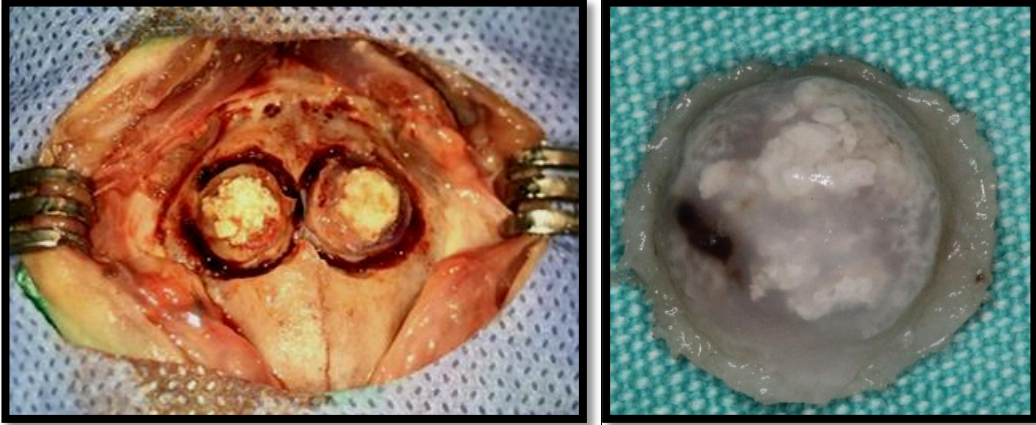
Resim 10: Rektal ozon uygulanması

Tavşanlar 30. günde yüksek dozda (200 mg/kg) intrakardiyak yolla verilen Ketamin Hidroklorür (Ketalar-Eczacıbaşı) ile sakrifiye edildi. Ötenazi sonrasında tavşanların kafa derileri periost ile beraber kesildi ve sonrasında deri ve deri altı dokular disseke edilerek bariyerler açığa çıkartıldı. (Resim 11) Titanyum bariyerler kemik bloğundan ayrıldı. Sonrasında kafatası serum

fizyolojik soğutması altında frez ile kesilerek titanyum bariyer ile birlikte iki adet kemik bloğu elde edildi.(Resim 12) Örnekler % 10' luk tamponlanmış formaldehit dolu biyopsi kaplarında muhafaza edildi.



Resim 11: Titanyum bariyerlerin açığa çıkartılması



Resim 12: Titanyum bariyerlerin çıkartılarak frez ile kemikten ayrılması

3.3.6. Histolojik Değerlendirme

Gruplardan elde edilen kalvaryum örnekleri %10'luk formolde (10 ml % 40'lık formaldehit, 90ml distile su) 10 gün boyunca fikse edildikten sonra % 5'lik formik asit solüsyonu içerisinde, üç günlük periyotlarda değiştirilerek, 21 gün boyunca dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon sonrasında distile su ile yıkanan dokular doku takip işlemine tabi tutuldu.(Tablo 11) Öncelikle dehidrasyon amacıyla alkol serilerinden (%70-%80-%96-%100) geçirildi. Sonrasında ksilen serileri ile şeffaflaştırma yapılarak parafinde bekletildi. Sonrasında 58°C'deki parafin kullanılarak dokular bloklandı.(Tablo 11)

Tablo 10: Parafin takip protokolü

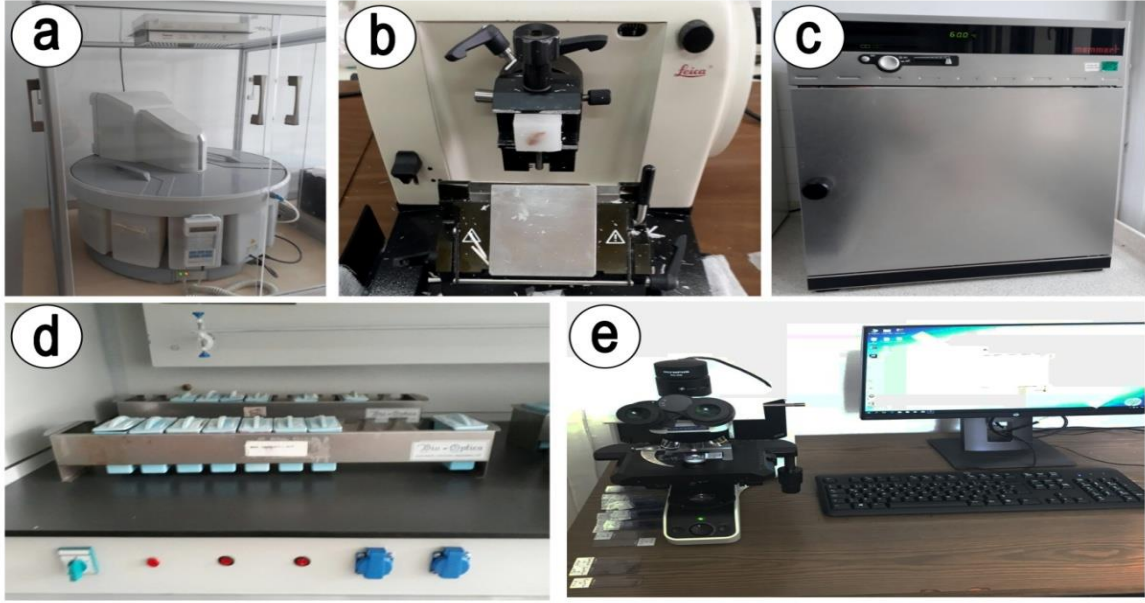
İşlem	Kullanılan Madde	Süre
Tespit	%10 formalin	7 gün
Dekalsifikasyon	%5 formik asit	21 gün
Dehidratasyon	%70 Alkol	1 saat
	% 80 Alkol	1 gece
	% 96 Alkol	1 saat
	% 96 Alkol	1 saat
	% 100 Alkol	1 saat
	% 100 Alkol	1 saat
Şeffaflaştırma	Ksilen	½ saat
	Ksilen	½ saat
İnfiltrasyon	Ksilen-parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
	Parafin	1 saat
Gömme	Parafin	

Bloklardan sistematik rastgele örnekleme kuralına uygun olarak 1/30 örnekleme ile stereolojik analizler için tek kullanımlık çelik bıçaklar ve Leica RM 2125RT rotary mikrotomu (Leica, Nussloch, Germany) kullanılarak 7 µm kalınlığında koronal kesitler alındı.(Resim 13) Elde edilen kesitler, deparafinizasyon için bir gece boyunca 60°C etüvde bekletildi.(Resim 13) Ardından ksilen serileri ile deparafinizasyon işlemine devam edildi.

Sonrasında kesitler alkol serilerinden (%100-%96-%80-%70) geçirilerek dehidrasyon işlemine tabi tutuldu. Deparafinizasyon sonrası kesitler ve ksilende deparafinize edildikten sonra dehidratasyon işlemi hematoksilen-eozin (Harris'in Hematoksileni) yöntemi ile boyanarak kanada balsamı ile kapatıldı. (Tablo 12)

Tablo 11: Boyama protokolü

İşlem	Kullanılan Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C Etüv	1 gece
	Ksilen	5 dakika
Deparafinizasyon	Ksilen	5 Dakika
	Ksilen	5 Dakika
Rehidratasyon	%100 Alkol	5 Dakika
	%96 Alkol	5 Dakika
	%80 Alkol	5 Dakika
	%70 Alkol	5 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Boyama	Hematoksilen	10 Dakika
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Diferansiyasyon	Asit-alkol	1 Saniye
Yıkama	Akarsu	5 Dakika
Boyama	Eozin	2 Dakika
	Akarsu	5 Dakika
	%80 Alkol	1 Saniye
Yıkama	%96 Alkol	1 Saniye
	%96 Alkol	1 Saniye
	Ksilen	1 Saat
Kapama	Entellan	



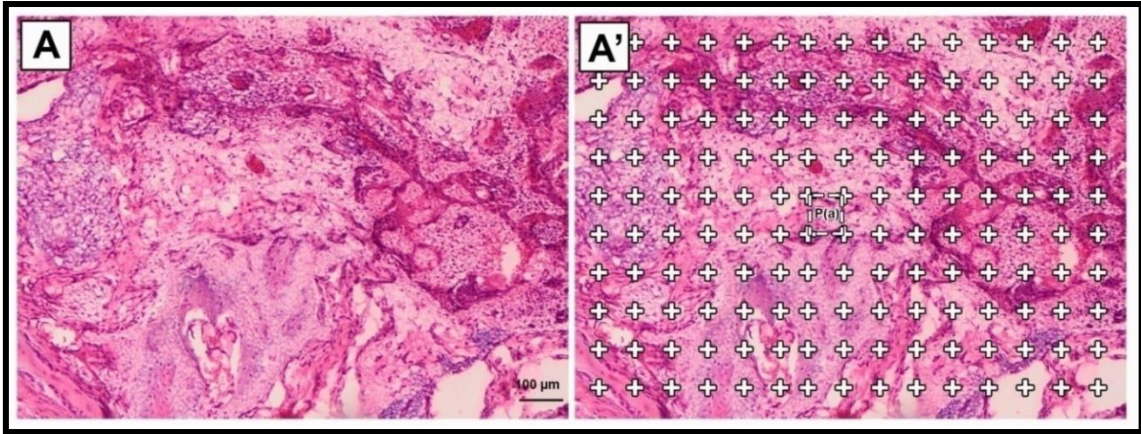
Resim 13: a: doku takip cihazı, b: mikrotom, c: etüv, d: hematoksilen & eozin boyama seti, e: kamera ataçmanlı mikroskop ve görüntüleme sistemi.

3.3.6.1.Stereolojik Değerlendirme

Stereolojik analizler için sistemik rastgele örnekleme kuralına göre 1/30 örnekleme ile alınan 7 µm kalınlığındaki transvers kesitler kullanıldı(163, 164) Bu örnekleme, stereolojinin etkinlik prensibine uygun olarak yapılan bir pilot çalışma ile ‘‘hata katsayısı (HK)’’ hesaplanarak belirlendi. Tüm kesitlerden x10 luk büyütmede kamera ataçmanlı ışık mikroskopunda (Olympus, Center Valley, Carl Zeiss, Germany) görüntüler alındı.(Resim 13) Elde edilen resimler üzerindeki bağ doku hacmi, yeni kemik hacmi, kapiller hacmi ve 87 x 87 µm² lik ‘‘noktalı alan ölçüm cetveli’’ kullanılarak Cavalieri prensibine (165)göre hesaplandı. İlgili yapıların hacmi (V); düşen toplam nokta sayısı (Σp), bir noktanın temsil ettiği alanın [p(a)] ve kesit kalınlığının (t) çarpımı ile aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır(166) (Şekil 11):

$$V = \Sigma p \times [p(a)] \times t$$

Ayrıca her gruba ait ‘değişim katsayısı (DK)’ değerleri hesaplanarak uygun sayıda hayvan analiz için kullanılmıştır. Uygun DK, her grup için ≤ % 20 olarak hesaplanırken, uygun HK, her hayvan için ≤ 0.05 olarak kabul edilmiştir(166)

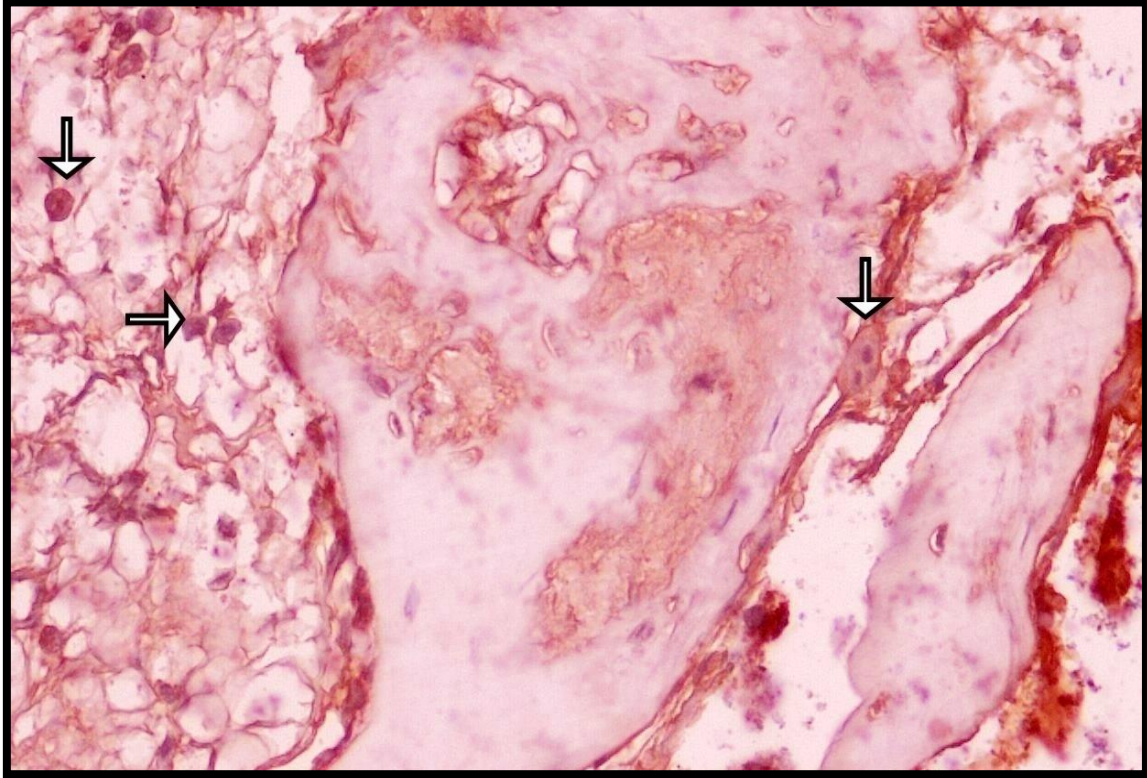


Şekil 11: Hematoksilen& Eozin ile boyanan kesitlerden elde edilen görüntüler üzerinde noktalı alan cetveli kullanılarak(A') Cavalieri yöntemi(165) ile hacim hesabı yapıldı. P(a): bir noktanın temsil ettiği alan.

3.3.6.2. İmmünohistokimyasal Boyama

Histolojik takip sonrası elde edilen 5 µm kalınlığındaki kesitler 1 saat etüvde tutulduktan sonra 10'ar dakika boyunca 3 farklı ksilen solüsyonunda tutuldu. Sonrasında alkol serilerinde dehidrate edildikten sonra akarsuda 5 dakika bekletildi. Dokudaki intrinsik peroksidin uzaklaştırılması için numune % 0,3 H₂O₂ çözeltisi ile reaksiyona sokuldu. Kesitler deparafinizasyon ve rehidratasyon işlemlerinin ardından 0.01 M sodyum sitrat solüsyonu (pH 6.0) içinde, 500 Watt mikro dalga fırında 5 dakikalık iki döngüde tutuldu. Sonrasında sitrat solüsyonunda soğumaya bırakılan dokular sırasıyla 0.2 M fosfat tamponu ve distile su ile yıkandı. Daha sonra kesitler 1 gece boyunca +4 °C'de primer antikorlarla (anti-RANKL: 1: 200, anti- BMP 7 ve anti BMP 2: 1:100) reaksiyona sokularak bekletildi. Sonrasında biyotinlenmiş sekonder antikor kullanılarak (Sigma Aldrich, A.B.D.) 2 saat inkübasyonu sağlandı. 0.2 M Fosfat tamponunda yıkandıktan sonra Avidin-biyotin kompleksi (Sigma Aldrich, A.B.D.) ile numuneler, solüsyonu ile oda sıcaklığında (22±2 °C) 30 dk boyunca inkübe edildi. Substrat kromojen solüsyonu (Diaminobenzidin, DAB) (Sigma Aldrich, A.B.D.) kullanılarak 5 dakika süresince uygun reaksiyon sağlandı. Çeşme suyu ile reaksiyon durduruldu. Zemin boyanması için Mayer's Hematoksilen (Merck, Almanya) kullanıldı. Pozitif boyanan hücreler kahverengi olarak ışık mikroskopik düzeyde gözlemlendi (Resim x).

Kesitlerde gözlemlenen immünohistokimyasal RANK, BMP-2 ve BMP-7 reaktivitesi histolojik skorlama yapılarak değerlendirildi. %25'den az olan zayıf boyanmış pozitif hücreler (+) ile, %25 ile %50 arasındaki orta derecede boyanmış pozitif hücreler (++) ile, %50'den fazla olan yoğun boyanmış pozitif hücreler ise (+++) ile gösterildi.



Resim 14: 5 µm kalınlığındaki örnek kesitte RANKL pozitif hücreler beyaz ok ile gösterilmiştir. (Orijinal büyütme: x400)

RANKL, reseptörü olan RANK'a bağlanarak öncül ve olgun osteoklastları uyarır. RANKL, osteoklast oluşumunun yanı sıra apoptozun inhibisyonunu sağlamaktadır(167). RANKL kemik kaybı ve rezorpsiyonunu artırır(168). RANKL-RANK sinyali osteoklast düzenlenmesinde önemlidir(169). Kemik morfogenezik proteinler (BMPs) TGF- β süper ailesinin bir üyesidir. Kemik oluşumunda prototip olarak yer alırlar, ancak hücre proliferasyonunu, farklılaşmasını, morfogenezisini ve apoptozlarını düzenleyebilen çok fonksiyonlu sitokinler olduğu da gösterilmiştir(170). BMPs arasında BMP-2, 4, 5, 6, 7 ve 9 yüksek osteojenik aktivite sergiler(171-173). BMP-7, alkalen fosfataz gibi osteoblastik farklılaşma belirteçlerinin ekspresyonunu indükler ve kalsiyum mineralizasyonunu hızlandırır(174, 175)

3.3.7. İstatistiksel Değerlendirme

Gruplara ait veriler SPSS 20.0 for Mac (IBM Corporation) istatistik programı kullanılarak değerlendirildi. Grupların karşılaştırılmasında One Way ANOVA (Tukey Post-Hoc Test) testi kullanıldı ve 0.05 anlamlılık derecesi (p) baz alındı. Normal dağılım göstermeyen gruplarda, Kruskal-Wallis yapıldı.

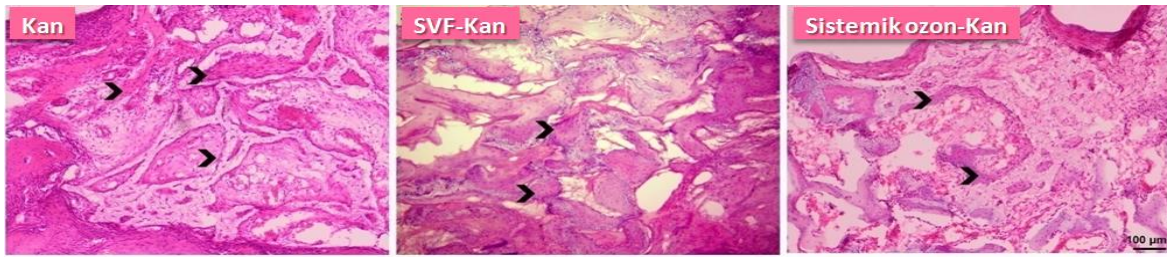


4. BULGULAR

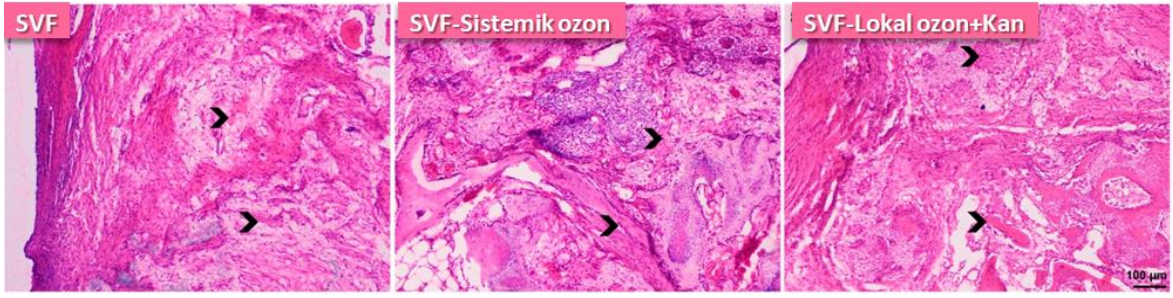
4.1. Klinik Bulgular

Genel anestezi sonrası anesteziye bağı olarak tavşan kaybı yaşanmadı. Operasyon sonrası tavşanların haftada 1 defa olmak üzere düzenli olarak yapılan ağırlık ölçümlerinde, deneklerden bazılarının ilk hafta sonunda 100–150 g kadar kilo kaybettikleri, sonraki haftalarda ise kilo almaya devam ettikleri ve operasyon sonrası ortalama 3–3,5 kg oldukları görüldü. Deneysel çalışma süresince tavşanların uygulanan cerrahi işlemi iyi tolere ettiği, beslenmeleri açısından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği, operasyona bağı herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve deneklerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlendi. Sakrifikasyon sonrasında yapılan klinik değerlendirmede cerrahi operasyon sırasında dikilmeden bırakılan periostun titanyum bariyerleri tamamen kapladığı görüldü. Titanyum bariyerlerin durumlarının ise gayet iyi oldukları gözlemlendi. (Resim 11)

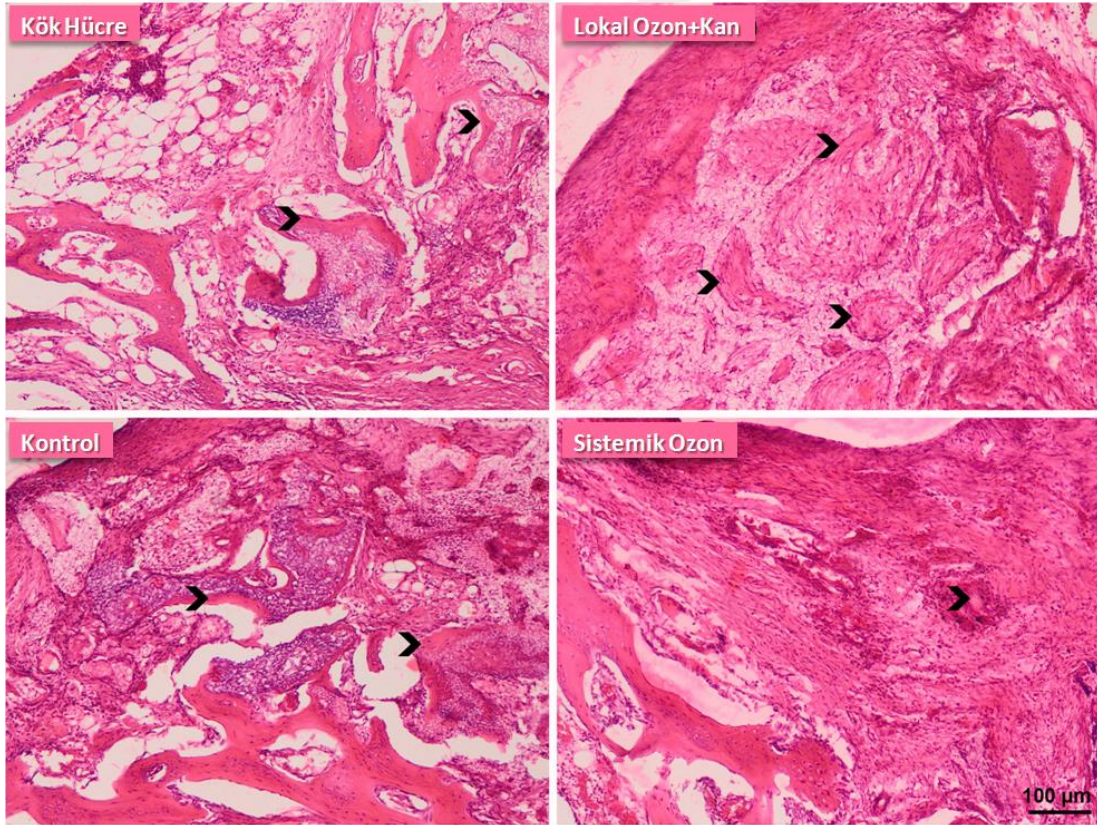
4.2. Stereolojik Bulgular



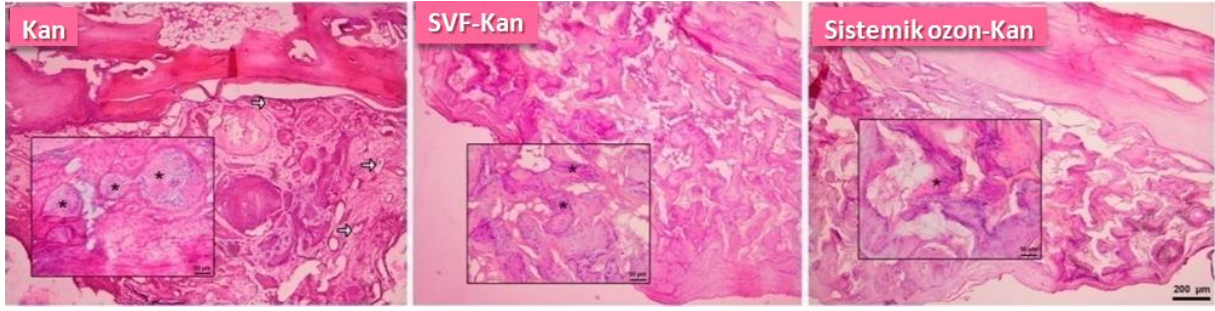
Resim 15: Kan, SVF-Kan ve Sistemik ozon-Kan gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoxilen & eozin boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları siyah ok başı ile gösterilmiştir. Bar: 100 µm.



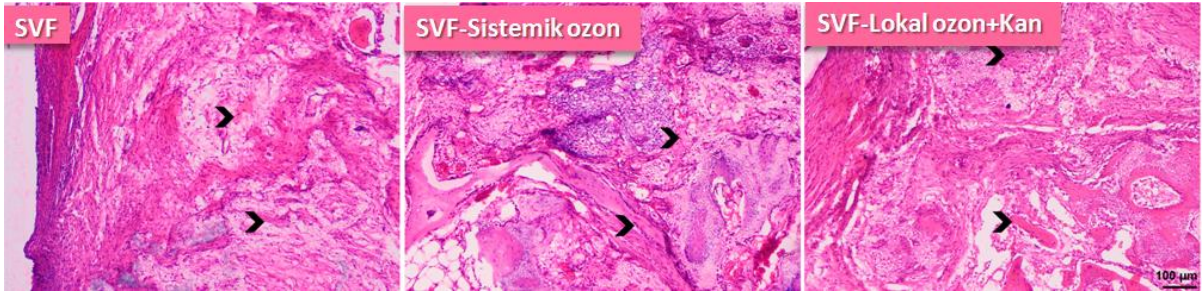
Resim 16: SVF, SVF-sistemik ozon ve SVF-lokal ozon+kan gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları siyah ok başı ile gösterilmiştir. Bar: 100 µm.



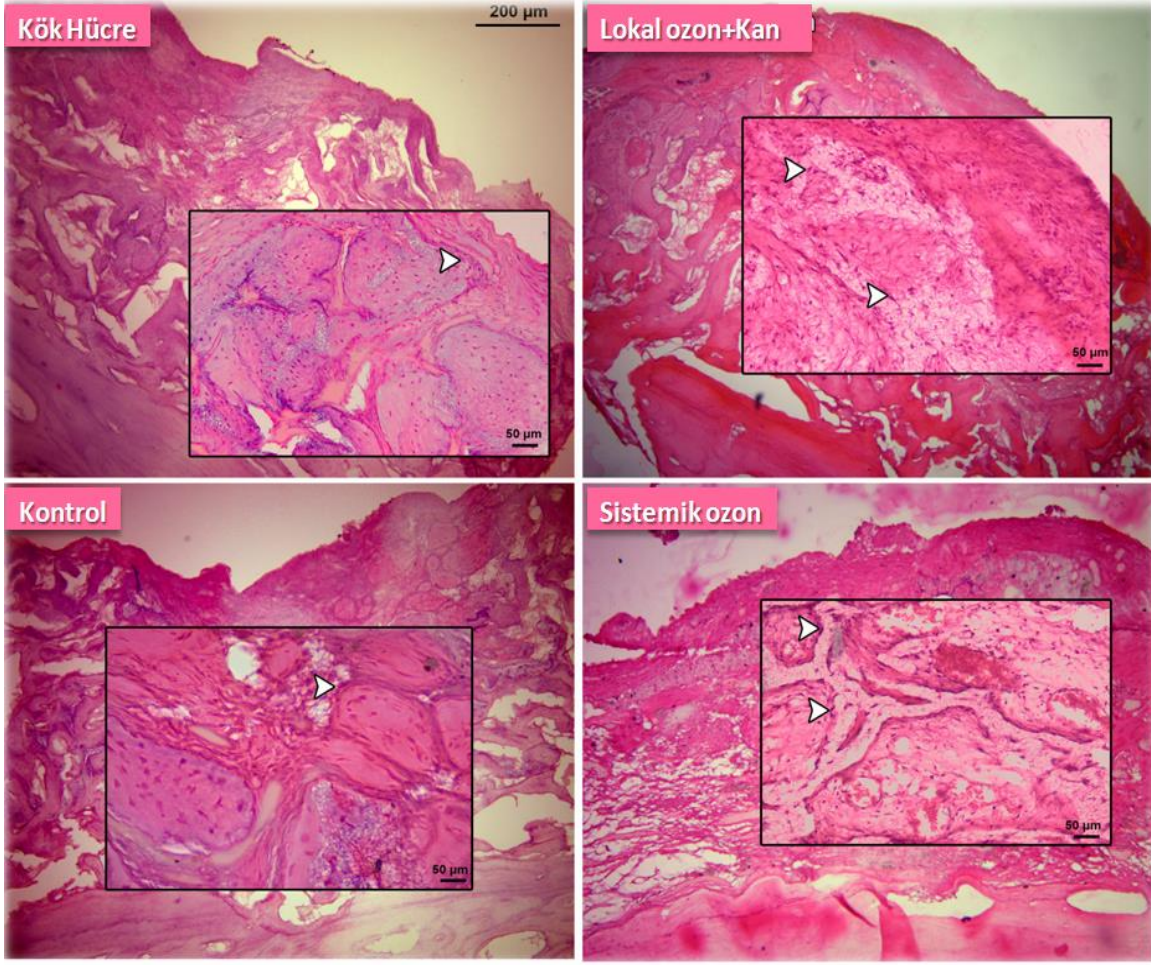
Resim 17: Kök hücre, kontrol, sistemik ozon ve lokal ozon gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoksilen & eozin boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları siyah ok başı ile gösterilmiştir. Ayrıca lokal ozon grubunda görülen bağ doku infiltrasyonu diğer gruplara kıyasla daha fazla gözle çarpmaktadır. Bar: 100 µm.



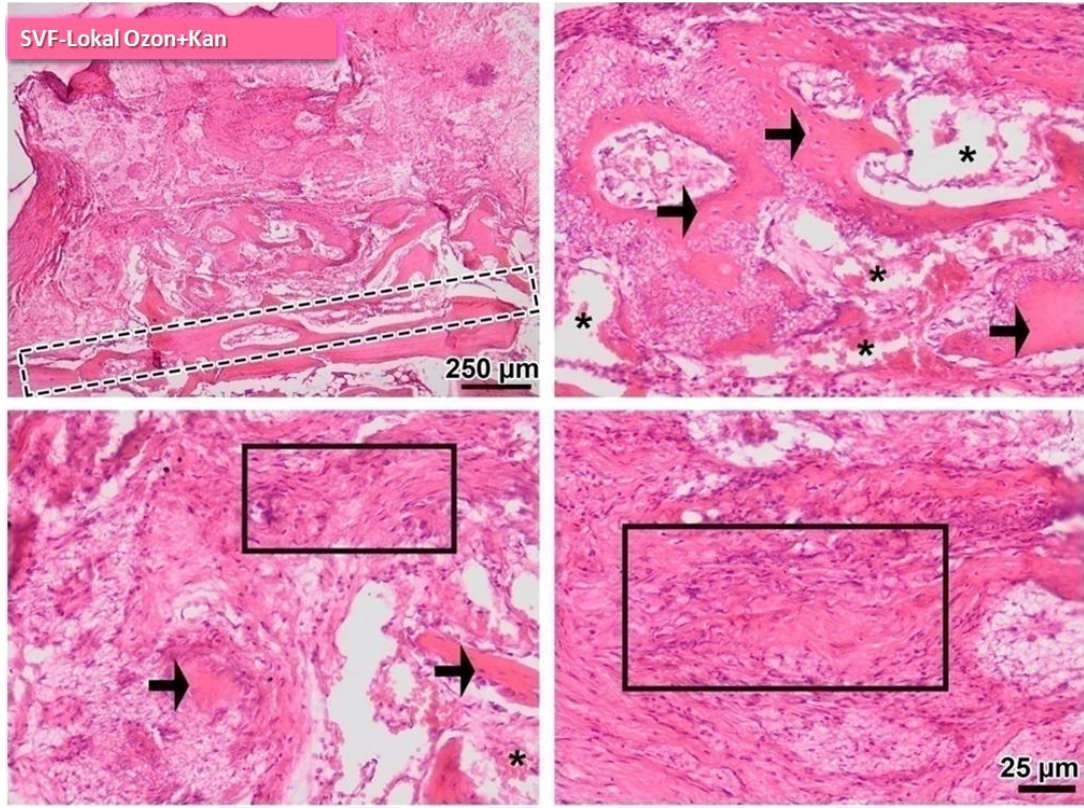
Resim 18: Kan, SVF-Kan ve Sistemik ozon-kan gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoxilen & eozin ile boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları (*) ile gösterilirken damarlar beyaz ok ile gösterilmiştir. Yeni kemik alanı etrafında bulunan osteoblastik aktivite de dikkat çekmektedir. Barlar: 50 µm ve 200µm.



Resim 19: SVF, SVF-Sistemik ozon ve SVF-Lokal ozon gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoxilen & eozin ile boyalı kesitlerde yeni oluşan kemik alanları (*) ile gösterilirken damarlar beyaz ok ile gösterilmiştir. Osteoblastlar, x40lık büyütmede çekilen görüntülerde yeni kemik çevresinde görülmektedir. Barlar: 50 µm ve 200µm.



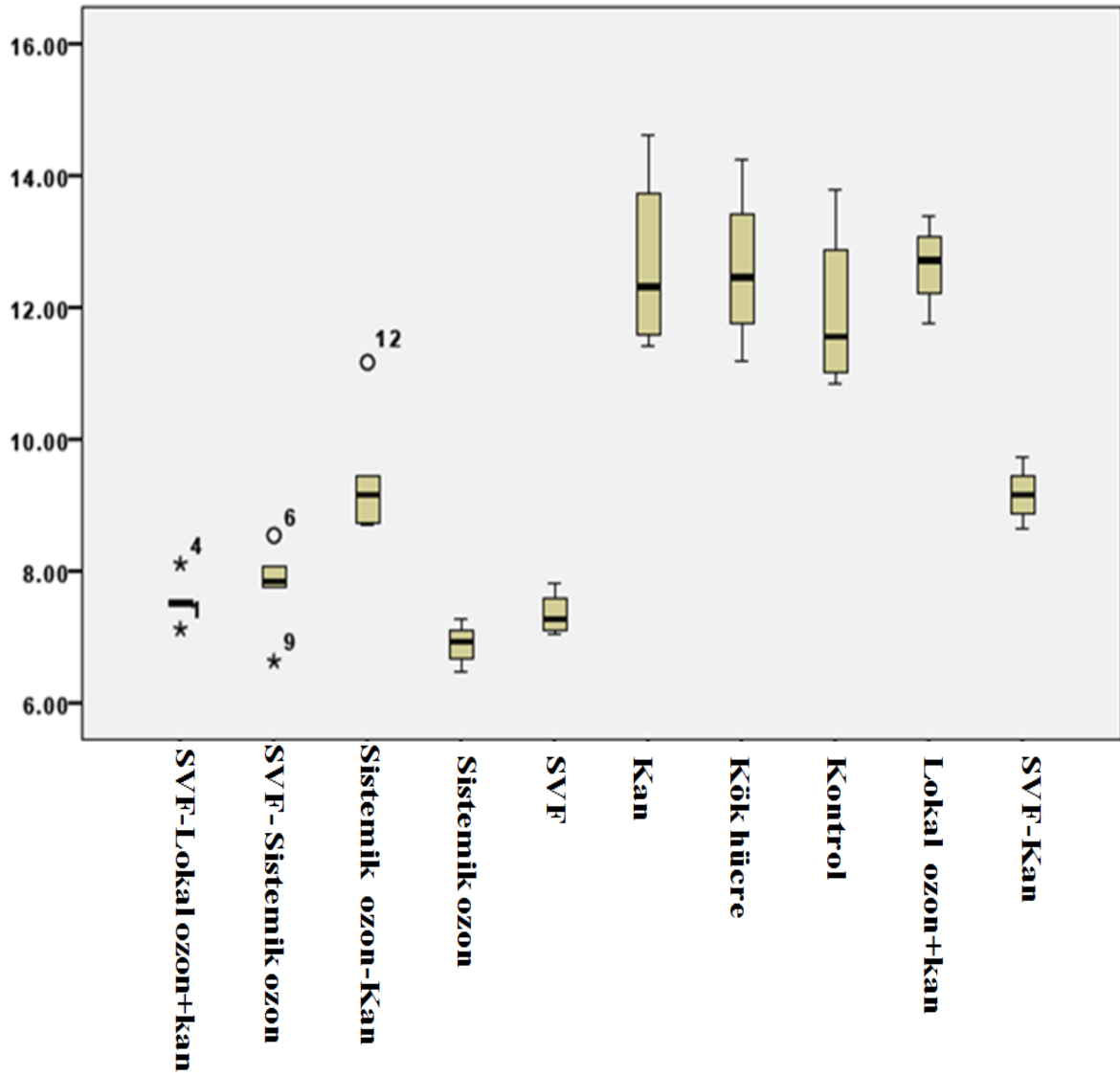
Resim 20: Kök hücre, kontrol, sistemik ozon ve lokal ozon gruplarına ait dokulardan elde edilen hematoxilen & eozin ile boyalı kesitlerde yeni kemik alanı etrafında bulunan osteoblastik aktivite beyaz ok başı ile gösterilmiştir. Barlar: 50 µm ve 200µm.



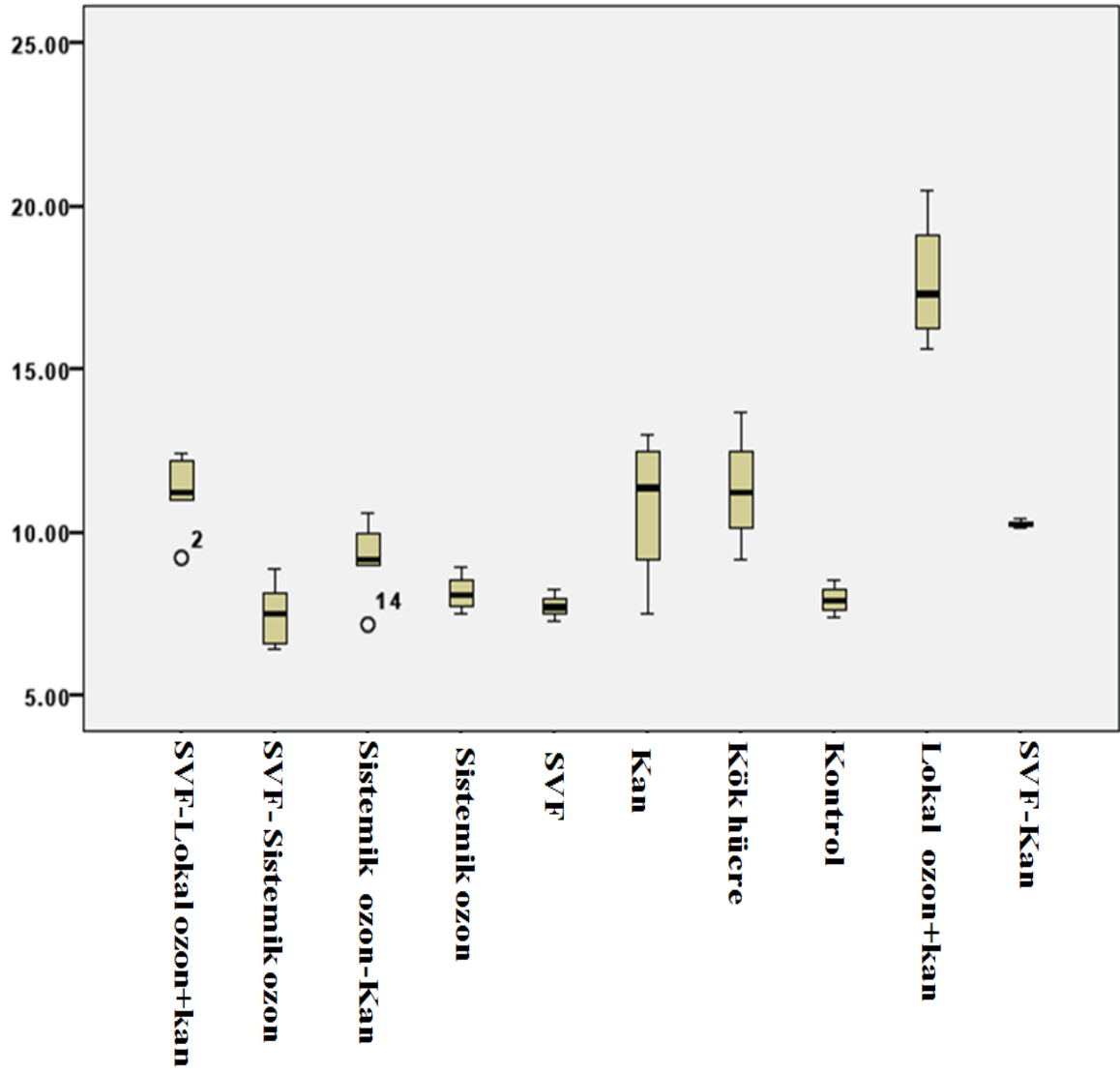
Resim 21: Siyah ok; yeni kemik, Yıldız; damar, Dikdörtgen alan; infiltrasyon alanı, Kesik çizgili alan; sınır

Tablo 12: Stereolojik değerlendirme sonuçları; Yeni kemik, Bağ dokusu ve Kapiller hacim değerleri

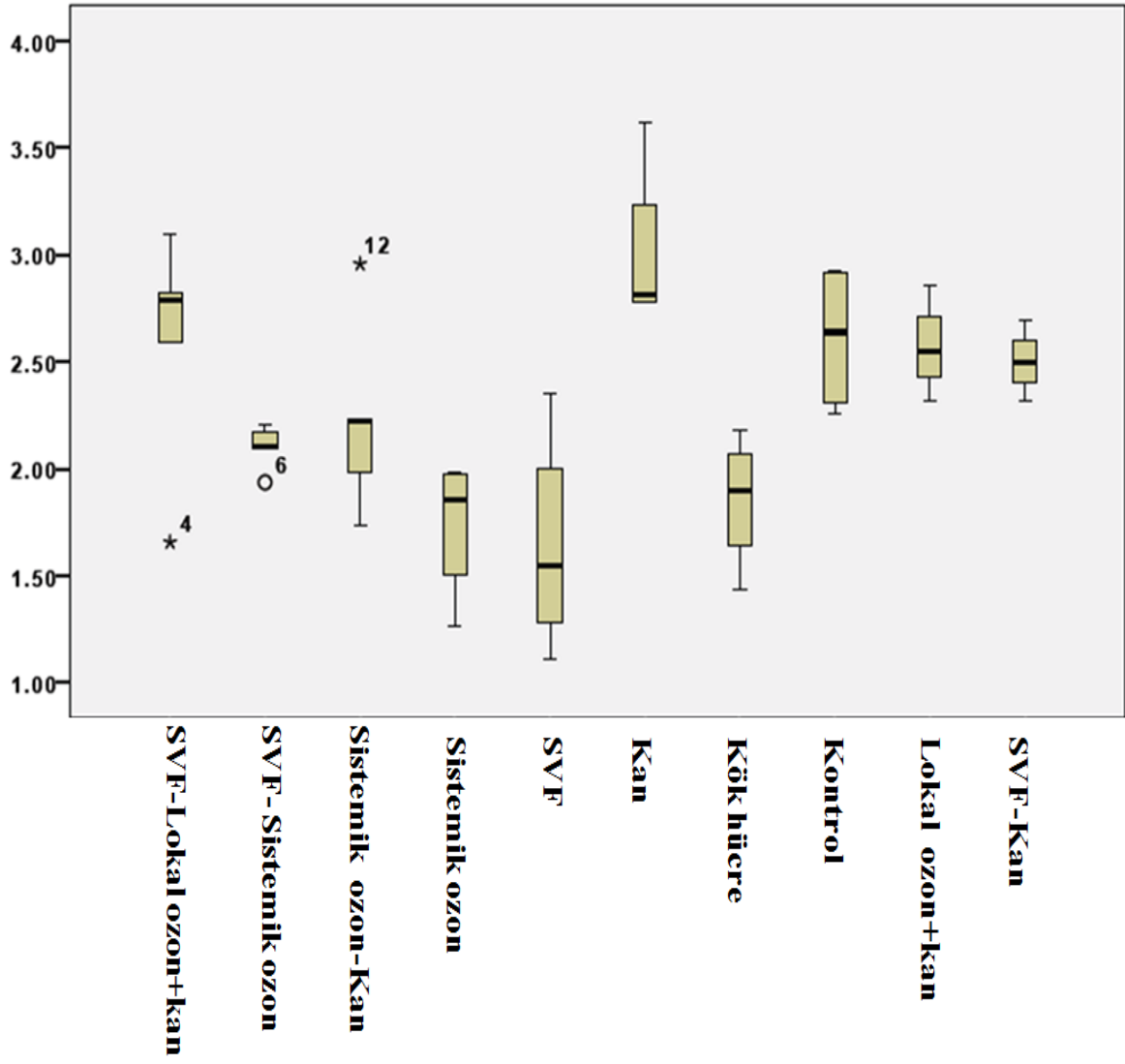
Gruplar	YeniKemik±SD (mm ³)	Bağ Dokusu±SD (mm ³)	Kapiller±SD (mm ³)
SVF-LOKAL	7.56± 0.35	11.20±1.27	2.60±0.55
OZON+KAN	7.78± 0.70	7.50±1.04	2.10±0.11
SVF-SISTEMİK OZON	9.44±1.01	9.18±1.28	2.22±0.46
SISTEMİK OZON-KAN	6.91±0.33	8.14±0.60	1.74±0.34
SISTEMİK OZON	7.35±0.34	7.73±0.39	1.64±0.52
SVF	12.66±1.43	10.80±2.38	3.00±0.41
KAN	12.59±1.27	11.31±1.83	1.85±0.31
KOK HUCRE	11.94±1.32	7.92±0.47	2.61±0.35
KONTROL	12.65±0.67	17.67±2.07	2.57±0.22
LOKAL OZON+KAN	9.17±0.45	10.25±0.12	2.50±0.15
SVF-KAN			



Şekil 12: Stereoloji analizi sonuçlarına göre, yeni kemik hacmi



Şekil 13: Stereoloji sonuçlarına göre, bağ dokusu hacmi



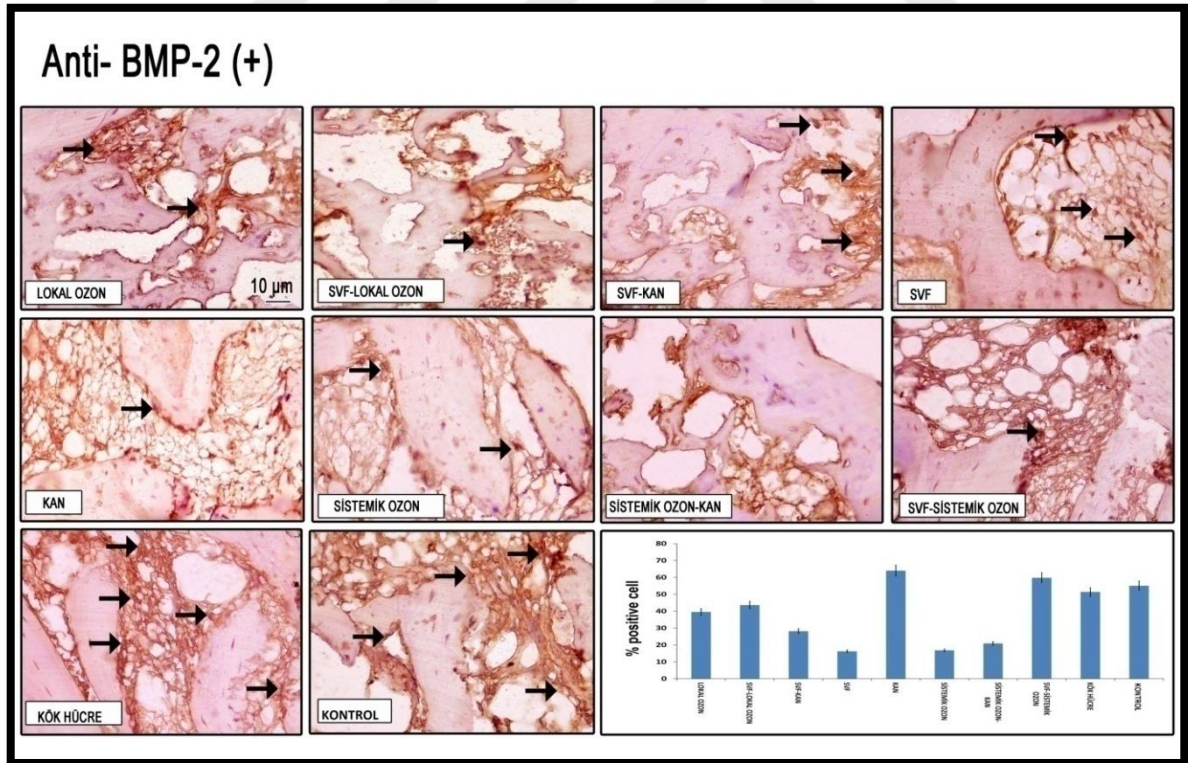
Şekil 14: Stereoloji sonuçlarına göre, kapiller hacim

4.3. İmmünohistokimyasal Bulgular

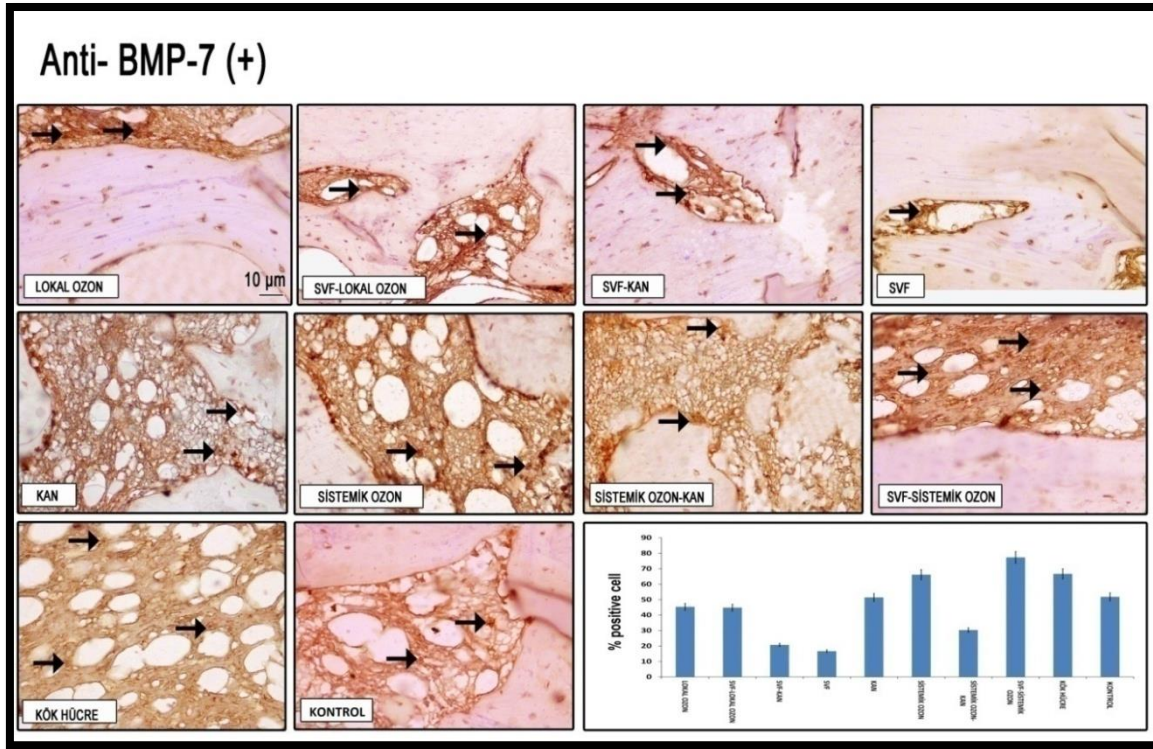
Tablo 13: Gruplara ait immünohistokimyasal boyama skorları

	Lokal Ozon	Svf+ Lokal Ozon+ Kan	Svf+ Kan	Svf	Kan	Sistemik Ozon	Sistemik Ozon+ Kan	Svf+ Sistemik Ozon	Kök Hücre	Kontrol
BM P-2	+++	++	+++	+	+	+++	+	++	+	++
BM P-7	++	++	+	+	++	+++	+	+++	+++	++
RAN KL	+++	++	+++	+	+	+++	+	++	+	++

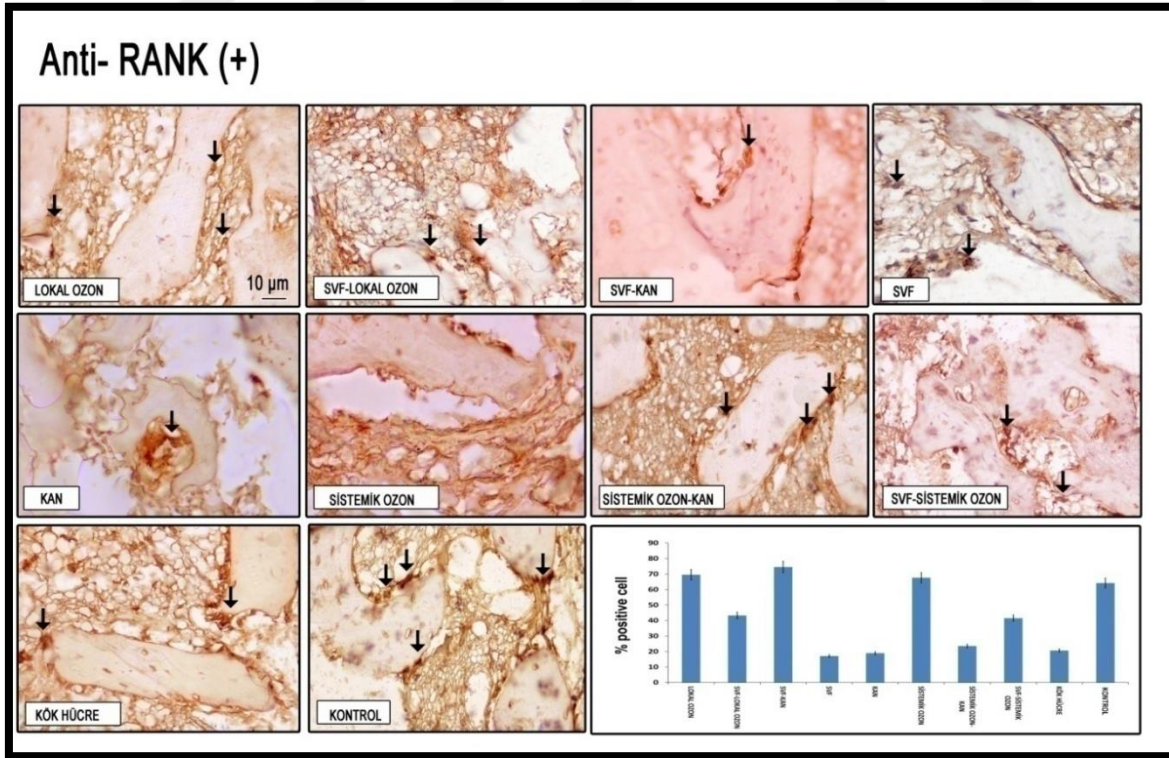
*+: <%25, ++:%25-%50, +++:>%50



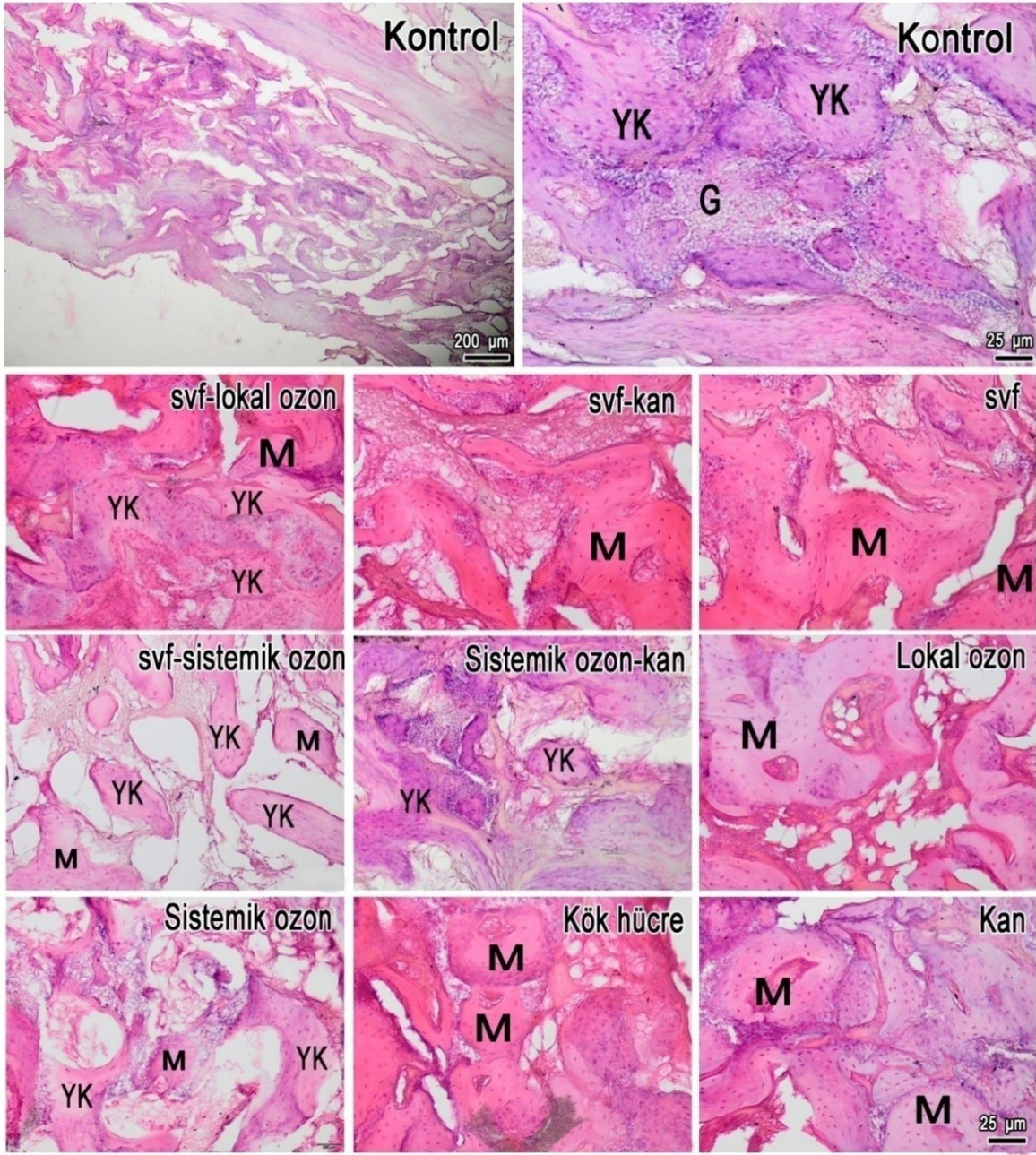
Resim 22: Gruplara ait anti-BMP-2 pozitif boyanan hücreler siyah ok ile gösterilmiştir. Bar: 10 µm, Orijinal büyütme: x400



Resim 23: Gruplara ait anti-BMP-7 pozitif boyanan hücreler siyah ok ile gösterilmiştir. Bar: 10 µm, Orijinal büyüme: x400



Resim 24: Gruplara ait anti-RANKL pozitif boyanan hücreler siyah ok ile gösterilmiştir. Bar: 10 µm, Orijinal büyüme: x400.



Resim 25: G: greft, M:maturasyon, YK: yeni kemik. Gruplara ait mature olan kemik alanları.(hematoksilen eozin boyama, barlar: 200 µm ve 25 µm).

4.4. İstatistiksel Bulgular

Tablo14: Kontrol ile çalışma gruplarındaki yeni kemik hacminin, One Way ANOVA analizi ile karşılaştırılması

	Grup Adı	Ortalama Fark	Standart sapma	p değeri (* p<0.05)
Kontrol	SVF-Lokal ozon+kan	4.37	0.58	0.00*
	SVF-Sistemik ozon	4.16	0.58	0.00*
	Sistemik ozon-Kan	2.49	0.58	0.01*
	Sistemik ozon	5.03	0.62	0.00*
	SVF	4.58	0.62	0.00*
	Kan	-0.72	0.62	0.97
	Kök hücre	-0.65	0.62	0.99
	Lokal ozon+kan	-0.70	0.62	0.98
	SVF-Kan	2.76	0.62	0.00*

Tablo 15: Kontrol ile çalışma gruplarındaki bağ dokusu hacminin, One Way ANOVA analizi ile karşılaştırılması

	Grup Adı	Ortalama Fark	Standart sapma	p değeri (* p<0.05)
Kontrol	SVF-Lokal ozon+kan	-3.27	0.90	0.02*
	SVF-Sistemik ozon	0.42	0.90	1.00
	Sistemik ozon-Kan	-1.25	0.90	0.92
	Sistemik ozon	-0.21	0.94	1.00
	SVF	0.19	0.94	1.00
	Kan	-2.87	0.94	0.11
	Kök hücre	-3.38	0.94	0.03*
	Lokal ozon+kan	-9.74	0.94	0.00*
	SVF-Kan	-2.33	0.94	0.32

Tablo 16: Kontrol ile çalışma gruplarındaki kapiller hacmin, One Way ANOVA analizi ile karşılaştırılması

	Grup Adı	Ortalama Fark	Standart sapma	p değeri (* p<0.05)
Kontrol	SVF-Lokal ozon+kan	-0.02	0.25	1.00
	SVF-Sistemik ozon	0.46	0.25	0.70
	Sistemik ozon-Kan	0.34	0.25	0.92
	Sistemik ozon	0.83	0.26	0.09
	SVF	0.93	0.26	0.03*
	Kan	-0.43	0.26	0.82
	Kök hücre	0.71	0.26	0.21
	Lokal ozon+kan	-0.04	0.26	1.00
	SVF-Kan	0.06	0.26	1.00

5. TARTIŞMA

Hasta veya zarar görmüş doku ve organların tamiri ya da sağlıklı olanla değiştirilmeleri tıbbın temel uğraşı alanlarından. Günümüzde Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi alanında aynı maksatla, kemik doku rejenerasyonu başta olmak üzere, birçok girişim uygulanmaktadır(176).

Kemik rejenerasyonu; kırık iyileşmesinde ve yeniden şekillenme sürecinde meydana gelen organize bir kemik oluşum sürecidir. Bununla birlikte, çeşitli sebeplerle(travma, enfeksiyon, tümör rezeksiyonu vb.) oluşan kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda, rejeneratif süreçte sorun yaşanan durumlarda(avasküler nekroz, atrofik nonunion vb.) ve iskelet anomalilerinde(osteoporoz gibi) büyük miktarda kemik rejenerasyonu gerekmektedir(177).

Kemiğin tamir mekanizması skar dokusu oluşmadan remodeling ve translasyon süreçleri ile gerçekleşmektedir. Küçük kemik defektleri kendiliğinden iyileşebilmesine rağmen, travma, konjenital deformiteler, enfeksiyon ya da cerrahi operasyon sonrası meydana gelen geniş defektler kendiliğinden iyileşemez. Bu yüzden, büyük kemik defektlerinin tedavi edilebilmesi için farklı yöntem ve biyomateryallere ihtiyaç duyulmaktadır. Çene ve yüz bölgesindeki defektlerin tedavi edilmesinde, alıcı bölgenin beslenmesinin yanısıra yerleştirilen biyomateryalin osteojenik potansiyeli ve miktarı büyük öneme sahiptir(176). Rejeneratif yöntemlerde en çok kullanılan biyomateryaller kemik greftleridir.

Kemik greftleri arasında hastanın kendisinden alınan otojen greftler osteojenik, osteoindüktif ve osteokonduktif özelliktedir. Bu yüzden otojen kemik greftleri altın standart olarak kabul edilir(177). Otojen kemik greftleme sonrası oluşan biyolojik süreç, uzun kemik kırıklarının iyileşmesine benzerdir. Osteojenik doku gelişimi, iyileşmenin erken fazını takiben hemen başlar ve sonuçta yeniden şekillenme gerçekleşir. Erken faz sırasında hemostaz, pıhtı oluşumu ve inflamasyon oluşur. Erken fazı takiben, uygun kimyasal sinyaller oluşturularak osteojenik doku üretilir. Daha sonra yeniden şekillenecek yeni kemik dokusu oluşturulur. Otojen greft alıcı bölgeye yerleştirildiğinde, canlı osteojenik hücreler taşır ve bu şekilde osteoid oluşumuna katkıda bulunur. Bu osteojenik hücrelerin, greftin periosteum, endosteum, kemik iliği ve intrakortikal yapılarından kaynaklandığı düşünülmektedir(178). Kemik grefti alıcı bölgede, başlangıçta iltihabi doku ile kuşatılır. Greftin kısmi kemik nekrozunu osteoklastlar gerçekleştirir. Osteoklastik aktivitenin kapsamı ve süresi, kemik greftinin niteliğine (kortikal ve/veya kansellöz) ve greft yoğunluğuna bağlıdır. Bir miktar nekroz ve rezorpsiyona uğrayan greft materyali, içerisinde neoanjiogenezisin oluşması için bir iskele vazifesi görür. Greft içerisine doğru ilerleyen damar penetrasyonu osteojenik hücrelerin grefti istila etmesine ve böylece yeni kemik oluşumuna imkân sağlar. Bu olaylar dizisine osteokondüksiyon denir. Greftlemenin proliferatif fazı sırasında belirli moleküller, osteoprogenitör hücrelerin önemli miktarlarda mitozuna neden olur ve daha sonra bu hücreler osteoblastlara farklılaşırlar. Bu fenomen, osteoindüksiyon olarak adlandırılır ve bu moleküllerden olan kemik morfogenezik protein (BMP), kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve

yeni kemik oluşumu üzerinde, özellikle BMP-2, BMP-4 ve BMP-7 'nin önemli bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Allojenik greftler başka bir insandan elde edilirken ksenojenik greftler başka bir türden elde edilir. Bununla birlikte, allojenik ve ksenojenik kemik greftlerinin kullanımını avantajlı hale getiren bazı faktörler vardır. Bunlar istenilen miktarda greft elde edilebilmesi, ikincil cerrahi sahaya ihtiyaç duyulmamasıdır. Otojen greftleme tekniğinin önemli dezavantajlardan birisi donör saha morbiditesidir(176). Younger and Chapman(179) tarafından 239 hastada otojen greft alınması sonrası donör saha morbiditesi değerlendirilmiştir. Majör komplikasyonların genel oranı % 8.6 olduğu rapor edilmiştir. Başlıca komplikasyonlar ve görülme oranları; enfeksiyon % 2.5, uzun süren yara drenajı % 0.8, büyük hematomlar % 3.3, reoperasyon % 3.8, altı aydan uzun süren ağrı % 2.5, duyu kayıp % 1.2 olarak rapor edilmiştir. Küçük komplikasyonlar olarak değerlendirilen yüzeysel enfeksiyon, geçici duyu kaybı ve hafif ağrı % 20.6 oranında görülmüştür. Verici saha morbiditesinin dışında ihtiyaç duyulan miktarda elde edilebilmesindeki zorluklar da araştırmacıları yeni greft materyalleri ve ilave yöntemler geliştirmeye yönlendirmiştir(180-182).

İmplantolojide allojenik kemik greftlerinin kullanımı giderek artmaktadır. Allojenik greftlerle ilgili en büyük endişelerden birisi, antijenite ve insan immün yetmezlik virüsü (HIV) bulaşma olasılığıdır. 30 yıllık bir allogreft uygulaması sonrası belirgin bir antijenite tespit edilmediği literatürde rapor edilmiştir(183). Ayrıca, allojenik bir kemik greftinin işlenmesinden sonra, vericilerin daha iyi taranması sayesinde 1/8.000.000 ihtimal ile HIV ile enfekte olabileceğini(183) ve hastalığın etkin bulaşma oranının yaklaşık 1/1.600.000 gibi son derece düşük olduğu belirtilmiştir(184).

Ksenogreftler 1960'lerde yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır. Bugüne kadar en fazla kullanılan ksenogreft kaynağı sığır kemiğidir. Ancak, sığır kaynaklı greftlerin otoimmün rahatsızlığa sebep olduğu rapor edildikten sonra popülaritesi azalmıştır. 1990'lerde daha ileri deproteinizasyon yöntemlerinin geliştirilmesi ile antijenik özellikleri azaltılmış ve böylece daha biyouyumlu hale getirilen ksenogreftler daha sık kullanılmaya başlanmıştır(185). Ksenogreft kullanımının başlıca nedenleri, verici alan morbiditesini azaltmak ve istenilen miktarda greft elde edilebilmesidir. Literatürde ksenogreftlerin, otojen greftler kadar başarılı olabileceğini gösteren birkaç rapor mevcuttur(186, 187).

Diğer greft materyali olan alloplastlar, kalsiyum türevi inorganik materyallerin (özellikle kalsiyum fosfatlar, kalsiyum sülfatlar ve biyoaktif cam) blok veya partikül formlarından oluşan doğal veya sentetik malzemelerdir. Alloplastlar sıklıkla otojen veya allojenik kemik ile birlikte kullanılırlar. Daha yakın zamanlarda, çeşitli büyüme faktörleri ve trombosit açısından zengin plazma da bu kombinasyona eklenmiştir. Bu malzemeler, doğal kemik dokusunu taklit eder ve otojen kemik hücrelerine iskele vazifesi yapar. Günümüzde tek başına kemik greft materyali olarak etkinlikleri kanıtlanmamıştır(44).

Uzun yıllar boyunca, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tekniği (YKR) başarılı bir şekilde kemik hacminin artırılması için kullanılmıştır(65-69). YKR için temel ilke, kan pıhtısını korumaktır. Kemik defekti etrafında kapalı bir boşluk yaratmak için bir bariyer membranın yerleştirilmesi ile kemik oluşturan hücrelerin diğer hücreler ile rekabet olmadan

çoğalması sağlanır. Genellikle bu tür bariyer membranın besinlerin yenilenen dokulara difüzyonunu desteklemek için geçirgen olması gerektiği varsayılmıştır(65). Hatta, başlangıçta oklüzif bariyerlerin YKR bölgesine besin maddelerinin ve büyüme faktörlerinin nüfuz etmesini zorlaştıracığı ve bu nedenle kemik oluşumunu engelleyebileceği düşünülmüştür(188, 189). Ancak, Schmid et al.(190), titanyum bariyer ile diğer permeabil membranlar karşılaştırıldığında, aynı miktarda kemik oluşturulabileceğini göstermiştir. Ayrıca, Mardas et al.(191) diferansiye olmamış mezenkimal hücrelerin çevresindeki yumuşak dokudan korunan bariyere invazyonunun, YKR ile kemik oluşumu için gerekli olmadığını rapor etmiştir. Hemisferik titanyum bariyerler, biyouyumluluk, yeterli sertlik, uygun stabilite, boşluk oluşturabilme, yeterli kan tedariki özelliklerine sahiptir. Tavşan kalvaryumlarında sert titanyum bariyer ile YKR, daha önceki birçok çalışmada başarıyla kullanılmıştır(65-68).

Titanyum engellerin altında otojen kan kullanarak kemik oluşturulması üzerine birkaç çalışma yapılmıştır(66, 192). Kortikal kemik perforasyonunun anjiyojenik ve osteojenik hücrelerin YKR alanına göç etmesine izin verdiğini rapor edilmiştir(65, 66, 68, 69). Nishimura et al.(193) tavşanlarda yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda kemik perforasyonu büyüklüğünün histolojik etkilerini değerlendirmiştir. Çalışmada, kılcal damar indüksiyonunun osteogenezisi teşvik ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşmesinin, filizlenen damarlarla ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Büyük korteks perforasyonlarının boşluk alanda vaskülarize bağ doku oluşumunu indükleyerek kemikleşmeyi arttırdığı ileri sürülmüştür(193). Çalışmamızda kan ile kontrol gruplarının karşılaştırılmasında, istatistiksel fark oluşturacak düzeyde olmasa da kan grubunda kontrol grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi görülmüştür. BMP-2 sonuçları yeni kemik hacminin stereolojik sonuçları ile örtüşmektedir. BMP- 7 sonuçlarına göre kan grubu ile kontrol grubu arasında osteoklastik aktivite neredeyse aynı tespit edilmiş ancak RANKL sonuçları ile birlikte değerlendirildiğinde kan grubunda kontrol grubuna göre maturasyonun biraz daha fazla olduğu düşünülmüştür. Mevcut sonuçlar literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumludur.

YKR bölgesine, fibröz bağ dokusu göçünün önlenmesi için bariyer membranlar yeterince tıkaçıcı olmalıdır(65, 66). Rezorbe olmayan e-PTFE membranlar ve emilebilir membranlar çökme eğilimi gösterdiğinden bariyeri desteklemek için farklı greft malzemeleri kullanılmıştır(65). Lundgren et al. (194) YKR yönteminde, e-PTFE membranlar ile titanyum bariyerleri karşılaştırmıştır. 4 haftalık iyileşme periyodundan sonra e-PTFE zarlarının çöktüğünü ve rejenerasyonun titanyum bariyerlerin altındaki defektlerde daha fazla görüldüğünü rapor etmişlerdir. Bununla birlikte, e-PTFE, titanyum, vb. gibi absorbe edilemeyen membranlar ekspoz olabilir ve daha sonra iltihaplanmaya neden olabilirler(195). Bu çalışmamızda benzer sorunlarla karşılaşmamak için titanyum bariyer kullanıldı ve bu şekilde YKR boşluğunun idamesi başarıyla sağlandı. Çalışmamızda, hiçbir denekte titanyum bariyerler ekspoz olmamış ve enflamasyon bulguları görülmemiştir. Ayrıca mevcut çalışmamızda, titanyum bariyerlerin altında yeterli miktarda yeni kemik oluşturulmuş ve titanyum bariyerlerde herhangi bir çökme görülmemiştir.

Kemik doku mühendisliği üzerine çalışmalar, 1980'lerin ortalarından itibaren başlamıştır. Kemik doku mühendisliği alanına olan ilgi ve bu alandaki ilerleme, araştırmaların

katlanarak artmasıyla yıllar içinde muazzam bir büyüme kaydetmiştir. Kemik doku mühendisliği çalışmaları, mevcut tedavi yöntemlerinin olumsuz yönlerini (verici bölge morbiditesi, sınırlı kullanılabilirlik, immün cevap, patojen transfer riski gibi) ortadan kaldırmak için alternatif tedavi yöntemleri geliştirmeye odaklanmıştır(194). Doku mühendisliği alanında genel ilke taşıyıcı ve uyarıcı materyallerin kullanılmasıdır. Hücre temelli kemik dokusu mühendisliği, osteojenik hücreler ve osteoindüktif sinyaller sağlayarak kemik oluşumunu arttırmayı amaçlayan umut verici bir stratejidir. Bu şekilde greftin tek başına kullanılmasına göre, daha kısa sürede yeterli ve kaliteli kemik dokusu elde edilebilir(12).

Özünde, kemik dokusu mühendisliği, biyoyumlu iskeletlere ve osteokondüksiyon ve neovaskularizasyon için üç boyutlu doku benzeri yapılara, MSCs (doğal veya genişletilmiş) veya olgun hücrelerin (osteoblast) ekilmesini içerir. Ayrıca, osteoindüksiyon sağlayarak kemik üretmek ve devamlılığını sağlamak için büyüme faktörleri bu kombinasyona dâhil edilebilir. Özellikle büyük kemik defektlerinin tedavisinde, böyle geliştirilmiş birleşik greftlere önemli ölçüde gereksinim duyulmaktadır. Şu an mevcut olan birleşik greftler, kemik iliği veya büyüme faktörleri (BMPs) ekilen sentetik veya biyoemilebilir iskelelerdir. Bu yaklaşım, otolog kemik greftine alternatif olarak sunulmaktadır(177).

Doku mühendisliğinin önemli bir alanı, klinik olarak kullanılacak taşıyıcıların üretilmesidir. Taşıyıcılar, kemik rejenerasyonu için kemik hücrelerinin göç etmesini, çoğalmasını ve farklılaşmasını teşvik eden sentetik veya doğal biyomalzemelerden yapılmış iskelelerdir. Polyester, bioseramikler ve hidrojel gibi birçok biyomalzeme, kemik dokusu mühendisliğinde iskelet olarak test edilmiştir. Bu biyomalzemeler arasında, polyesterlerden yapılmış iskeleler daha iyi mekanik özelliklere sahip olmakla birlikte, hidrofobik özelliklerinden ve hidroliz ürünlerinin asiditesinden dolayı iltihaplanmaya neden olabilirler(79). İskele görevi görecek ideal bir taşıyıcı malzeme, besin maddelerinin difüzyonu için gözenekli yapıda, biyoyumlu, osteokondüktif ve yeterli mekanik dayanıklığa sahip olmalıdır(195).

Bilinen taşıyıcı malzemeler arasında, doğal polimerler(kitosan ve kollojen)(196), sentetik polimerler(poliglikolik asid, polikaprolakton)(197), kalsiyum fosfat bazlı seramik taşıyıcılar(β -TCP ve HA)(3, 181) sayılabilir. Kalsiyum fosfat(CaP) içeren biyomalzemelerin proteinler için yüksek bir afiniteye sahip olması, biyoaktif peptidler, kemik büyüme faktörleri veya MSCs için ideal taşıyıcılar haline gelmelerini sağlar(198-200). Kalsiyum fosfat materyalleri güvenilirdir ayrıca osteojenik ve osteokondüktif biyomateryaller ile beraber kullanılabilir(71). Kalsiyum fosfat içerikli greftlerin osteokondüktif olduğu kabul edilir. Üç boyutlu geometriye sahip CaP biyomalzemeleri, dolaşımda endojen BMPs (özellikle BMP-2) bağlayabilir, konsantre edebilir ve osteoindüktif hale gelebilir(75, 201). Çalışmalarda, BMSCs'in in vitro gözenekli kalsiyum fosfat içeren biyomalzemelerde kültüre edilebileceği ve kemik rejenerasyonu için doku mühendisliği materyali olarak implante edilebileceği rapor edilmiştir(198, 200). Ortopedik ve dental(Ti veya Ti alaşımı) implantlar üzerine kaplama olarak kullanılan kalsiyum fosfat biyomalzemeleri, materyale bioaktivite kazandırarak iskelet fiksasyonunu hızlandırmıştır(202-204). Kalsiyum fosfat bileşikleri yüzeylerinde kemik apatiti benzeri yapı veya karbonat HA oluşturabilir. Kalsiyum fosfat biyomateryali biyoaktif ve

osteokondüktif özellikleri ile hücrel fonksiyonu uyararak kemik rejenerasyonunu artırır ve böylece kemik ile benzersiz bir arayüz oluşmasını sağlar. Uygun geometrisi sayesinde kalsiyum fosfat biyomalzemeleri, doku mühendisliğinde sert dokuların rejenerasyonunu arttıran BMP, biyoaktif peptidler veya MSCs için taşıyıcı olarak hizmet edebilir(198, 199).

CaP ticari olarak; farklı kaynaklardan (doğal veya sentetik), farklı kompozisyonlarda (HA, beta-trikalsiyum fosfat ve bifazik CaP) veya farklı fiziksel formlarda (partiküller, bloklar, metal implantlar üzerine kaplamalar, polimerler ve kompozitler) elde edilebilir(75).

HA ve β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) gibi kalsiyum fosfat(CaP) esaslı malzemelerin, kemik hücresi bağlanmasına ve büyümesine yardımcı olan yüzeyler sağladığı saptanmıştır. Mükemmel osteokondüktif özellik gösterirler, özel tasarlanmış şekil ve ebatlarda imal edilebilirler ve doku reddi veya enfeksiyon riski taşımazlar. Daha önceki çalışmalarda, HA'nın çok geç rezorbe olduğu bildirilmiştir(79, 205), ancak beta-TCP' nin in vivo olarak indirgenmediği ve tamamen konak kemik dokusu ile yer değiştirdiği bildirilmiştir(79, 206). Ayrıca, kalsiyum fosfat bileşikleriyum(207-209), biyocam(210), emilebilir polimer ve hidrojel(197, 211, 212) malzemeler üzerinde osteokondüktif yüzey oluşturabilmektedir. Bu osteokondüktif yüzeylerin oluşması, kemik dokusu mühendisliği için ACSs'lerin osteojenik farklılaşmasına imkan tanır. Kalsiyum fosfat içerikli malzemelerin, MSCs'in ostoblastik farklılaşmasını destekleyerek yeni kemik oluşumuna katkı sağlamaktadır(213).

β -TCP, yüksek derecelerde (1125° C) sinterleme yöntemi ile elde edilen, kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşan CaP formudur. β -TCP biyokaktivite özelliğinden dolayı kemik dokusu ile kalsiyum ve fosfat alışverişi yapar. Rezorpsiyon süresi 12-18 ay arasındadır. Rezorpsiyon süresini etkileyen faktörler; kimyasal yapısı, porozitesi ve partikül büyüklüğüdür(75).

Wu et al.(79) tarafından köpek mandibulasında defekt tamiri için β -TCP iskelelere kemik iliği kaynaklı osteoblastlar ekilmiştir. 12 hafta sonunda, bu biyosentetik greftler, otolog kemik greftine benzer sonuçlar vermiştir. Bu nedenle çalışma sonuçlarında, kemik iliğiyle kombine edilen β -TCP, travmatik kemik defekti ve atrofik nonunion tedavisinde otogreftlere alternatif olduğu tespit edilmiş ve bu yöntemin otolog kemik toplamının dezavantajlarını önleyebileceği rapor edilmiştir.

Literatürde yer alan in vivo ve klinik çalışmalar(79, 181, 214) dikkate alınarak çalışmamızda granül formda β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) içerikli greft kullanılmıştır.

Kök hücreler, elde edilmesinin kolaylaşması ile kemik doku mühendisliğinde önemli bir yere gelmiştir. Multipotent özellikte olan MSCs, bu konuda çok büyük potansiyele sahiptir. Kök hücre kaynağı seçiminde, toplama kolaylığı, elde edilen hücrelerin sayısı, donör saha morbiditesi ve implantasyondan sonra hücrelerin güvenilir olması (Örn. immüno-reaksiyon) dikkate alınmalıdır(195). Kök hücrelerin kemik defekt iyileşmesine katkıda bulunabilecek, kendini yenileme ve birçok hücreye farklılaşma potansiyeli vardır. Tüm bireylerin somatik dokularında bulunan MSCs, kemik rejenerasyonunda kültüre edilebilen bir otolog hücre kaynağıdır(195)

Kemik iliği kaynaklı kök hücreler (BMSCs), bildirilen ilk MSCs'dir(215). BMSCs doku mühendisliği alanında başarıyla kullanılmıştır ve kemik rejenerasyonu için yetişkin kök hücrelerin kullanılmasına olan ilgiyi arttırmıştır(216-218). Multipotent MSCs, kemik iliğinin dışında, yağ dokusu, göbek kordonu kanı ve diğer birçok dokudan elde edilebilir. Bununla birlikte, ASCs'in kemik rejenerasyon uygulamalarında kullanımı için farklı görüşler vardır çünkü bazı in vivo çalışmalar, ASC'lerin BMSC'lerden daha düşük seviyede olduğunu rapor etmiştir(196, 219).

Niemeyer et al.(196) tarafından in vivo defekt modelinde, kollojen taşıyıcılarda BMSCs ile ASCs-PRP kombinasyonu karşılaştırılmıştır. 2 haftada bir radyolojik değerlendirme ve 26 hafta sonunda histolojik değerlendirme yapılmıştır. Sonuç olarak, ASCs, osteojenik potansiyeli bakımından BMSCs'den daha düşük gibi görünmektedir ancak bu farkın kısmen PRP eklenerek telafi edilebileceği rapor edilmiştir(196).

Bir diğer çalışmada ise, Stockmann et al.(220) kemik defektlerinin tedavisinde yağ dokusu, periost ve kemik iliğinden izole edilen otolog MSCs' in etkinliği değerlendirilmiştir. Üç farklı grup MSCs' de benzer sonuçlar elde edilmiştir.

Son yıllarda kemik dokusu mühendisliği alanında birçok önemli teknik ilerleme kaydedilmiştir. Özellikle moleküler ve hücresel düzeyde kemik iyileşmesi daha fazla anlaşılmıştır. Lokal kemik rejenerasyonu için, doku mühendisliği yöntemi kullanılan çok sayıdaki hayvan çalışması(76, 79, 121, 123, 157, 195, 221) ve klinik çalışma(3, 127, 180, 181, 214) yürütülmüştür.

Kokemueller et al.(221) tarafından yapılan bir in vivo çalışmada, silindirik β -TCP iskeleler üzerine, otojen kemik iliği yerleştirilmiş ve latissimus dorsi kasına implante edilmiştir. Bu çalışmada vaskülarize biyo-yapay kemik greftlerinin in vivo olarak elde edilebileceği gösterilmiştir. Ayrıca, otojen greftin donör morbiditesi ve yeterli miktarda elde edilememesi gibi kısıtlamaların azaltılması amaçlanmıştır(221).

Araştırmacılar, MSCs kaynağı olarak, kemik iliği ve periost yerine yağ dokusunun kullanımını tavsiye etmektedir. Bunun nedeni düşük morbidite, çok fazla miktarda elde edilebilmesi olarak gösterilmiştir(220). Yağ dokusunda, hücrelerin % 1-10'u kök hücre olarak kabul edilirken, kemik iliğinde bu oran sadece % 0,0001-0.01'dir(9). Ek olarak, yağ SVF'sindeki çekirdekli hücrelerin sayısı, yağ dokusunun gramı başına 500.000 ila 2.000.000 hücre arasında değişebilir. 1 g yağ dokusunda MSCs sayısı aralığı 5.000-200.000 kök hücre olabilir(222). Böylece, teorik olarak, 0,5-20 milyon ASCs, 100 g yağ dokusundan çıkartılabilir. ASCs transplantasyonunun zamanlaması çok önemlidir. Akut yaralanmada etkili olmakla birlikte, nakilin 8 hafta geciktirilmesi etkilerini önemli ölçüde düşürür (128).

ASCs'in in vitro ortamda osteojenik hücrelere farklılaşabildikleri ve osteojenik genleri ifade edebildikleri gösterilmiştir. Bu özellikleri ile ASCs, kemik dokusu mühendisliği ve rejeneratif tıp için mükemmel hücre kaynağı haline gelmiştir(4, 223). Ayrıca, in vivo olarak sistemik veya lokal enjekte edilen ASCs, kemik defektlerinin iyileşme sürecini önemli ölçüde hızlandırmıştır(224). Bununla birlikte, nakledilen ASCs yaralanma bölgesinde endojen kök

hücreler ve öncü hücreler için homing sinyalleri olarak işlev gören sitokinler ve kemokinler üretmektedir(181).

Literatürde kemik rejenerasyonu için ASCs, sınırlı sayıda klinik çalışmada ve vaka raporunda kullanılmıştır.

Kern et al. yaptıkları çalışmada göbek kordonu, kemik iliği ve yağ dokusundaki kök hücreleri karşılaştırmışlardır. Bu kök hücrelerin tümünün aynı fibroblastoid morfolojiyi paylaştığını ve benzer farklılaşma kabiliyetlerine ve yüzey belirteçlerine sahip olduğunu göstermişlerdir. Ancak, ASCs'lerin osteojenik, kondrojenik ve adipojenik farklılaşmasını daha üstün bulmuşlardır(215).

Mesimaki et al.(214) tarafından, ilk kez otolog insan ASCs'i, maksillofasiyal bir defektin onarımı için bir trikalsiyum fosfat iskelesi ve BMP-2 ile birlikte başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Maksiller rekonstrüksiyonda, elde edilen ASCs kullanılarak abdominus rektus kası içerisinde ektopik kemik formasyonu sağlanmıştır. 8 ay sonra titanyum kafes içerisinde oluşturulan ektopik kemik, mikrovasküler rekonstrüksiyon ile maksillofasiyal bölgeye nakledilmiştir. Daha sonra cerrahi bölgeye 4 adet dental implant başarı ile yerleştirilerek hastanın okluzyonu sağlanmıştır. 36 ay takip edilen hastada herhangi bir komplikasyon yaşanmamıştır.

Thesleff et al.(181) tarafından kalvaryum defekti olan dört hastada adipoz kök hücre ve β -TCP kombinasyonu kullanılarak kraniyoplasti yapılmıştır. Radyografik değerlendirmede kranioplasti bölgelerinin, postoperatif 1 yıl içerisinde intakt kraniyal kemiğin gücüne yaklaştığı tespit edilmiştir(181). Bu çalışmanın yazarlarına göre, ASCs'in farklılaşması ve homing kapasiteleri ile β -TCP'nin osteokondüktivitesi sinerjik çalışarak iyi kemikleşmiş bir yapı oluşturmuştur(181).

Bu alandaki önemli klinik çalışmalardan birisi Sandor et. al(180) tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada, kraniomaksillofasiyal sert doku defekti olan 13 olgu adipoz kökenli kök hücreler implante edilerek rekonstrükte edilmiştir. Defektlere adipoz kökenli kök hücreler (ASC) ekilmesinde taşıyıcı olarak biyoaktif cam ya da β -TCP iskeleler kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarında, 13 olgunun 10'unda kemik defekti başarı ile tedavi edilmiştir.

Genel olarak, kemik dokusu mühendisliği henüz emekleme aşamasındadır ve genel klinik uygulamaya geçilmeden önce etkinlik, güvenlik ve maliyet konularının ele alınması gerekmektedir. Kültüre edilmiş hücreler, tümör oluşturabilecek mutasyonlara ya da epigenetik değişikliklere sahip olabilir(177). Bununla birlikte, in vitro ve in vivo kanıtlar, tümör oluşum riskinin minimal olduğunu düşündürmektedir(225). Kıkırdak onarımında otolog BMSCs kullanılan ve ortalama 11 yıl 5 ay kadar takip edilen 41 hastada tümör gelişimi rapor edilmemiştir(226). Mevcut çalışmamızın stereolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmelerinde herhangi bir tümöral oluşum tespit edilmemiştir.

Bugüne kadar, kemik defektlerinin tedavisi için kültüre edilmiş, genetik olarak modifiye edilmemiş MSCs'i kullanan insan çalışmalarının bazıları uzun kemiklerde(227, 228) bazıları ise maksillofasiyal bölgede(214, 229-232) rapor edilmiştir.

Her ne kadar çalışmalar oldukça heterojen ve kesin kanıt elde etmek zor olsa da, MSCs ekilen defektlerde yeterli seviyede olmasa da kemik appozisyonu sağladıkları görülmüştür. Ayrıca, doku mühendisliği yaklaşımı, kırık iyileşme sürecini hızlandırmak veya kemik-protez arayüzünü genişletmek ve total eklem artroplastisinde aseptik gevşemeyi önlemek için etkili ve güvenli olarak kullanılmıştır(177, 233, 234).

Çalışmamızın stereolojik sonuçlarına göre, istatistiksel fark olmasa da kök hücre grubunda kontrol grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi ölçülmüştür. BMP-2 sonuçları yeni kemik hacmi ile ilgili stereolojik bulgular ile örtüşmektedir. BMP-7 ve RANKL sonuçlarına göre kök hücre grubunda kontrol grubuna kıyasla remodeling ve maturasyon süreçlerinin tamamlanmış olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak kök hücre kontrol grubuna göre çok daha hızlı kemik matürasyonu sağlamıştır. Bu sonuçlar literatür ile uyumludur.

Yağ dokusu, mezenkimal bağ dokudan köken alan adipositlerden oluşur. Adipositler tek tek veya bağ dokusu içinde gruplar halindedir. Damarsal açıdan zengin bir bağ dokusu ile ayrılmış lobüller oluştururlar. Adipokinler, yağ dokusunda salgılanan, endokrin, parakrin ve otokrin etkileri olan proteinlerdir(129). Adipoz dokudan stromal vasküler fraksiyon(SVF) ilk olarak Zuk et al.(9) tarafından tarif edilmiştir. Santrifüj edilen yağ dokusu çeşitli fraksiyonları içerir. En alttaki fraksiyon, preadipositler, fibroblastlar, endotel hücreleri, düz kas hücreleri, perisitler ve kök hücreler içeren stromal vasküler fraksiyon olarak bilinir. Stromal vasküler fraksiyon, birçok sitokin, VEGF, β -FGF, TGF- β ve GM-CSF gibi anjiyogenetik ve antiapoptotik faktörleri içerir. VEGF'nin endotel hücresi büyümesi ve anjiyogenez üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Kollajen, proteoglikan ve elastin sentezleyen fibroblast, SVF'de de mevcuttur. TGF- β ve trombosit kaynaklı büyüme faktörü fibroblastlardan kaynaklanan diğer önemli faktörlerdir. Adipoz dokuya özel bir sitokin olan monobütün'in anjiyogenetik ve endotelial proliferasyonda etkili olduğu gösterilmiştir(129).

SVF'nin kolay ve düşük maliyetle elde edilmesi, etik problemlerin olmaması, terapötik potansiyeli sayesinde popülerite kazanmıştır. Hücre kompozisyonu, güvenilirliği ve etkinliği üzerine araştırmalar ve klinik çalışmalar devam etmektedir(235). SVF' nin osteojenik kapasitesi, çeşitli biyomateryaller/ BMP eklenmesiyle veya implantasyondan önce osteojenik farklılaştırma ile arttırılabilir(24, 236).

Kim et al.(24) tarafından tavşan segmental ulna defektinde, SVF' nin osteojenik potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarında, SVF hücreleri ekilen poliglikolik asid(PGLA) iskeleti uygulamasının, tek başına PLGA iskele uygulamasına göre kemik iyileşmesini hızlandırdığı rapor edilmiştir. Behfar et al.(158) yaptıkları in vivo çalışmada, SVF kullanımının tendon onarımlarının yüke bağlı özelliklerinde artış sağladığını rapor etmişlerdir. Tendon onarımının tedavisinde BMSCs' e alternatif olarak kültürlenmemiş SVF' nin kullanılabilceği göstermiştir.

Toplu ve ark.(129) SVF' nin osteojenik potansiyelini değerlendirmek için, 20 adet rat üzerinde zigomatik defekt oluşturmuştur. Cerrahiden 10 ve 20 hafta sonra radyolojik ve histolojik olarak karşılaştırmıştır. Histolojik değerlendirmede, SVF uygulanan tarafta daha fazla kallus oluştuğu ve 20. haftada aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, 20. haftada SVF uygulanan tarafta, daha az inflamasyon ve nekroz geliştiği

görülmüştür. Araştırmacılar, SVF'nin yüz kemik defektlerinin iyileşmesini artırabileceği sonucuna varmıştır.

Kemik onarımını için SVF kullanımı bugüne kadar, az sayıdaki klinik çalışmada araştırılmış(20, 128, 214) ve bilimsel, teknik, pratik ve düzenleyici engeller nedeniyle rutin klinik uygulamaya alınamamıştır. Literatürde ASCs içeren otolog SVF çeşitli ortopedik uygulamalar için klinik olarak kullanılmaktadır. Otojen yağ SVF'si, osteoartrit (OA), kondromalazi, menisküs yırtığı, femur başı osteonekrozu ve tendon yaralanmalarının tedavisinde potansiyel kırıkta, kemik ve tendonların rejenerasyonunu arttırabilme kapasitesi nedeniyle kullanılmaktadır.(237)

Pak et al. (238) 91 kronik ve dejeneratif eklem hastasına, kültüre edilmemiş ASCs ile PRP karışımını perkütanöz enjeksiyon ile eklem bölgesine uygulamıştır. Hastaların %50-60'sında ağrı skorlarında azalma olmuştur. Ağrıların tamamen iyileşmesi hiçbir hastada rapor edilmemiştir. Enjeksiyon yapılan bölgenin manyetik rezonans(MR) görüntülerinde tümoral bir oluşum rapor edilmemiştir.

Lendeckel et al.(127) bir vaka sunumunda kafa travması sonrası çok parçalı kalvaryum kırığı tedavisi için, fibrin yapıştırıcı ve SVF kullanmıştır. Üç ay sonraki bilgisayarlı tomografi görüntülerinde defektlerde belirgin kemikleşme tespit edilmiştir.

Bir başka vaka serisinde, kalça osteonekroz tedavisi için 3 adet hastada SVF, PRP ve hyaluronik asit kullanılmıştır. 3 ay sonra alınan MR görüntüsünde yeni kemik alanları tespit edilmiştir. Araştırmacılar, yeni kemik alanları oluşmasına SVF içerisindeki kök hücrelerin katkı sağladığını düşünmüştür. Ayrıca, konsolidasyonu veya rejenerasyonun devam edebilmesi için neovaskülarizasyonun gerekli olduğu belirtilmiştir. Ek olarak, fizik tedavi sonuçlarında, subjektif ağrı ve fonksiyonel durum parametrelerinde iyileşme görülmüştür(128).

Saxer et al.(19) yakın zamanda yaptığı bir çalışmada, eksojen faktörler olmaksızın insan kaynaklı SVF hücrelerinin, rat kırık modelinde ve insan humerus kırığında doğrudan kemik oluşumuna ve vaskülarizasyona katkısını değerlendirmiştir(19). Çalışmada SVF eldesi için özel bir cihaz(Cytori Therapeutics, Inc., San Diego, CA, USA) kullanılmıştır. İn vivo çalışmada, 8 hafta sonunda sadece SVF ile tedavi edilen kırıklarda mekanik dayanıklılık rapor edilmiştir. SVF grubunda, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde, daha fazla mineralize kemik hacmi ve toplam kemik hacmi bulunmuştur. İn vivo çalışmanın sonuçlarında, ortamda SVF hücrelerinin bulunması, mekanik stabilite, mineralizasyon ve kemik oluşumunda belirgin bir iyileşme sağlamıştır. Elde edilen verilere dayanarak, 8 hastanın humerus kırığı tedavisinde SVF kullanımının güvenliği ve fizibilitesi değerlendirilmiştir. İşlemden 2 ay sonra osteodansimetri ölçümü yapılmıştır. Ayrıca, plaklar 2 ay sonra çıkartılırken kırık bölgesinden biyopsi alınarak radyolojik ve histolojik analizler gerçekleştirilmiştir. Klinik çalışma sonuçlarında; SVF grubunda kontrol grubuna göre daha fazla mineralizasyon ve yeni kemik hacmi rapor edilmiştir. Ayrıca alınan biyopsi sonuçları, SVF hücrelerinin direkt kemik yapımına katkı sağladığını göstermiştir(19).

Literatürde, ağız diş ve çene cerrahisi alanında SVF sadece Prins et al.(20) tarafından kullanılmıştır. Bu çalışmada, maksiler sinüs yükseltilmesinde, kalsiyum fosfat taşıyıcılarının otolog SVF ile kombine edilmesinin fizibilite, emniyet ve etkinliği araştırılmıştır. 6 adet çift taraflı, 4 adet tek taraflı sinüs yükseltilmesi çalışmaya dahil edilmiştir. Kontrol grubunda kalsiyum fosfat içerikli greftler tek başına kullanılırken, çalışma grubunda taze elde edilmiş SVF ile kalsiyum fosfat taşıyıcı greftler birlikte kullanılmıştır. Bu çalışmada SVF'nin elde edilmesi için özel bir cihaz(Cytori Therapeutics, Inc, San Diego, CA, USA) kullanılmıştır. Çalışma sonuçlarında, kullanılan, mineralize olmayan osteoid yüzdeleri çalışma tarafında, kontrol taraflarına göre daha yüksek bulunmuştur. Mineralize kemik oluşumunun başlangıcı olan bu yüksek osteoid içeriği, SVF desteğinin, bölgede kemik oluşturma kapasitesini belirgin bir şekilde arttırdığını ve dental implant yerleştirilmesinin ardından daha yüksek kemik hacmiyle sonuçlanabileceğini düşündürmektedir. Yazarlar tarafından, SVF'nin bu etkisini en iyi şekilde kullanmak için daha erken bir zamanda, örneğin rutin otolog kemik uygulamasında yapıldığı gibi 4 ay sonra dental implant yerleştirilebileceği düşünülmektedir(20).

Aynı çalışmada(20), SVF ekilen bifazik kalsiyum fosfat ve β -TCP iskeletlerini karşılaştırırken, greftlenmiş alanda kemik oluşumunda belirgin bir fark gözlemlendi. β -TCP kullanılan grupta kontrol grubuna kıyasla daha yüksek kemik hacmi artışı gözlenmiştir. Yazarlar bu durumu, yüzey topografisi, kristal yapısı, tanecik boyutu, porözitesi ve kimyasal bileşim gibi kalsiyum fosfat iskeletlerinin sayısız özelliğinin klinik sonucu etkileyebileceğini ifade etmişlerdir. Mevcut çalışma belirleyici faktörün belirlenmesine izin vermemiştir. Araştırmacılar, tüm iskele / SVF kombinasyonlarının tek tek test edilmesi ve genelleme yapılmaması gerektiği sonucuna varmışlardır(20).

Cerrahi işlem ile aynı seansta tedavi uygulanarak SVF nakline bağlı potansiyel risklerin minimize edilmesine rağmen, intrinsek ve ekstrinsek risk faktörleri hala devam etmektedir. SVF'deki intrinsek progenitör potansiyele sahip heterojen hücre popülasyonunun varlığı, neoplazm veya istenmeyen doku farklılaşması kaygısı uyandırmaktadır(235). Yakın zamanda yapılan bir sistematik derlemede, ASCs' in önemli bir kanser teşvik edici özelliğinin varlığına işaret etmiştir, ancak ASC' ler ve SVF arasında hiçbir ayırım yapılmamıştır(239).

Bir diğer çalışmada, kültüre edilmeden enjekte edilen lipotransfer işleminden ve meme kanseri hücrelerinden saflaştırılan insan CD34 + hücrelerinin, immün yetmezliği olan farelerde tümör büyümesini arttırdığı ancak bu büyümenin, adipositlerden kaynaklanmadığı gösterilmiştir(240).

Literatürdeki bir in vivo çalışmada(241) adipoz SVF nin yan etkileri rapor edilmiştir. Detiger et al.(241) keçilerde enzimatik olarak intervertebral disk dejenerasyonu oluşturmuş ve daha sonra SVF enjekte ederek intervertebral disk rejenerasyonu elde etmeye çalışmıştır. Yazarlar altta yatan yıkıcı mekanizmayı tanımlayamamış olmasına rağmen; lenfositik infiltrasyon, neovaskülarizasyon ve uç plak yıkımı ile karakterize ciddi inflamasyon oluştuğunu belirtmiştir. Yan etkilerin türe bağımlı veya modele özgü olduğunu belirtmeseler de, sorumlu ajan(lar) tanımlanana kadar otolog SVF enjeksiyonlarının intervertebral disk tedavisinin klinik uygulamasında dikkatli kullanılmasını tavsiye etmektedir. Mevcut çalışmamızın sonuçlarında herhangi bir inflamasyon bulgusu görülmemiştir.

Otolog, işlem görmemiş SVF için ekstrensik risk faktörleri potansiyel olarak hücre eldesinden (tehlikeli sterilite ve değişken hücre verimi) kaynaklanmakla birlikte, doz ve uygulama yönteminden de kaynaklanabilir. Örnek kontaminasyonu ve hücre verimi ağırlıklı olarak kullanılan izolasyon yöntemine (enzimatik veya mekanik izolasyon, açık veya kapalı sistem izolasyon) bağlıdır(235).

Ne yazık ki, güvenilir bir doz-etki ilişkisi oluşturmak için yeterli veri yoktur. Bu nedenle, tedavi için gerekli olan yüksek doz hücre, istenmeyen etkiler riskini artırabilir. Ayrıca, yoğunlaştırılmış hücreler, hematopoietik kök hücre nakillerinde görüldüğü gibi, intravenöz olarak infüze edildiğinde, agrega olabilir ve uygulamayı takiben pulmoner emboli veya enfarktüse neden olabilir(235).

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada(242), SVF ile tedavi edilen 1114 hastada ciddi bir yan etki, sistemik enfeksiyon veya kanser görülmediği rapor edilmiştir. Böylece, SVF'nin eklem içerisine uygulanmasının güvenli bir yöntem olduğunu ifade edilmiştir.

ABD'de, özel kliniklerde SVF'nin kontrolsüz kullanımı, hücre terapisinin denetlenmesinden ve düzenlenmesinden sorumlu, Gıda ve İlaç Kurumu'nun (FDA) müdahalesine yol açmıştır. FDA şu anda SVF'yi birden fazla kriteri göz önüne alarak ilaç, cihaz ve / veya biyolojik ürün olarak tanımlamaktadır. Birincisi; adipoz dokuların, adipoz durumlar dışındaki kullanımı nonhomolog olarak kabul edilir. Bu nedenle kök hücreler temel işlevlerini donörde olduğu gibi gerçekleştirmez. FDA tarafından kurulan Federal Düzenlemeler Kanunu'na göre, yağ dokusu diğer dokuları tamponlamak ve desteklemek üzere tasarlanan yapısal doku olarak sınıflandırılır. SVF, bu amacın dışındaki kullanımlar için vücuda girdiğinde, bu homolojik olmayan kullanım ilgili ilaç düzenlemesine tabi olmaktadır. İkincisi, SVF üretmek için gereken üretim adımları, kollajenaz ile enzimatik sindirim yapılması, "minimum manipüle hücreler" uygulaması sınırını aşmaktadır. Sindirim işlemi sırasında, yağ dokusundan gelen yapısal bileşenler çıkarılır ve böylece manipüle edilmiş bir ürün haline gelir. Yine, SVF kullanımı doğal biyolojik işlevinin dışında kalır ve FDA'ın ilaç düzenleyici kurallarına uymalıdır. İlaç düzenlemelerinden muafiyet ancak adipoz doku aynı cerrahi prosedürde hasat edilmesi ile mümkündür. ABD'de SVF üretimi için yağ dokusunu kullanımı ilaç veya cihaz düzenlemeleri ile sıkı olarak denetlenmektedir(235).

Literatür sonuçları genel olarak değerlendirildiğinde SVF uygulamasının tek başına veya ilave biyomateryaller ile kullanımı kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilediği görülmektedir. Çalışmamızın stereolojik sonuçlarına göre, SVF ile kontrol gruplarının karşılaştırılmasında, SVF grubunda kontrol grubuna göre daha az yeni kemik hacmi ölçülmüştür. Osteoklastik aktivite BMP-7 ve RANKL immün boyamalarına göre değerlendirildiğinde, SVF grubunda kontrol grubuna göre maturasyonun çok çok daha önce tamamlandığını ve SVF'nin maturasyonu hızlandırdığını düşündürmektedir. SVF grubunda az miktarda ölçülen yeni kemik hacmi maturasyon ile örtüşmektedir. Yeni oluşan kemiğin neredeyse tamamı matüre olmuştur.

Ozon, üç oksijen atomundan oluşan reaktif bir moleküldür. Ozon, nötrofilleri aktive edebilir, sitokin sentezini uyarabilir ve böylece bağışıklık düzenlenmesi sağlar. Bu sayede, ozon tedavisi bazı enfeksiyöz hastalıkların tedavisine katkı sağlar(149). Ayrıca ozon tedavisi,

oksijen metabolizması, hücre enerjisi, antioksidan savunmalar ve vasküler sistem üzerinde de etkilidir(243). Ozonun, hücre çoğalmasını ve yumuşak doku iyileşmesini uyarması nedeniyle, bifosfonat gibi ilaçlar kullanan hastalarda kemik nekrozu tedavisinde veya oral cerrahi alanlarında yararlı olduğunu bildirilmiştir(147).

Agrillo et al.(244) 131 adet bifosfonata bağlı kemik osteonekrozu hastasında ozon uygulamasının etkinliği değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçlarında, 57 hastada (% 60) semptomların azalmasıyla birlikte tamamen iyileşme; 28 olguda (% 30) lezyonlarda belirgin bir azalma ile semptomların düzelmesi birlikte gözlenirken, 9 hastada (% 10) lezyonda kısmi iyileşme sağlanmıştır. Araştırmacılar ozon uygulaması ile kemik nekrozundaki iyileşmenin sağlanmasını, ozon tedavisinin bazı özelliklerine bağlamışlardır. Başlıca özellikler arasında; aerobik ve anaerobik bakterilere (özellikle Staphylococcus aureus'a karşı), mantarlara ve virüslere karşı antimikrobiyal etkinliği, dolaşım sistemi uyarımı ile hemoglobin oranı ve kırmızı kan hücrelerini arttırarak doku oksijenlenmesini yükseltmesi, sitokin gibi davranarak fagosit oluşumunu ve diyapedezi arttırması, anjiyogenezisi ve fibroblast olumununu uyararak bağışıklık hücrelerinin tepkisini modüle etmesi belirlenmiştir. Araştırmacılara göre ozon; kemik sekestr oluşumuna neden olur, altta yatan kemiğin vaskülarizasyonunu arttırır ve granüle dokuların oluşumunu uyarır. Sonuç olarak, cerrahi tedavi yapılmadan yenilenen bir doku ortaya çıkartmaktadır.

Alan ve ark.(245) yaptığı çalışmada, düşük seviye lazer tedavisi(LLLT) ve ozon tedavisinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri karşılaştırmıştır. Otuz altı erişkin erkek Wistar albino sıçan femurunda monokortikal defektler oluşturulmuş ve defektler nano- HA ile doldurulmuştur. Topikal ozon uygulaması cerrahi yapıldığı gün 30 saniye olacak şekilde ozon jeneratörü aracılığıyla yapılmıştır. Denekler 4 ve 8 hafta olmak üzere 2 dönemde sakrifiye edilmiştir. Histolojik kesitlerde inflamasyon yoğunluğu, bağ dokusu oluşumu, osteojenik potansiyel, osteokalsin aktivitesi ve yeni kemik alanı değerlendirilmiştir. 4 hafta sonuçlarında gruplar arasında istatistiksel fark görülmemesine rağmen, 8 hafta sonuçlarında osteokalsin pozitif hücrelerin sayısı ozon grubunda 8 haftanın sonunda lazer grubuna göre daha yüksek bulunmuştur. 4 haftanın sonunda yeni kemik alanı kontrol grubunda, lazer ve ozon grubunda göre daha fazla görülmüştür. 8 haftanın sonunda ise lazer ve ozon grubundaki yeni kemik alanı kontrol grubundan fazla görülmüştür. Yeni kemik alanı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark 8 haftanın sonunda sadece kontrol ile lazer grupları arasında görülmüştür. Ozon tedavisi ile lazer tedavisi arasında istatistiksel anlamlı fark görülmemesine rağmen iki uygulamanın da greftlenen defekt bölgesinin iyileşmesinde olumlu etkisi olduğu görülmüştür.

Petrucci et al.(148) 12 adet multiple myelom ile ilişkili çene osteonekrozu gelişen hastaya antibiyotik tedavisi, ozon tedavisi ve cerrahi tedavi kombinasyonu uygulamıştır. Antibiyotik(amoksilin+kalvulonik asid 2x1, metranidazol 1x1) tedavisi altında toplamda 15 gün topikal ozon uygulaması yapılmıştır. 8. gün cerrahi tedavi gerçekleştirilmiştir. Cerrahi günü 2 kez topikal ozon uygulaması yapılmıştır. Tedavi edilen 8 hastada(%75) bulgular tamamen iyileşirken, 4 hastada(%25) kısmi iyileşme görülmüştür. Tüm hastalarda ağrı, sekresyon ve ağız kokusu şikâyetleri ortadan kalkmıştır. Kısmi iyileşme, hastalık hikâyesi daha uzun olanlar, daha önceden de bifosfonat kullananlar ve daha büyük cerrahi işlem yapılanlarda görülmüştür.

El Hadary et al.(246) siklosporin etkisi altındaki tavşanların tibialarına yerleştirilen implantların osseointegrasyonu üzerindeki topikal ozonlanmış yağ uygulamasının etkisini değerlendirmiştir. Tavşanlar 8 hafta sonra sakrifiye edilmiş ve örnekler elde edilmiştir. Sonuçlarda, topikal ozon grubunda implantın yüzeyi ile yeni oluşan olgun kemik arasındaki sıkı temas gözlemlenmiştir. Yeni oluşan kemik çok sayıda osteon ve interstisyel kemik adacıkları görülmüştür. Ozon grubunda implanta komşu kemik yüzeylerinde hücresel çoğalma, farklılaşma görülmüş, güçlü ve daha organize bir matür kemik dokusu oluşmuştur. Kontrol grubu örneklerinde, olgunlaşmamış kemik dokusunu temsil eden primer osteonlar görülmüştür. Benzer şekilde, çalışmamızın stereolojik sonuçlarında istatistiksel fark olmasa da lokal ozon grubunda kontrol grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi ölçülmüştür. Lokal ozon grubu ile kontrol grubu, BMP-7 ve RANKL boyamaları gözönüne alınarak karşılaştırıldığında, lokal ozon uygulamasının matürasyonu hızlandırdığı düşünülmektedir. Çalışmamızın lokal ozon grubunun sonuçları literatürdeki mevcut sonuçlar ile örtüşmektedir.

Özdemir ve ark.(38), 27 erkek Wistar sıçanın kafatasında kritik boyutta kemik defekti oluşturmuştur. Denekler otojen kemik grefti grubu; ozon tedavisi olan otojen kemik grubu ve kontrol grubu olacak şekilde 3 gruba ayrılmıştır. Ozon uygulaması 2 hafta boyunca haftada 3 kez ve 30 saniye, %80 oksijen olacak şekilde lokal olarak medikal ozon jeneratörü ile uygulanmıştır. 8 hafta sonra sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir. Histomorfometrik değerlendirmeler ve histolojik analizler yapılmıştır. Birincil değerlendirme kriteri olarak; toplam kemik alanı, ikincil değerlendirme kriteri olarak; osteoblast sayısı ve yeni kemik yapımı belirlenmiştir. Çalışma sonuçlarında; ozon tedavisi, otogreft grubuna kıyasla belirgin şekilde yeni kemik oluşumuna neden olmuştur. Ayrıca ozon grubunda toplam kemik alanı ve toplam kemik alanı yüzdesi otogreft grubundan istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha fazladır. Çalışma sonuçları, ozon tedavisinin yeni kemik oluşumunu arttırdığını ve aynı anda osteoblastların amplifikasyonuna neden olduğunu ortaya koymaktadır.

Kazancıoğlu ve ark.(36) yaptığı çalışmada düşük seviyeli lazer (LLLT) ve ozon tedavisinin sıçan kafatasında kritik kemik defekti iyileşmesindeki etkisini değerlendirmiştir. Toplam 30 Wistar erkek sıçan kafatasında 5 mm çapında defektler açılmıştır. Tüm gruplara bifazik kalsiyum fosfat greft yerleştirilmiştir. Çalışma gruplarına, LLLT ve ozon uygulanmıştır. Ozon uygulaması 2 hafta boyunca, haftada 3 kez, 120 saniye % 80 oksijen olacak şekilde lokal olarak uygulanmıştır. 4 hafta sonra sakrifikasyon gerçekleştirilmiştir. enflamatuar infiltrasyon, bağ dokusu ve yeni kemik alanları değerlendirilmiştir. Histolojik görüntülerde ozon grubunun rejenere kemik alanlarında daha yüksek miktarda osteoblast ve osteositlerin bulunduğu rapor edilmiştir. Çalışma sonuçları, ozon ve lazer tedavisinin sıçan kalvaryum defektinde olumlu etkisinin olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, ozon tedavisinin LLLT tedavisine göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızda benzer şekilde, lokal ozon uygulanan grupta kontrol grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi ve matürasyonu tespit edilmiştir.

Ripamonti et al.(247) yaptığı çalışmada ozonlanmış yağın lokal olarak 10 dakika, 3-10 seans uygulanması ile 10 adet çene osteonekrozu hastasını cerrahi müdehaleye gerek kalmadan başarı ile tedavi etmiştir. Frascino et al.(248) hiperglisemik farelerde kemik iyileşmesi üzerine ozonlu suyun etkilerini analiz etmiştir. Kırk sekiz erkek Wistar sıçan,

hiperglisemik ve kontrol grubunlarına ayırarak, femurlarında monokortikal defekt oluşturulmuştur. Çalışma grubunda yara bölgesi, 100 ml ozonlu su ile (0.004 mg/ml) operasyon sırasında bir kez yıkandı. Kontrol grubunda yıkama işlemi saf su ile yapıldı. 14 ve 21 gün sonra örnekler elde edilmiştir. Histomorfolojik sonuçlar, ozonlu suyun vasküler neoformasyonu ve iyileşme bölgesinin yakınında osteoklast sayısını arttırarak kemik onarımını etkileyebileceğini, ancak kemik trabeküler neoformasyonunu stimule edemediğini ortaya koymuştur. Çalışma sonuçlarında ozonlu su uygulanan grupta yara bölgesinde daha fazla osteoklast görülmüştür. Araştırmacılar, osteoklast aktivitesinin düzenleyici mekanizmalarından birinin reaktif oksijen türleri (ROS) olduğunu ve ozonlu suyun ROS konsantrasyonunu arttırarak yaranın yakınındaki osteoklast göçünü uyurabileceğini varsaymışlardır. Çalışmamızın sonuçlarında lokal ozon uygulaması kontrol grubuna göre bağ doku hacmi ve yeni kemik hacmini arttırmıştır ancak kapiller hacim kontrol grubuna benzer olduğu görülmüştür. Kapiller hacimde farklılık gözlenmemesi uygulanan ozon dozu ve uygulama yöntemi ile ilgili olabilir. BMP-7 boyamaları kontrol grubu ile karşılaştırıldığında osteoklast sayıları neredeyse aynı fakat RANK boyama sonuçlarına göre lokal ozon uygulamasının maturasyonu hızlandırdığı anlaşılmaktadır.

Erdemci ve ark.(37) diş çekimi sonrası sistemik ve topikal ozon uygulamalarının alveolar kemik iyileşmesi üzerine etkilerini araştırmıştır. Uzun süreli preoperatif ve postoperatif sistemik ozon uygulaması ile tek başına preoperatif sistemik ozon ve tek başına topikal ozon uygulaması karşılaştırıldığında istatistiksel olarak daha yüksek trabeküler kemik olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, ilave topikal ozon uygulaması istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık oluşturmamıştır. Yazarlara göre postoperatif uzun dönem sistemik ozon uygulamasının alveolar kemik iyileştirmesini hızlandırdığını rapor etmişlerdir. Bu durumu iki yolla açıklamışlardır. Birincisi, iyileşme sürecinin ameliyat sonrası başlaması ikincisi, kan pıhtısı oluşumu ve alveolar kemiğini örten yumuşak dokunun topikal ozonun yara bölgesine nüfuz etmesini engellemesidir(37). Bu bulgulara dayanarak, çalışmamızda ozon uygulaması postoperatif, uzun dönem ve sistemik olarak uygulanmıştır. Çalışmamızda, topikal ozon uygulamanın önceki araştırmalardaki sınırlandırmalarını ortadan kaldırmak için bariyerin altına ozonlanmış kan uygulanmıştır. Literatürde kemik rejenerasyonu amacıyla bu tür uygulama bulunmadığı için daha önceden tanımlanmış minör hematerapi yönteminin(149) bir modifikasyonu uygulanmıştır.

Kan ve ark.(249) 60 adet wistar rat kullanarak hiperbarik oksijen ve sistemik ozonun tek başına ve kombine kullanımının kafatasında oluşturulan kritik boyutta kemik defektlerinin iyileşmesi üzerindeki etkinliğini karşılaştırmıştır. Ratlar 5, 15 ve 30. günlerde sakrifiye edilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre, hiperbarik oksijen ve ozonun, kemik iyileşmesini arttırmada eşit derecede etkili olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, tek başına hiperbarik oksijen veya ozon tedavisinin, kombine kullanıma göre daha etkili olduğu rapor edilmiştir.

Ozon tedavisi, genellikle ozonun çeşitli gazlar ya da sıvılar ile karıştırılması ve bu karışımların vajina, rektum, kas ve deri altında enjekte edilmesi veya otohemoterapi gibi yöntemler ile uygulanmaktadır(155). Ozon / oksijen karışımının rektal uygulanması, en eski ozon tedavisi yöntemlerinden biridir. Diğer yöntemlere göre basittir ve düşük maliyetlidir.

Ayrıca herhangi bir yan etkisi yoktur. Ozon ürünlerinin bağırsak duvarından emilimi ile kan dolaşımına girdiği ve böylece tüm organizmaya yayıldığı düşünülmektedir (149).

Uygulanacak ozon dozu beklenen etkilerin ortaya çıkması açısından kritik öneme sahiptir. Ozon dozu oksidatif stresi tetikleyecek ancak diğer doku ve organlarda herhangi bir yıkım oluşturmayacak minimum seviyede olmalıdır. Daha önce yapılan prelinik(159-162) çalışmalarda 1 mg ozon uygulanmasının etkinliği gösterildiği için çalışmamızda aynı doz kullanılmıştır. Daha önceki tavşan çalışmasında rektal yol ile gūnaşırı 15 seans ozon tedavisi uygulaması güvenli bir şekilde kullanıldığı için, çalışmamızda da aynı protokol uygulanmıştır(159).

Literatürdeki mevcut çalışmalara bakıldığında, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu modelinde lokal ve sistemik ozon uygulamasının kemik oluşumu ve kalitesi üzerine etkisinin incelenmediği görülmektedir. Ancak, kemik iyileşmesi ve kırık modellerinde lokal ve sistemik ozon uygulamasının olumlu etkilerinin olduğu rapor edilmiştir. Çalışmamızın stereolojik bulgularına göre; yeni kemik hacmi sistemik ozon grubunda, kontrol grubuna göre daha az olarak ölçülmüştür. BMP-2 sonuçları yeni kemik hacmi ile ilgili stereolojik bulgular ile uyumludur. Ancak, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sistemik ozon grubunda yeni kemiğin daha az görülmesi BMP-7 ve RANK boyamalarından yola çıkarak, oluşan kemiğin hızlıca matüre olmasından kaynaklandığını düşündürmektedir. Kontrol grubuna göre sistemik ozon uygulaması maturasyonu arttırmıştır denilebilir. Bu bilgiler literatürdeki diğer çalışmaların sonuçları ile paralel gözükmektedir.

Literatürde titanyum bariyerlerin altına ozonlanmış kan uygulanmasının yeni kemik oluşumu ve kemik matürasyonu üzerine etkisinin değerlendirildiği çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın stereoloji sonuçlarına göre; istatistiksel fark olmasa da lokal ozon grubunda kontrol grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi ölçülmüştür. İstatistiksel fark oluşturacak düzeye ulaşmamış olma nedeni, yetersiz dozdan veya uygulama yönteminden kaynaklanmış olabilir. YKR modelinde ozonlanmış kan uygulamasının etkisi daha önce değerlendirilmediği için araştırmamız pilot çalışma değerindedir. BMP-7 ve RANKL boyamaları dikkate alındığında lokal ozon uygulamasının maturasyonu bir miktar hızlandırdığı söylenebilir. Ozonlanmış kanın bölgeye uygulanması ile matürasyonun artması başlangıçtaki hipotezimizi doğrular niteliktedir.

Yeni kemik dokusu oluşumunda etkili mekanizmayı anlamak açısından önemli olduğu için sadece otolog kan uygulanan kan grubu ile ozonlanmış kanın uygulandığı lokal ozon+kan grupları karşılaştırılmıştır. Stereoloji sonuçlarına göre, yeni kemik hacmi açısından kan grubu ile lokal ozon+kan grupları arasında herhangi bir fark görülmemektedir. BMP-2 sonuçları yeni kemik hacmi ile ilgili stereolojik sonuçları doğrulamaktadır. BMP-7 ve RANKL sonuçları değerlendirildiğinde lokal ozonun matürasyonu hızlandırdığı söylenebilir. Lokal ozonda osteoklastik aktivite fazla olmasına rağmen istatistiksel fark tespit edilememesinin sebebinin ozon dozu ve uygulama yöntemi ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Literatürdeki daha önceki çalışmalarda YKR modelinde, SVF ile lokal/sistemik ozon tek başına ve kombine uygulandığında yeni kemik alanında nasıl bir etki oluşturacağı değerlendirilmemiştir. Çalışmamızın hipotezinde; SVF ile lokal/sistemik ozonun birlikte

uygulamasının sinerjistik etki oluşturarak kemik miktarı ve kalitesini arttıracığı öngörülmüştür. Bu hipotezin değerlendirilmesi için SVF ile SVF+sistemik ozon grubunun karşılaştırılması önemlidir. Stereolojik sonuçlara göre; SVF ile SVF+sistemik ozon grupları karşılaştırıldığında, SVF+sistemik ozon grubunda SVF grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi tespit edilmiştir. BMP-2 sonuçları yeni kemik hacmindeki stereoloji sonuçları ile örtüşmektedir. Yine BMP-7 ve RANK boyamalarına bakıldığında osteoklastik aktivitenin SVF grubuna göre hala devam ettiği düşünülmektedir. Sistemik ozon, SVF'nin tek başına gösterdiği hızlı maturasyon mekanizmalarını farklı hücre içi yolları ile baskılamış olabilir veya sistemik ozonun dozu ile ilgili bir etki ortaya çıkmış olabilir. SVF tek başına sistemik ozon ile kombine kullanımına göre maturasyonda daha etkilidir.

Yine aynı hipotezden yola çıkarak, stereoloji sonuçlarına göre, SVF-lokal ozon+kan grubunda SVF grubu ile benzer yeni kemik hacmi tespit edilmiştir. BMP-2 sonuçları yeni kemik hacmindeki stereoloji sonuçları ile örtüşmektedir. BMP-7 ve RANK boyamalarına bakıldığında yine sistemik ozona benzer şekilde lokal ozon, SVF'nin tek başına gösterdiği hızlı maturasyon mekanizmalarını farklı kaskatlarda baskılamış olabilir veya lokal ozonun dozu ile ilgili olabilir. SVF tek başına maturasyonda lokal ozon ile kombine kullanımına göre daha etkilidir. Lokal ozonun dozu ve uygulama yöntemi ile ilgili çalışmaların yapılmasına gereksinim vardır.

Mevcut literatür incelendiğinde sistemik ozon uygulamasının yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu bölgesine yerleştirilen kanın aktivasyonu üzerine etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın diğer hipotezinde, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu bölgesine yerleştirilen otolog kan ile sistemik olarak uygulanan ozon tedavisinin sinerjistik etki göstereceği ve yeni oluşan kemiğin miktarını ve kalitesinin artacağı öngörülmüştür. stereoloji sonuçlarına göre, kan ile sistemik ozon+kan gruplarının karşılaştırılmasında, kan grubunda sistemik ozon+kan grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi ölçülmüştür. BMP-2 sonuçları yeni kemik hacmindeki stereoloji sonuçları ile örtüşmektedir. BMP-7 ve RANKL boyamaları değerlendirildiğinde tek başına kan uygulamasının, sistemik ozon+kan uygulamasına göre daha hızlı maturasyon yaptığını göstermektedir. Bu sonuç sistemik ozonun dozu, uygulama süresi ve uygulama yolu ile ilgili olabilir.

Çalışma verileri total olarak değerlendirildiğinde, tüm gruplar içerisinde en hızlı maturasyon SVF, sonra kök hücre, grubunda gözlemlenmiştir. SVF kök hücreye göre çok daha hızlı ve kaliteli kemik maturasyonu sağlamıştır. SVF deki bu durumun, mevcut doku bütünlüğünün kök hücre grubuna göre daha fazla korunduğu yapıların (örneğin intersellüler maddelerin ve interlökin 6-8 gibi kimyasal yapılar) hücre farklılaşmasına olan muhtemel etkilerinin daha fazla olmasından kaynaklandığı söylenebilir. Yani, kültüre edilmiş kök hücrelere göre SVF içerisindeki az miktardaki kök hücre intersellüler maddelerin katkısı ile daha hızlı farklanma göstermiş olabilir.

Uygulama yapılması, bakımı ve yerel laboratuvarlardan temini nispeten kolay olduğu, bireylerin neredeyse aynı genetik özellikte olduğu ve bu nedenle hayvanlar arasında anatomik, histolojik ve fizyolojik özelliklerde çok az fark olduğu için çalışmamızda Yeni Zelanda tavşanları deney hayvanları olarak seçildi(246). Ayrıca, kısa bir hayati döngüye

sahiptirler ve araştırma süresinin daha kısa bir sürede incelenmesini kolaylaştırırlar. Yaşam süresi açısından değerlendirildiğinde tavşanın 1 ayı, insan yaşamında 8 aylık süreyi ifade etmektedir(250). Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu modelinde tavşan kalvaryumunda yapılmış çalışmalar literatürde mevcuttur(65-68, 251).

Çalışmamızda, tavşan kafatasına işlem öncesi önceki çalışmalarda gösterildiği gibi 9 adet dekortikasyon yuvası açılmıştır(65, 67). Delik çapının yeni kemiğin hacmini etkisinin olmadığı önceki bir çalışmada gösterilmiştir(67). Osteoindüksiyon olarak adlandırılan sürecin proliferatif fazında belirli moleküller, osteoprogenitör hücrelerin önemli miktarlarda mitozuna neden olur ve daha sonra bu hücreler osteoblastlara farklılaşırlar. Bu moleküllerden kemik morfojenik protein (BMP), kapsamlı bir şekilde incelenmiştir. BMP-2 yeni kemik alanlarında sentezlenen bir proteindir. BMP-7 sadece değil ancak çoğunlukla osteoklastlardan sentezlenen bir proteindir ve remodeling sürecinde etkilidir. RANKL osteoklastik aktivite belirteçidir(252). Mezenkimal kök hücre kaynaklı bazı BMPs kemik iliğinde bulunmaktadır. Ayrıca, üç boyutlu geometriye sahip CaP biyomalzemeleri, dolaşımda endojen BMPs'i(özellikle BMP-2) bağlayabilir ve osteoindüktif hale gelebilir(75, 201). Çalışmamızda dekortikasyon ile kafatası kemik iliği açılarak kanama sağlanmıştır. Bu şekilde kemik iliğindeki BMPs aktifleştirilmiştir.

Kullanım kolaylığı, dokular için toksik olmaması ve sıkı bir bağlantı yapması nedeniyle çalışmamızda NBSA kullanılarak, herhangi bir vidalama işlemi yapılmamıştır. Titanyum bariyerin altına yumuşak doku göçünü engellemesi ve çok iyi adapte olması gerektiği için yapıştırılmasının en uygun yöntem olduğu düşünülmüştür.

Benzer hayvan çalışma modellerinde 4 haftalık takip sürecinin yeterli olduğu belirlenmiştir(65, 253). Bu nedenle çalışmamızın süresi 4 hafta olmasına karar verilmiştir. Tavşan yaşam süresinde 1 aylık süre insan yaşamında 8 aylık sürece tekabül ettiği göz önüne alındığında, tavşanda 4 haftalık süreçte YKR bölgesinde daha fazla matür kemik hacmi beklenmektedir. Bu açıdan bakıldığında, 4 haftalık süreç sonunda oluşan kemiğin remodeling aşamasını tamamlaması istenmektedir. 4 hafta sonunda, YKR bölgesinde yeni kemik alanları yerine matürasyonunu tamamlamış lameller kemik alanları bulunması tercih edilmektedir.

Stereoloji, histomorfometrinin bir dalı olup iki boyutlu kesitler kullanılarak üç boyutlu yapıların bilgisine ulaşır. Herhangi bir yapının bileşenleri boyunca geçen kesitler yapıda bulunan bileşenlerin boyutuna, şekline, hacmine ve yönüne bağlı olarak izdüşümler üretecektir. Bu izdüşümlerden yola çıkarak doğrudan yorum yapmak bunların ait olduğu bileşenlerin 3 boyutlu özelliğine ait gerçek verilere ulaşılmasından dolayı yanıltıcı olabilir. Bu hususta histomorfometrik sonuçlar, uygun metotlarla desteklenmezse yanıltıcı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Stereolojinin temelini ise "sistemik rastgele örnekleme kuralı" oluşturur. Doku, belli aralıklarla sistemik olarak örneklenir ve böylece her alana eşit örnekleme şansı sunar. Böylece, stereoloji etkin ve tarafsız yaklaşımları ile yanıltıcı sonuçları ortadan kaldıran çözümler sunar. Stereolojik metotlar, kısa zamanda daha az hatalı sonuç verir ve gerçek değerden sapmaya yol açmaz(252, 253). Literatürde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda yeni kemiğin mikro yapısı genellikle histomorfometrik analiz ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızda daha güvenilir, objektif sayısal değerlendirmeye ve üç

boyutlu analize imkân tanıyan stereolojik değerlendirme yapılmıştır. Ayrıca immünohistokimyasal boyamalar(BMP-2, BMP-7 ve RANKL) ile yeni oluşan kemik alanı ve matürasyonu değerlendirilmiştir.

Çalışmamızın sınırlandırmaları;

- Farklı dozlarda SVF, lokal ve sistemik ozon uygulaması yapılmaması
- Farklı yüzey özelliklerindeki ve partikül boyutlarındaki β -TCP biyomateryallerinin kullanılmaması
- Farklı türde taşıyıcı materyallerinin çalışmaya dahil edilmemesi
- Farklı sürelerde ortaya çıkabilecek etkilerin araştırılmaması
- Elde edilen SVF içeriğindeki kök hücre sayısı, kalitesi ve canlılığının standardize edilmemesi
- SVF'nin osteoblastik farklılaşma kapasitesinin ölçülmemesi
- Titanyum bariyer içerisinde greft materyalinin ve homojen dağılımın sağlanamaması
- Mineralizasyon değerlendirilmesinin yapılmaması

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Kemik dokusunda, yaşam boyunca yenilenme ve yeniden şekillenme devam eder. Bu potansiyeli sayesinde, fizyolojik koşulların yanı sıra yaralanma veya travma durumunda kemik gelişimini ve büyümesini sağlar. Kemik büyümesi ve yeniden şekillenmesi için bölgeye yeterli kan desteğinin olması ve kemik remodeling hücrelerinin de ortamda bulunması ile gerekmektedir. Osteoblast ve osteoklast hücreleri ile mikrovasküler endotel arasındaki ilişki kemik rejenerasyonuna yol açan hücresel aktiviteleri düzenler.

Önceki çalışmalarda doğal kemik rejeneratif nişin taklit edilmesi ve kontrol edilebilmesi için, farklı hücresel kombinasyonlar değerlendirilmiştir. Ancak, hücre elde edilmesindeki bağlı bazı sınırlamalar nedeniyle ideal hücre kombinasyonu ve bu hücrelerin potansiyelini en üst düzeye çıkartan koşullar henüz tanımlanamamıştır. Literatürde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda SVF, lokal ve sistemik ozonun tek başına ve kombine olarak etkinliğinin değerlendirildiği benzer bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamızın histolojik analizinde stereolojik değerlendirmenin kullanılması ve pozitif kontrol grubu olarak MSCs'in de çalışmaya dâhil edilmesi çalışmamıza özgünlük ve güvenilirlik kazandırmaktadır.

Çalışmamızın sınırlandırmalarına rağmen tavşan kafatasında yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu modelinde;

- Kemik doku mühendisliğinde SVF kullanımı kök hücre kullanımına göre; düşük maliyetli, kullanımı kolay, etik kurallar açısından daha uygulanabilir ve terapötik potansiyeli bulunması nedeniyle umut vaat eden bir yöntemdir. Bu nedenle çalışmamızın hipotezinde; SVF'nin tek başına ve lokal/sistemik ozon uygulamaları ile birlikte uygulanması kök hücredeki kadar üstün sonuçlar vereceği öngörülmüştür. Nitekim kök hücrenin de içinde olduğu tüm çalışma grupları içerisinde en fazla matürasyon SVF grubunda görülmüştür. Matürasyonun fazla olmasının, mevcut doku bütünlüğünün kök hücre grubuna göre daha fazla korunduğu yapıların (örneğin intersellüler maddelerin, sitokinler ve interlökin 6-8 gibi kimyasal yapılar) hücre farklılaşmasına olan muhtemel etkilerinin daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. İleriki çalışmalarda SVF kullanımının diferansiyasyonu ve matürasyonu hangi mekanizma ile sağladığının gösterilmesine ihtiyaç vardır. Kültüre edilmiş kök hücre grubuna göre, SVF'deki az miktardaki kök hücre popülasyonu miks yapısı sayesinde, daha üst düzey diferansiyasyon ve kemik matürasyonu sağlamış olabilir.
- Çalışmamızın başlangıcında, sistemik ozon uygulamasının organizmada ortaya çıkarılacağı reaksiyonlar sayesinde YKR bölgesinde kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ve daha matür kemik elde edileceği öngörülmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında sistemik ozon grubunda yeni kemiğin daha az görülmesi BMP-7 ve RANKL boyamalarından, oluşan kemiğin hızlıca matüre olmasından kaynaklandığı

anlaşılmaktadır. Nitekim kontrol grubuna göre sistemik ozon grubunda kemik matürasyonu daha fazla görülmüştür. Ancak; sistemik ozon grubunda kök hücre grubuna göre daha fazla matürasyon görülmüştür. Kök hücre seviyesinde matürasyon elde edilmesinin muhtemel sebepleri; hücresel komponentlerin azlığı, sistemik ozonun uygulama yolu, uygulama dozu ve uygulama süresi olabilir. İleriki çalışmalarda bu konuların üzerinde yoğunlaşılabilir.

- YKR bölgesine ozonlanmış kan uygulaması ile ortaya çıkacak reaksiyonlar sayesinde bölgede kontrol grubuna göre daha fazla miktarda ve daha matür kemik elde edileceği öngörülmüştür. Çalışma sonuçlarında, lokal ozon grubunda kontrol grubuna göre daha fazla yeni kemik hacmi ölçülmüştür. Ayrıca, kontrol grubuna göre lokal ozon uygulaması matürasyonu hızlandırmıştır. Ancak; lokal ozon grubunda kök hücre grubuna göre daha az matürasyon görülmüştür. Kök hücre seviyesinde matürasyon elde edilemesinin muhtemel sebepleri; hücresel komponentlerin yetersizliği, sistemik lokal uygulama yolu, uygulama dozu ve uygulama süresi olabilir. İleriki çalışmalarda bu konuların üzerinde yoğunlaşılabilir.
- SVF ile sistemik ozonun birlikte uygulanması potansiyel etkileri nedeniyle sinerjistik etki oluşturarak, tek başına kullanımlarına göre YKR bölgesinde daha fazla miktarda kemik miktarı ve matürasyonu oluşturacağı öngörülmüştür. Çalışma sonuçlarında; kombine kullanımda istenilen matürasyon elde edilememiştir. Bunun muhtemel sebebinin; sistemik ozon uygulamasının SVF'nin etkin matürasyon mekanizmasını farklı hücre içi yolları olumsuz etkilemiş olabileceği ya da ozon tedavisinin uygulama yöntemi, dozu veya sıklığı olduğunu düşünmekteyiz. İleriki çalışmalarda, SVF ile sistemik ozonun uygulanmasının etkinliğinin hücresel seviyede ve farklı tedavi prosedürleri ile değerlendirilmesine gereksinim vardır
- Lokal ozonun bölgede oluşturacağı reaksiyonlar sayesinde lokal ozon+kan grubunda ile kanın yalnız başına kullanıldığı gruba göre YKR bölgesinde daha fazla miktarda ve daha matür kemik elde edileceği öngörülmüştür. Yeni kemik hacmi açısından gruplar arası fark görülmemiştir. Lokal ozon osteoklastik aktiviteyi dolayısıyla matürasyonu hızlandırmıştır. Lokal ozonda osteoklastik aktivite fazla olmasına rağmen kemik hacmi açısından istatistiksel fark tespit edilememesi uygulanan ozonun dozu ve uygulama şekli ile ilgili olabilir.
- SVF'nin kök hücre seviyesine çıkarılması için uygulanan lokal ve sistemik ozon yöntemleri yeterli olmamıştır. Bunun altındaki muhtemel faktör olarak uygulanan ozonun dozu, uygulama yöntemi veya SVF'nin içeriğinin standardize edilemesi olabilir.

- Lokal ozon grubunda kök hücre grubundan daha fazla yeni kemik oluşumu tespit edilmesine rağmen matürasyon açısından daha düşük seviyededir. Daha fazla kapiller hacim elde edilmesine yönelik yöntemler geliştirilmelidir.
- Tüm gruplar içerisinde en hızlı maturasyon SVF, sonra kök hücre, sonra da kan gruplarında gözlemlenmiştir.
- İleriki çalışmalarda SVF'nin içeriğinin ve kemik rejenerasyonundaki etki mekanizmasının hücresel düzeyde araştırılmasına ihtiyaç vardır.
- SVF, lokal ozon ve sistemik ozon uygulamalarının akut dönem etkilerinin farklı immünojik işaretçiler ile ortaya konulmasına ihtiyaç vardır.
- Mevcut çalışmamız, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu modelinde indüklenmemiş SVF hücrelerinin prospektif kullanımını belgeleyen ilk çalışmadır. Ek çalışmalar, SVF risklerini ele alacak ve hücrelerin yerleştirildikten sonraki sağ kalımı, reddedilmesi ve işlevsel özellikleri gibi önemli soruları ele almalıdır.

Özellikle, insanlarda in vivo olarak MSCs, SVF ve lokal/sistemik ozonun kemik rejenerasyonu üzerine etkileri ile alakalı hücresel temel hakkında şaşırı derecede az bilgi mevcuttur. Bu alanda daha fazla bilgi sahibi olmak iskelet tamirinde entegre bir stratejinin anahtarı olabilir. Gelecekte, kemik oluşumunun normal sürecini taklit eden tedavi stratejileri geliştirilmesi ile kemik rejenerasyonu gerektiren durumların başarılı bir şekilde tedavisi sağlanacak ve uzun vadede morbidite ve maliyetleri azaltacaktır. Travmaya, ablatif cerrahiye bağlı kemik rezeksiyonu, yaşlanma ve metabolik veya genetik iskelet bozuklukları gibi birçok kemik hastalığı bu sayede başarıyla tedavi edilebilecektir.

ÖZET

Tavşan Kalvaryumu Modelinde Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Stromal Vasküler Fraksiyon İle Lokal Ve Sistemik Ozon Kullanımının Etkinliğinin Karşılaştırmalı Olarak Araştırılması

Bu çalışmanın amacı; tavşan kalvaryumunda yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu modelinde, antioksidan özelliğe sahip ozon ve stromal vasküler fraksiyon(SVF) etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada 30 adet erişkin, erkek Yeni Zelanda cinsi tavşan kullanıldı. Tavşanlar biri kontrol diğerleri deney grubu olmak üzere 10 gruba ayrıldı. Kontrol grubunda, kemikte sadece dekortikasyon yapılarak titanyum bariyerlerin altına sentetik kemik grefti yerleştirildi. Deney grubundaki titanyum bariyerlerin içerisine dekortikasyonu takiben; lokal ozon uygulaması, sistemik ozon uygulaması, SVF ve bu uygulamaların kombinasyonları kullanılmıştır. Tavşanlar 30. günde sakrifiye edilerek, örnekler elde edildi. Elde edilen örneklerde; yeni kemik, bağ dokusu ve kapiller hacim stereolojik olarak ölçüldü. Ayrıca örneklerde immünohistokimyasal boyama yapıldı. Kontrol grubuna göre, lokal ve sistemik ozon uygulamasının kemik matürasyonunu hızlandırdığı anlaşıldı. Tüm gruplar içerisinde en hızlı matürasyon SVF grubunda, daha sonra kök hücre grubunda gözlemlendi. Çalışma sonuçlarımıza göre; SVF uygulaması, kök hücre uygulamasına göre çok daha hızlı ve kaliteli matürasyon sağladığı anlaşıldı.

Anahtar Kelimeler: yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, ozon, stromal vasküler fraksiyon, yeni kemik, tavşan kalvaryumu

ABSTRACT

Comparative Investigation of the Bone Formation Effects of Stromal Vascular Fraction, Local And Systemic Ozone Used Guided Bone Regeneration Model on the Rabbit Calvarium

The aim of this study is investigate the efficacy of ozone and stromal vascular fraction (SVF) on guided bone regeneration model in rabbit calvarium. Thirty adult male New Zealand rabbits were used in this study. The study included ten groups, one of which was a control group. Two titanium barriers were fixed on each rabbit's calvarium. Synthetic bone graft was placed under the titanium barriers after decortication application in the control group. Local ozone, systemic ozone, SVF application and combinations of these procedure following decortication into the titanium barriers in the experimental group. The rabbits were sacrificed after 30 days and samples were obtained. New bone, connective tissue and capillary volume were measured stereologically in the samples. Immunohistochemical staining was also performed in the samples. It has been understood that local and systemic ozone administration accelerates bone maturation compared to the control group. Our findings suggest that, the fastest maturation was observed in the SVF group, then in the stem cell group among all groups. SVF application provides much faster and better maturation than stem cell application in this study.

Key words: guided bone regeneration, ozone, stromal vascular fraction, new bone, rabbit calvarium

KAYNAKLAR

1. Farré-Guasch E, Prins H-J, Overman JR, ten Bruggenkate CM, Schulten EA, Helder MN, et al. Human maxillary sinus floor elevation as a model for bone regeneration enabling the application of one-step surgical procedures. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012;19(1):69-82.
2. Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. A meta-analysis of histomorphometric results and graft healing time of various biomaterials compared to autologous bone used as sinus floor augmentation material in humans. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(5):493-507.
3. Sándor GK, Tuovinen VJ, Wolff J, Patrikoski M, Jokinen J, Nieminen E, et al. Adipose stem cell tissue-engineered construct used to treat large anterior mandibular defect: a case report and review of the clinical application of good manufacturing practice-level adipose stem cells for bone regeneration. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;71(5):938-50.
4. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering*. 2001;7(2):211-28.
5. Monaco E, Bionaz M, Hollister S, Wheeler M. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology*. 2011;75(8):1381-99.
6. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell biochemistry and function*. 2008;26(6):664-75.
7. Jurgens WJ, Oedayrajsingh-Varma MJ, Helder MN, ZandiehDoulabi B, Schouten TE, Kuik DJ, et al. Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Cell and tissue research*. 2008;332(3):415-26.
8. Bredeson C, Leger C, Couban S, Simpson D, Huebsch L, Walker I, et al. An evaluation of the donor experience in the canadian multicenter randomized trial of bone marrow versus peripheral blood allografting. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2004;10(6):405-14.
9. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H, et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular biology of the cell*. 2002;13(12):4279-95.
10. Gimble JM, Bunnell BA, Chiu ES, Guilak F. Concise review: Adipose-derived stromal vascular fraction cells and stem cells: Let's not get lost in translation. *Stem Cells*. 2011;29(5):749-54.
11. Astori G, Vignati F, Bardelli S, Tubio M, Gola M, Albertini V, et al. " In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine*. 2007;5(1):55.
12. Gimble JM, Bunnell BA, Guilak F. Human adipose-derived cells: an update on the transition to clinical translation. *Regenerative medicine*. 2012;7(2):225-35.
13. Gerber H-P, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nature medicine*. 1999;5(6):623-8.
14. Maes C, Kobayashi T, Selig MK, Torrekens S, Roth SI, Mackem S, et al. Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels. *Developmental cell*. 2010;19(2):329-44.
15. Dirckx N, Hul M, Maes C. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*. 2013;99(3):170-91.
16. Güven S, Mehrkens A, Saxer F, Schaefer DJ, Martinetti R, Martin I, et al. Engineering of large osteogenic grafts with rapid engraftment capacity using mesenchymal and endothelial progenitors from human adipose tissue. *Biomaterials*. 2011;32(25):5801-9.

17. Liu B, Tan X-Y, Liu Y-P, Xu X-F, Li L, Xu H-Y, et al. The adjuvant use of stromal vascular fraction and platelet-rich fibrin for autologous adipose tissue transplantation. *Tissue Engineering Part C: Methods*. 2012;19(1):1-14.
18. Veronesi F, Maglio M, Tschon M, Aldini NN, Fini M. Adipose-derived mesenchymal stem cells for cartilage tissue engineering: State-of-The-Art in in vivo studies. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2014;102(7):2448-66.
19. Saxer F, Scherberich A, Todorov A, Studer P, Miot S, Schreiner S, et al. Implantation of stromal vascular fraction progenitors at bone fracture sites: from a rat model to a first-in-man study. *Stem Cells*. 2016;34(12):2956-66.
20. Prins H-J, Schulten EA, Ten Bruggenkate CM, Klein-Nulend J, Helder MN. Bone regeneration using the freshly isolated autologous stromal vascular fraction of adipose tissue in combination with calcium phosphate ceramics. *Stem cells translational medicine*. 2016;5(10):1362-74.
21. Jurgens WJ, Kroeze RJ, Bank RA, Ritt MJ, Helder MN. Rapid attachment of adipose stromal cells on resorbable polymeric scaffolds facilitates the one-step surgical procedure for cartilage and bone tissue engineering purposes. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2011;29(6):853-60.
22. Feng Z, Ting J, Alfonso Z, Strem BM, Fraser JK, Rutenberg J, et al. Fresh and cryopreserved, uncultured adipose tissue-derived stem and regenerative cells ameliorate ischemia-reperfusion-induced acute kidney injury. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2010;25(12):3874-84.
23. Van Dijk A, Naaijken B, Jurgens W, Nalliah K, Sairras S, Van der Pijl R, et al. Reduction of infarct size by intravenous injection of uncultured adipose derived stromal cells in a rat model is dependent on the time point of application. *Stem cell research*. 2011;7(3):219-29.
24. Kim A, Kim D-H, Song H-R, Kang W-H, Kim H-J, Lim H-C, et al. Repair of rabbit ulna segmental bone defect using freshly isolated adipose-derived stromal vascular fraction. *Cytotherapy*. 2012;14(3):296-305.
25. Rhee SC, Ji Y-h, Gharibjanian NA, Dhong ES, Park SH, Yoon E-S. In vivo evaluation of mixtures of uncultured freshly isolated adipose-derived stem cells and demineralized bone matrix for bone regeneration in a rat critically sized calvarial defect model. *Stem cells and development*. 2010;20(2):233-42.
26. Chandra K, Salman AS, Mohd A, Sweetey R, Ali KN. Protection against FCA induced oxidative stress induced DNA damage as a model of arthritis and In vitro anti-arthritic potential of costus speciosus rhizome extract. *Inter J Pharma Phyto Res*. 2015;7(2):383-9.
27. Durak K, Bilgen ÖF, Kaleli T, Tuncel P, Özbek R, Turan K. Antioxidant effect of α -tocopherol on fracture haematoma in rabbits. *Journal of International Medical Research*. 1996;24(5):419-24.
28. Watanabe T, Nakada H, Takahashi T, Fujita K, Tanimoto Y, Sakae T, et al. Potential for acceleration of bone formation after implant surgery by using a dietary supplement: an animal study. *Journal of oral rehabilitation*. 2015;42(6):447-53.
29. Saito W, Uchida K, Matsushita O, Inoue G, Sekiguchi H, Aikawa J, et al. Acceleration of callus formation during fracture healing using basic fibroblast growth factor-kidney disease domain-collagen-binding domain fusion protein combined with allogenic demineralized bone powder. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2015;10(1):59.
30. Gao Y, Li C, Wang H, Fan G. Acceleration of bone-defect repair by using AW MGC loaded with BMP2 and triple point-mutant HIF1 α -expressing BMSCs. *Journal of orthopaedic surgery and research*. 2015;10(1):83.
31. Munker R, Andreeff M. Induction of death (CD95/FAS), activation and adhesion (CD54) molecules on blast cells of acute myelogenous leukemias by TNF-alpha and IFN-gamma. *Cytokines and molecular therapy*. 1996;2(3):147-59.
32. Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;236(3):591-3.
33. Kazancioglu H, Kurklu E, Ezirganli S. Effects of ozone therapy on pain, swelling, and trismus following third molar surgery. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;43(5):644-8.

34. Bocci VA. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. Archives of medical research. 2006;37(4):425-35.
35. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, et al. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. European journal of oral sciences. 2006;114(5):435-40.
36. Kazancioglu HO, Ezirganli S, Aydin MS. Effects of laser and ozone therapies on bone healing in the calvarial defects. Journal of Craniofacial Surgery. 2013;24(6):2141-6.
37. Erdemci F, Gunaydin Y, Sencimen M, Bassorgun I, Ozler M, Oter S, et al. Histomorphometric evaluation of the effect of systemic and topical ozone on alveolar bone healing following tooth extraction in rats. International journal of oral and maxillofacial surgery. 2014;43(6):777-83.
38. Ozdemir H, Toker H, Balci H, Ozer H. Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: a histologic and histometric study in rats. Journal of periodontal research. 2013;48(6):722-6.
39. Eroschenko VP. Atlas of Histology with Functional Correlations. Eleventh ed. United States of America: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.
40. Mescher AL. Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas. fourteenth ed: The McGraw-Hill Companies; 2016.
41. Sağlam M, Histoloji G. Genişletilmiş üçüncü Baskı, Emel Matbaacılık Sanayi. Ankara; 1987.
42. Ross. MH., Pawlina W. Histoloji Konu Anlatımı ve Atlas. six ed. Baykal B, editor: Palme Yayıncılık, Ankara; 2014. 218-53 p.
43. Web_1.(2013), Natural Height Growth web site, <http://www.naturalheightgrowth.com/2013/07/22/increase-long-bone-length-and-increase-height-by-inhibiting-complete-ossification-of-the-epiphysis-through-ischemia-big-breakthrough/>, (20.12.2017).
44. Doonquah L, Lodenquai R, Mitchell AD. Surgical techniques for augmentation in the horizontally and vertically compromised alveolus. Dental clinics of North America. 2015;59(2):389-407.
45. Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. Plastic and reconstructive surgery. 1983;72(6):778-85.
46. Rawashdeh MA, Telfah H. Secondary alveolar bone grafting: the dilemma of donor site selection and morbidity. The British journal of oral & maxillofacial surgery. 2008;46(8):665-70.
47. Ilizarov GA. [Basic principles of transosseous compression and distraction osteosynthesis]. Ortopediia travmatologiya i protezirovaniye. 1971;32(11):7-15.
48. Bernstein S, Cooke J, Fotek P, Wang HL. Vertical bone augmentation: where are we now? Implant dentistry. 2006;15(3):219-28.
49. Paley D. Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. Clinical orthopaedics and related research. 1990(250):81-104.
50. Block MS, Almerico B, Crawford C, Gardiner D, Chang A. Bone response to functioning implants in dog mandibular alveolar ridges augmented with distraction osteogenesis. The International journal of oral & maxillofacial implants. 1998;13(3):342-51.
51. Block MS, Chang A, Crawford C. Mandibular alveolar ridge augmentation in the dog using distraction osteogenesis. Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 1996;54(3):309-14.
52. Schettler D. Sandwich technic with cartilage transplant for raising the alveolar process in the lower jaw. Fortschritte der Kiefer- und Gesichts-Chirurgie. 1976;20:61-3.
53. Marchetti C, Trasarti S, Corinaldesi G, Felice P. Interpositional bone grafts in the posterior mandibular region: a report on six patients. The International journal of periodontics & restorative dentistry. 2007;27(6):547-55.
54. Felice P, Piana L, Checchi L, Pistilli R, Pellegrino G. Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with a 2-stage inlay technique: a case report. Implant dentistry. 2012;21(3):190-5.

55. Politi M, Robiony M. Localized alveolar sandwich osteotomy for vertical augmentation of the anterior maxilla. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1999;57(11):1380-2.
56. Stellingsma C, Raghoobar GM, Meijer HJ, Batenburg RH. Reconstruction of the extremely resorbed mandible with interposed bone grafts and placement of endosseous implants. A preliminary report on outcome of treatment and patients' satisfaction. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1998;36(4):290-5.
57. Felice P, Marchetti C, Iezzi G, Piattelli A, Worthington H, Pellegrino G, et al. Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with interpositional bloc grafts: bone from the iliac crest vs. bovine anorganic bone. Clinical and histological results up to one year after loading from a randomized-controlled clinical trial. *Clinical oral implants research*. 2009;20(12):1386-93.
58. Elgali I, Omar O, Dahlin C, Thomsen P. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited. *European Journal of Oral Sciences*. 2017;125(5):315-37.
59. Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *Journal of clinical periodontology*. 1982;9(3):257-65.
60. Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstrom J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *Journal of clinical periodontology*. 1986;13(6):604-16.
61. Salamanca E, Tsai CY, Pan YH, Lin YT, Huang HM, Teng NC, et al. In vitro and in vivo study of a novel porcine collagen membrane for guided bone regeneration. *Materials (Basel, Switzerland)*. 2016;9(11).
62. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *The open dentistry journal*. 2014;8:56-65.
63. Wang HL, Boyapati L. "PASS" principles for predictable bone regeneration. *Implant dentistry*. 2006;15(1):8-17.
64. Sumi Y, Miyaishi O, Tohna I, Ueda M. Alveolar ridge augmentation with titanium mesh and autogenous bone. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2000;89(3):268-70.
65. Ezirganli S, Polat S, Baris E, Tatar I, Celik HH. Comparative investigation of the effects of different materials used with a titanium barrier on new bone formation. *Clinical oral implants research*. 2013;24(3):312-9.
66. Van Steenberghe D, Johansson C, Quirynen M, Molly L, Albrektsson T, Naert I. Bone augmentation by means of a stiff occlusive titanium barrier. *Clinical oral implants research*. 2003;14(1):63-71.
67. Min S, Sato S, Saito M, Ebihara H, Arai Y, Ito K. Micro-computerized tomography analysis: dynamics of bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2008;106(6):892-5.
68. Dundar S, Ozgur C, Yaman F, Cakmak O, Saybak A, Ozercan IH, et al. Guided bone regeneration with local zoledronic acid and titanium barrier: An experimental study. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2016;12(4):2015-20.
69. Molly L, Quirynen M, Michiels K, van Steenberghe D. Comparison between jaw bone augmentation by means of a stiff occlusive titanium membrane or an autologous hip graft: a retrospective clinical assessment. *Clinical oral implants research*. 2006;17(5):481-7.
70. Evian CI, Rosenberg ES, Coslet JG, Corn H. The osteogenic activity of bone removed from healing extraction sockets in humans. *Journal of periodontology*. 1982;53(2):81-5.
71. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant dentistry*. 1993;2(3):158-67.
72. Barboza E, Caula A, Machado F. Potential of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in bone regeneration. *Implant dentistry*. 1999;8(4):360-7.
73. Quattlebaum JB, Mellonig JT, Hensel NF. Antigenicity of freeze-dried cortical bone allograft in human periodontal osseous defects. *Journal of periodontology*. 1988;59(6):394-7.

74. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *The International journal of oral & maxillofacial implants*. 1999;14(6):835-40.
75. LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clinical orthopaedics and related research*. 2002;395:81-98.
76. 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. *JBJS*. 1998;80(7):985-96.
77. Saini N, Sikri P, Gupta H. Evaluation of the relative efficacy of autologous platelet-rich plasma in combination with beta-tricalcium phosphate alloplast versus an alloplast alone in the treatment of human periodontal infrabony defects: a clinical and radiological study. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2011;22(1):107-15.
78. Wiltfang J, Merten H, Schlegel K, Schultze-Mosgau S, Kloss F, Rupprecht S, et al. Degradation characteristics of α and β tri-calcium-phosphate (TCP) in minipigs. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2002;63(2):115-21.
79. Wu W, Chen X, Mao T, Chen F, Feng X. Bone marrow-derived osteoblasts seeded into porous beta-tricalcium phosphate to repair segmental defect in canine's mandibula. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg*. 2006;12(4):268-76.
80. Grinnemo K-H, Sylvén C, Hovatta O, Dellgren G, Corbascio M. Immunogenicity of human embryonic stem cells. *Cell and tissue research*. 2008;331(1):67-78.
81. Leong K, Cheah C, Chua C. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003;24(13):2363-78.
82. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell*. 2000;100(1):157-68.
83. Karaşahin T. Embriyonik kök hücreler. *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*. 2012;9(1).
84. Matur İ, Solmaz S. Kök Hücre Üretiminde Güncel Yaklaşımlar. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*. 2011;20(3).
85. Eiraku M, Tohgo A, Ono K, Kaneko M, Fujishima K, Hirano T, et al. DNER acts as a neuron-specific Notch ligand during Bergmann glial development. *Nature neuroscience*. 2005;8(7):873-80.
86. Potdar PD, Jethmalani YD. Human dental pulp stem cells: Applications in future regenerative medicine. *World journal of stem cells*. 2015;7(5):839-51.
87. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience reports*. 2015;35(2).
88. Can A. Kök Hücre: Biyolojisi, türleri ve tedavide kullanımları. Ankara: Akademisyen Tıp Kitabevleri; 2014. 201-311 p.
89. Brook FA, Gardner RL. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(11):5709-12.
90. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science (New York, NY)*. 2007;318(5858):1917-20.
91. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science (New York, NY)*. 1998;282(5391):1145-7.
92. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-6.
93. Kovach TK, Dighe AS, Lobo PI, Cui Q. Interactions between MSCs and immune cells: implications for bone healing. *Journal of immunology research*. 2015;2015:752510.
94. Karaoz E, Okcu A, Unal ZS, Subasi C, Saglam O, Duruksu G. Adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells efficiently differentiate into insulin-producing cells in pancreatic islet microenvironment both in vitro and in vivo. *Cytotherapy*. 2013;15(5):557-70.

95. Schweizer R, Tsuji W, Gorantla VS, Marra KG, Rubin JP, Plock JA. The role of adipose-derived stem cells in breast cancer progression and metastasis. *Stem cells international*. 2015;2015:120949.
96. Ishii T, Eto K. Fetal stem cell transplantation: Past, present, and future. *World journal of stem cells*. 2014;6(4):404-20.
97. Liao Y, Geyer MB, Yang AJ, Cairo MS. Cord blood transplantation and stem cell regenerative potential. *Experimental hematology*. 2011;39(4):393-412.
98. Korbling M, Estrov Z. Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *The New England journal of medicine*. 2003;349(6):570-82.
99. Shambloott MJ, Axelman J, Wang S, Bugg EM, Littlefield JW, Donovan PJ, et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(23):13726-31.
100. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, NY)*. 1999;284(5411):143-7.
101. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*. 2004;18(6):877-91.
102. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells and hematopoietic stem cell transplantation. *Immunology letters*. 2015;168(2):215-21.
103. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *International review of cytology*. 1976;47:327-59.
104. Silva WA, Jr., Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, et al. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2003;21(6):661-9.
105. Gregory CA, Prockop DJ, Spees JL. Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Experimental cell research*. 2005;306(2):330-5.
106. Periyasamy-Thandavan S, Herberg S, Arounleut P, Upadhyay S, Dukes A, Davis C, et al. Caloric restriction and the adipokine leptin alter the SDF-1 signaling axis in bone marrow and in bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Molecular and cellular endocrinology*. 2015;410:64-72.
107. Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *Journal of cellular physiology*. 2001;189(1):54-63.
108. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, Goh J, Lee EH. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue. *Tissue Eng*. 2003;9(4):733-44.
109. Guilak F, Lott KE, Awad HA, Cao Q, Hicok KC, Fermor B, et al. Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *Journal of cellular physiology*. 2006;206(1):229-37.
110. Peterson B, Zhang J, Iglesias R, Kabo M, Hedrick M, Benhaim P, et al. Healing of critically sized femoral defects, using genetically modified mesenchymal stem cells from human adipose tissue. *Tissue engineering*. 2005;11(1-2):120-9.
111. Sterodimas A, De Faria J, Correa WE, Pitanguy I. Tissue engineering in plastic surgery: an up-to-date review of the current literature. *Annals of plastic surgery*. 2009;62(1):97-103.
112. Jiang W, Ma A, Wang T, Han K, Liu Y, Zhang Y, et al. Homing and differentiation of mesenchymal stem cells delivered intravenously to ischemic myocardium in vivo: a time-series study. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2006;453(1):43-52.
113. Kollar K, Cook MM, Atkinson K, Brooke G. Molecular mechanisms involved in mesenchymal stem cell migration to the site of acute myocardial infarction. *International journal of cell biology*. 2009;2009:904682.
114. Hu SL, Luo HS, Li JT, Xia YZ, Li L, Zhang LJ, et al. Functional recovery in acute traumatic spinal cord injury after transplantation of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Critical care medicine*. 2010;38(11):2181-9.
115. Chanda D, Kumar S, Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;111(2):249-57.

116. Shirley D, Marsh D, Jordan G, McQuaid S, Li G. Systemic recruitment of osteoblastic cells in fracture healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2005;23(5):1013-21.
117. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell proliferation*. 2004;37(1):97-110.
118. Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;331(1):31-6.
119. Montufar-Solis D, Nguyen HC, Nguyen HD, Horn WN, Cody DD, Duke PJ. Using cartilage to repair bone: an alternative approach in tissue engineering. *Annals of biomedical engineering*. 2004;32(3):504-9.
120. Marion NW, Mao JJ. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods in enzymology*. 2006;420:339-61.
121. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, et al. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of biomedical materials research*. 2000;49(3):328-37.
122. Kraus KH, Kirker-Head C. Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary surgery : VS*. 2006;35(3):232-42.
123. Meinel L, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, et al. Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects. *Bone*. 2006;39(4):922-31.
124. Rodbell M. Localization of lipoprotein lipase in fat cells of rat adipose tissue. *J Biol Chem*. 1964;239(1):753-5.
125. Hauner H, Entenmann G, Wabitsch M, Gaillard D, Ailhaud G, Negrel R, et al. Promoting effect of glucocorticoids on the differentiation of human adipocyte precursor cells cultured in a chemically defined medium. *Journal of clinical investigation*. 1989;84(5):1663.
126. Ailhaud G, Grimaldi P, Negrel R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annual review of nutrition*. 1992;12(1):207-33.
127. Lendeckel S, Jodicke A, Christophis P, Heidinger K, Wolff J, Fraser JK, et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2004;32(6):370-3.
128. Pak J. Regeneration of human bones in hip osteonecrosis and human cartilage in knee osteoarthritis with autologous adipose-tissue-derived stem cells: a case series. *Journal of medical case reports*. 2011;5:296.
129. Toplu G, Ozcelik D, Serin M, Erdem H, Topacoglu AT. Adipose Tissue-Derived Stromal Vascular Fraction Increases Osteogenesis in an Experimental Design Zygomatic Bone Defect Model. *The Journal of craniofacial surgery*. 2017.
130. Huang L, Burd A. An update review of stem cell applications in burns and wound care. *Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. 2012;45(2):229-36.
131. Detiger SE, Helder MN, Smit TH, Hoogendoorn RJ. Adverse effects of stromal vascular fraction during regenerative treatment of the intervertebral disc: observations in a goat model. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. 2015;24(9):1992-2000.
132. Soriano R, Lamblet H, Mohammadi S, Torfi H. Optimization of Roche Liberase TM Research Grade (Highly Purified Collagenase) in the Enzymatic Digestion of Human Adipose Tissue for the Isolation of Stem and Regenerative Cells. Irvine: Roche Diagnostic Cooperation. 2013.
133. Pak J. Autologous adipose tissue-derived stem cells induce persistent bone-like tissue in osteonecrotic femoral heads. *Pain physician*. 2012;15(1):75-85.
134. Pak J, Lee JH, Jeon JH, Lee SH. Complete resolution of avascular necrosis of the human femoral head treated with adipose tissue-derived stem cells and platelet-rich plasma. *The Journal of international medical research*. 2014;42(6):1353-62.

135. Tyrnenopoulou P, Karayannopoulou M, Angelopoulou S, Pyrros A, Mparous E, Koliakos G, et al. Successful management of an equine carpal chip fracture by intra-articularly injected adipose-derived stromal vascular fraction after arthroscopic removal. *Iranian journal of veterinary research*. 2016;17(1):59-61.
136. Rubin MB. The history of ozone. The Schönbein period, 1839–1868. *Bull Hist Chem*. 2001;26(1):40-56.
137. Braidy N, Izadi M, Sureda A, Jonaidi-Jafari N, Banki A, Nabavi SF, et al. Therapeutic relevance of ozone therapy in degenerative diseases: focus on diabetes and spinal pain. *Journal of cellular physiology*. 2017.
138. Dewar M. The structure of ozone. *Journal of the Chemical Society (Resumed)*. 1948:1299-305.
139. Wolff A. A medical usability of ozone. *Deut Med Wochenschr*. 1915;41:311-2.
140. Hildebrand H. Conclusions from an Ozone Therapy-Related Death. *Medizinische Welt* 1987;38(38):1228-31.
141. Babuççu O. OZON TERAPİ: MİT VE GERÇEK. *Türk Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Dergisi (Turk J Plast Surg)*. 2012;19(3):105-12.
142. Nogales CG, Ferrari PH, Kantorovich EO, Lage-Marques J. Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract*. 2008;9(4):75-84.
143. Mendiratta S, Qu Z-c, May JM. Erythrocyte ascorbate recycling: antioxidant effects in blood. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998;24(5):789-97.
144. Stone JR, Collins T. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*. 2002;9(4):231-8.
145. Dianzani MU. 4-Hydroxynonenal and cell signalling. *Free radical research*. 1998;28(6):553-60.
146. Snyder SH, Barañano DE. Heme oxygenase: a font of multiple messengers. *Neuropsychopharmacology*. 2001;25(3):294.
147. Agrillo A, Ungari C, Filiaci F, Priore P, Iannetti G. Ozone therapy in the treatment of avascular bisphosphonate-related jaw osteonecrosis. *The Journal of craniofacial surgery*. 2007;18(5):1071-5.
148. Petrucci MT, Gallucci C, Agrillo A, Mustazza MC, Fo R. Role of ozone therapy in the treatment of osteonecrosis of the jaws in multiple myeloma patients. *Haematologica*. 2007;92(9):1289-90.
149. Bocci V. *Ozone A new medical drug*: Springer; 2005.
150. Özler M, Öter Ş, Korkmaz A. Ozon Gazının Tıbbi Amaçlı Kullanılması. *TAF Preventive Medicine Bulletin*. 2009;8(1).
151. Halliwell B. Drug antioxidant effects. A basis for drug selection? *Drugs*. 1991;42(4):569-605.
152. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi*. 1997;3(4):92-5.
153. Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, et al. Oxygen radicals and human disease. *Annals of internal medicine*. 1987;107(4):526-45.
154. Pai VV, Shukla P, Kikkeri NN. Antioxidants in dermatology. *Indian dermatology online journal*. 2014;5(2):210.
155. Maslennikov OV, Kontorshchikova CN, GRIBKOVA IA. Ozone therapy in Practice. *Health Manual, Ministry Health Service of The Russian Federation The State Medical Academy Of Nizhny Novgorod, Russia*. 2008.
156. Karaoz E, Aksoy A, Ayhan S, Sariboyaci AE, Kaymaz F, Kasap M. Characterization of mesenchymal stem cells from rat bone marrow: ultrastructural properties, differentiation potential and immunophenotypic markers. *Histochemistry and cell biology*. 2009;132(5):533-46.
157. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31(13):3572-9.
158. Behfar M, Javanmardi S, Sarrafzadeh-Rezaei F. Comparative study on functional effects of allotransplantation of bone marrow stromal cells and adipose derived stromal vascular fraction on tendon repair: a biomechanical study in rabbits. *Cell journal*. 2014;16(3):263-70.

159. Delgado-Roche L, Martínez-Sánchez G, Re L. Ozone oxidative preconditioning prevents atherosclerosis development in New Zealand white rabbits. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2013;61(2):160-5.
160. Ajamieh HH, Menéndez S, Martínez-Sánchez G, Candelario-Jalil E, Re L, Giuliani A, et al. Effects of ozone oxidative preconditioning on nitric oxide generation and cellular redox balance in a rat model of hepatic ischaemia–reperfusion. *Liver International*. 2004;24(1):55-62.
161. Ajamieh HH, Berlanga J, Merino N, Sanchez GM, Carmona AM, Cepero SM, et al. Role of protein synthesis in the protection conferred by ozone-oxidative-preconditioning in hepatic ischaemia/reperfusion. *Transplant international*. 2005;18(5):604-12.
162. Candelario-Jalil E, Mohammed-Al-Dalain S, Fernandez O, Menéndez S, Pérez-Davison G, Merino N, et al. Oxidative preconditioning affords protection against carbon tetrachloride-induced glycogen depletion and oxidative stress in rats. *Journal of Applied Toxicology*. 2001;21(4):297-301.
163. Gundersen H-JG. Stereology of arbitrary particles. *Journal of microscopy*. 1986;143(1):3-45.
164. Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*. 1987;147(Pt 3):229-63.
165. Cruz-Orive LM, Weibel ER. Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *The American journal of physiology*. 1990;258(4 Pt 1):L148-56.
166. Baddeley A, Jensen EV. *Stereology for statisticians, volume 103 of monographs on statistics and applied probability*. Chapman & Hall/CRC, Boca Raton, FL. ISBN; 2005.
167. Kurban S, Mehmetoglu I. Osteoprotegerin, RANK and RANK ligand. *Turkish Journal Of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*. 2007;32(4):178-84.
168. Takayanagi H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *Journal of periodontal research*. 2005;40(4):287-93.
169. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis research & therapy*. 2007;9(1):S1.
170. Hogan B. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes & development*. 1996;10(13):1580-94.
171. Luu HH, Song WX, Luo X, Manning D, Luo J, Deng ZL, et al. Distinct roles of bone morphogenetic proteins in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research*. 2007;25(5):665-77.
172. Kanakaris N, Giannoudis P. Clinical applications of bone morphogenetic proteins: current evidence. *Journal of surgical orthopaedic advances*. 2008;17(3):133-46.
173. Razzouk S, Sarkis R. BMP-2: biological challenges to its clinical use. *The New York state dental journal*. 2012;78(5):37-9.
174. Huang Z, Ren P-G, Ma T, Smith RL, Goodman SB. Modulating osteogenesis of mesenchymal stem cells by modifying growth factor availability. *Cytokine*. 2010;51(3):305-10.
175. Noel D, Gazit D, Bouquet C, Apparailly F, Bony C, Poncelet P, et al. Short-Term BMP-2 Expression Is Sufficient for In Vivo Osteochondral Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *Stem cells*. 2004;22(1):74-85.
176. Kökden A, Türker M. Oral ve maksillofasial cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *CÜ DisHek Fak Derg* 1999, 2 (2): 134. 1999;140.
177. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC medicine*. 2011;9(1):66.
178. McKibbin B, editor *The biology of fracture healing in long bones*. J Bone Joint Surg [Br; 1978: Citeseer.
179. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma*. 1989;3(3):192-5.
180. Sándor GK, Numminen J, Wolff J, Thesleff T, Miettinen A, Tuovinen VJ, et al. Adipose stem cells used to reconstruct 13 cases with cranio-maxillofacial hard-tissue defects. *Stem cells translational medicine*. 2014;3(4):530-40.

181. Thesleff T, Lehtimäki K, Niskakangas T, Mannerström B, Miettinen S, Suuronen R, et al. Cranioplasty with adipose-derived stem cells and biomaterial: a novel method for cranial reconstruction. *Neurosurgery*. 2011;68(6):1535-40.
182. Khan SN, Tomin E, Lane JM. Clinical applications of bone graft substitutes. *Orthopedic Clinics*. 2000;31(3):389-98.
183. Acocella A, Bertolai R, Ellis E, Nissan J, Sacco R. Maxillary alveolar ridge reconstruction with monocortical fresh-frozen bone blocks: a clinical, histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(6):525-33.
184. Oppenheimer AJ, Tong L, Buchman SR. Craniofacial bone grafting: Wolff's law revisited. *Cranio-maxillofacial Trauma and Reconstruction*. 2008;1(01):049-61.
185. Bozkaya S, KI, Oygur T., Barış E. . Deproteinize kemik grefti (BiO-OSS®)'nin kemik iyileşmesi üzerine etkisinin deneysel olarak incelenmesi. *ADO Klinik Dergisi*. 2008:87-97.
186. Benlidayi ME, Tatli U, Kurkcu M, Uzel A, Oztunc H. Comparison of bovine-derived hydroxyapatite and autogenous bone for secondary alveolar bone grafting in patients with alveolar clefts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(1):e95-e102.
187. Block MS, Ducote CW, Mercante DE. Horizontal augmentation of thin maxillary ridge with bovine particulate xenograft is stable during 500 days of follow-up: preliminary results of 12 consecutive patients. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(6):1321-30.
188. Linde A, Thorén C, Dahlin C, Sandberg E. Creation of new bone by an osteopromotive membrane technique: an experimental study in rats. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1993;51(8):892-7.
189. Zellin G, Linde A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials*. 1996;17(7):695-702.
190. Schmid J, Hämmerle C, Olah A, Lang N. Membrane permeability is unnecessary for guided generation of new bone. An experimental study in the rabbit. *Clinical oral implants research*. 1994;5(3):125-30.
191. Mardas N, Kostopoulos L, Stavropoulos A, Karring T. Evaluation of a cell-permeable barrier for guided tissue regeneration combined with demineralized bone matrix. *Clinical oral implants research*. 2003;14(6):812-8.
192. Maréchal M, Luyten F, Nijs J, Postnov A, Schepers E, Steenberghe D. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clinical oral implants research*. 2005;16(6):708-14.
193. Nishimura I, Shimizu Y, Ooya K. Effects of cortical bone perforation on experimental guided bone regeneration. *Clinical oral implants research*. 2004;15(3):293-300.
194. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Critical reviews in biomedical engineering*. 2012;40(5):363-408.
195. Rubessa M, Polkoff K, Bionaz M, Monaco E, Milner DJ, Hollister SJ, et al. Use of pig as a model for mesenchymal stem cell therapies for bone regeneration. *Animal Biotechnology*. 2017:1-13.
196. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*. 2010;31(13):3572-9.
197. Murphy WL, Kohn DH, Mooney DJ. Growth of continuous bonelike mineral within porous poly (lactide-co-glycolide) scaffolds in vitro. 2000.
198. Ohgushi H, Caplan AI. Stem cell technology and bioceramics: from cell to gene engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1999;48(6):913-27.
199. Reddi AH. Morphogenesis and tissue engineering of bone and cartilage: inductive signals, stem cells, and biomimetic biomaterials. *Tissue engineering*. 2000;6(4):351-9.
200. Toquet J, Rohanizadeh R, Guicheux J, Couillaud S, Passuti N, Daculsi G, et al. Osteogenic potential in vitro of human bone marrow cells cultured on macroporous biphasic calcium phosphate ceramic. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1999;44(1):98-108.

201. Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, et al. Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 in vitro and in vivo. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2006;78(2):324-34.
202. Bauer TW. Hydroxyapatite: coating controversies. *Orthopedics*. 1995;18(9):885-8.
203. Geesink R, Hoefnagels N. Six-year results of hydroxyapatite-coated total hip replacement. *Bone & Joint Journal*. 1995;77(4):534-47.
204. Jarcho M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics. *Clinical orthopaedics and related research*. 1981;157:259-78.
205. Piattelli A, Franco M, Ferronato G, Santello M, Martinetti R, Scarano A. Resorption of composite polymer—hydroxyapatite membranes: a time-course study in rabbit. *Biomaterials*. 1997;18(8):629-33.
206. Yuan H, De Bruijn J, Li Y, Feng J, Yang Z, De Groot K, et al. Bone formation induced by calcium phosphate ceramics in soft tissue of dogs: a comparative study between porous α -TCP and β -TCP. *Journal of materials science: materials in medicine*. 2001;12(1):7-13.
207. De Groot K, Wolke J, Jansen J. Calcium phosphate coatings for medical implants. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 1998;212(2):137-47.
208. Kokubo T, Kim H-M, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003;24(13):2161-75.
209. Habibovic P, Li J, Van Der Valk CM, Meijer G, Layrolle P, Van Blitterswijk CA, et al. Biological performance of uncoated and octacalcium phosphate-coated Ti6Al4V. *Biomaterials*. 2005;26(1):23-36.
210. Ogino M, Ohuchi F, Hench LL. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 1980;14(1):55-64.
211. Murphy WL, Mooney DJ. Bioinspired growth of crystalline carbonate apatite on biodegradable polymer substrata. *Journal of the American Chemical Society*. 2002;124(9):1910-7.
212. Suárez-González D, Barnhart K, Saito E, Vanderby R, Hollister SJ, Murphy WL. Controlled nucleation of hydroxyapatite on alginate scaffolds for stem cell-based bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;95(1):222-34.
213. Ohgushi H, editor Coral derived porous framework having different chemical compositions as a scaffold for osteoblastic differentiation. *Materials Science Forum*; 1997: Trans Tech Publ.
214. Mesimäki K, Lindroos B, Törnwall J, Mauno J, Lindqvist C, Kontio R, et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2009;38(3):201-9.
215. Kern S, Eichler H, Stoeve J, Kluter H, Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-301.
216. Slynarski K, Deszczynski J, Karpinski J. Fresh bone marrow and periosteum transplantation for cartilage defects of the knee. *Transplantation proceedings*. 2006;38(1):318-9.
217. Veyrat-Masson R, Boiret-Dupré N, Rapatel C, Descamps S, Guillouard L, Guérin JJ, et al. Mesenchymal content of fresh bone marrow: a proposed quality control method for cell therapy. *British journal of haematology*. 2007;139(2):312-20.
218. Stamm C, Kleine H-D, Choi Y-H, Dunkelmann S, Lauffs J-A, Lorenzen B, et al. Intramyocardial delivery of CD133+ bone marrow cells and coronary artery bypass grafting for chronic ischemic heart disease: safety and efficacy studies. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*. 2007;133(3):717-25. e5.
219. Im GI, Shin YW, Lee KB. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis and cartilage*. 2005;13(10):845-53.
220. Stockmann P, Park J, Von Wilmowsky C, Nkenke E, Felszeghy E, Dehner J-F, et al. Guided bone regeneration in pig calvarial bone defects using autologous mesenchymal stem/progenitor cells—a comparison of different tissue sources. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(4):310-20.

221. Kokemueller H, Spalthoff S, Nolff M, Tavassol F, Essig H, Stuehmer C, et al. Prefabrication of vascularized bioartificial bone grafts in vivo for segmental mandibular reconstruction: experimental pilot study in sheep and first clinical application. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;39(4):379-87.
222. Zijderveld SA, Zerbo IR, van den Bergh J, Schulten E, Bruggenkate CMt. Maxillary sinus floor augmentation using a β 3-tricalcium phosphate (Cerasorb) alone compared to autogenous bone grafts. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2005;20(3).
223. Kim D, Monaco E, Maki A, de Lima AS, Kong HJ, Hurley WL, et al. Morphologic and transcriptomic comparison of adipose- and bone-marrow-derived porcine stem cells cultured in alginate hydrogels. *Cell and Tissue Research*. 2010;341(3):359-70.
224. Wilson SM, Goldwasser MS, Clark SG, Monaco E, Bionaz M, Hurley WL, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;70(3):e193-e203.
225. Tarte K, Gaillard J, Lataillade JJ, Fouillard L, Becker M, Mossafa H, et al. Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. *Blood*. 2010;115(8):1549-53.
226. Wakitani S, Okabe T, Horibe S, Mitsuoka T, Saito M, Koyama T, et al. Safety of autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for cartilage repair in 41 patients with 45 joints followed for up to 11 years and 5 months. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2011;5(2):146-50.
227. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, et al. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *New England Journal of Medicine*. 2001;344(5):385-6.
228. Krečić Stres H, Krković M, Koder J, Maličev E, Marolt D, Drobnić M, et al., editors. *Mesenchymal Stem Cells: a Modern Approach to Treat Long Bones Defects*. 11th Mediterranean Conference on Medical and Biomedical Engineering and Computing 2007; 2007: Springer.
229. Hibi H, Yamada Y, Ueda M, Endo Y. Alveolar cleft osteoplasty using tissue-engineered osteogenic material. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006;35(6):551-5.
230. Shayesteh YS, Khojasteh A, Soleimani M, Alikhasi M, Khoshzaban A, Ahmadbeigi N. Sinus augmentation using human mesenchymal stem cells loaded into a β -tricalcium phosphate/hydroxyapatite scaffold. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2008;106(2):203-9.
231. Meijer GJ, de Bruijn JD, Koole R, van Blitterswijk CA. Cell-based bone tissue engineering. *PLoS medicine*. 2007;4(2):e9.
232. Lee J, Sung H-M, Jang J-D, Park Y-W, Min S-K, Kim E-C. Successful reconstruction of 15-cm segmental defects by bone marrow stem cells and resected autogenous bone graft in central hemangioma. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;68(1):188-94.
233. Kaigler D, Pagni G, Park CH, Braun TM, Holman LA, Yi E, et al. Stem cell therapy for craniofacial bone regeneration: a randomized, controlled feasibility trial. *Cell transplantation*. 2013;22(5):767-77.
234. Ohgushi H, Kotobuki N, Funaoka H, Machida H, Hirose M, Tanaka Y, et al. Tissue engineered ceramic artificial joint--ex vivo osteogenic differentiation of patient mesenchymal cells on total ankle joints for treatment of osteoarthritis. *Biomaterials*. 2005;26(22):4654-61.
235. Dykstra JA, Facile T, Patrick RJ, Francis KR, Milanovich S, Weimer JM, et al. Concise Review: Fat and Furious: Harnessing the Full Potential of Adipose-Derived Stromal Vascular Fraction. *Stem Cells Translational Medicine*. 2017;6(4):1096-108.
236. Mehrkens A, Saxer F, Guven S, Hoffmann W, Muller A, Jakob M, et al. Intraoperative engineering of osteogenic grafts combining freshly harvested, human adipose-derived cells and physiological doses of bone morphogenetic protein-2. *Eur Cell Mater*. 2012;24(308):e19.
237. Pak J, Lee JH, Park KS, Park M, Kang LW, Lee SH. Current use of autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells for orthopedic applications. *Journal of biomedical science*. 2017;24(1):9.

238. Pak J, Chang J-J, Lee JH, Lee SH. Safety reporting on implantation of autologous adipose tissue-derived stem cells with platelet-rich plasma into human articular joints. *BMC Musculoskeletal Disorders*. 2013;14(1):337.
239. Freese KE, Kokai L, Edwards RP, Philips BJ, Sheikh MA, Kelley J, et al. Adipose-derived stems cells and their role in human cancer development, growth, progression, and metastasis: a systematic review. *Cancer research*. 2015;75(7):1161-8.
240. Martin-Padura I, Gregato G, Marighetti P, Mancuso P, Calleri A, Corsini C, et al. The white adipose tissue used in lipotransfer procedures is a rich reservoir of CD34+ progenitors able to promote cancer progression. *Cancer research*. 2012;72(1):325-34.
241. Detiger SE, Helder MN, Smit TH, Hoogendoorn RJ. Adverse effects of stromal vascular fraction during regenerative treatment of the intervertebral disc: observations in a goat model. *European Spine Journal*. 2015;24(9):1992-2000.
242. Michalek J, Moster R, Lukac L, Proefrock K, Petrasovic M, Rybar J, et al. WITHDRAWN: Autologous adipose tissue-derived stromal vascular fraction cells application in patients with osteoarthritis. *Cell transplantation*. 2015.
243. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *Journal of dentistry*. 2008;36(2):104-16.
244. Agrillo A, Filiaci F, Ramieri V, Riccardi E, Quarato D, Rinna C, et al. Bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw (BRONJ): 5 year experience in the treatment of 131 cases with ozone therapy. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2012;16(12):1741-7.
245. Alan H, Vardi N, Özgür C, Hüseyin A, Yolcu Ü, Dogan DO. Comparison of the effects of low-level laser therapy and ozone therapy on bone healing. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2015;26(5):e396-e400.
246. El Hadary AA, Yassin HH, Mekhemer ST, Holmes JC, Grootveld M. Evaluation of the effect of ozonated plant oils on the quality of osseointegration of dental implants under the influence of cyclosporin a: an in vivo study. *Journal of Oral Implantology*. 2011;37(2):247-57.
247. Ripamonti CI, Cislachi E, Mariani L, Maniezzo M. Efficacy and safety of medical ozone (O₃) delivered in oil suspension applications for the treatment of osteonecrosis of the jaw in patients with bone metastases treated with bisphosphonates: preliminary results of a phase I-II study. *Oral oncology*. 2011;47(3):185-90.
248. Frascino AV, Mantesso A, Correa L, Deboni MC. Aqueous-ozone irrigation of bone monocortical wounds in hyperglycemic rats. *Acta cirurgica brasileira*. 2013;28(5):327-33.
249. Kan B, Sencimen M, Bayar GR, Korkusuz P, Coskun AT, Korkmaz A, et al. Histomorphometric and microtomographic evaluation of the effects of hyperbaric oxygen and systemic ozone, used alone and in combination, on calvarial defect healing in rats. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2015;73(6):1231.e1-10.
250. Mapara M, Thomas BS, Bhat K. Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental research journal*. 2012;9(1):111.
251. Lundgren AK, Lundgren D, Hämmerle CH, Nyman S, Sennerby L. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. *Clinical oral implants research*. 2000;11(2):99-106.
252. Garimella R, Tague SE, Zhang J, Belibi F, Nahar N, Sun BH, et al. Expression and synthesis of bone morphogenetic proteins by osteoclasts: a possible path to anabolic bone remodeling. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2008;56(6):569-77.
253. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, Lopez-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss and a novel beta-TCP/DCPD granulate. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(12):922-8.

EK-1



T.C.
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
(AKUHADYEK)

Sayı: 49533702/ 128

Tarih : 30/12/2015

Konu: AKUHADYEK-528-15-Referans nolu araştırma
Doç. Dr. M. İsa KARA
Ağız, Diş Çene Cerrahisi AD.

Üniversitemiz Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'na sunmuş olduğunuz "Tavşan Kalvaryumu Modelinde Yeni Kemik Oluşumun Üzerine Stromal Vasküler Fraksiyon ile Lokal ve Sistemik Ozon Kullanımının Etkinliğinin Araştırılması" isimli araştırma projesi AKUHADYEK yönetmeliğine ve evrensel etik ilkelere uyumlu olduğuna karar verilmiş ve **onaylanmıştır**.

Görevi	Adı	İmza	Görevi	Adı	İmza
Başkan	Prof. Dr. Yahya KUYUCUOĞLU		Üye	Yrd.Doç. Dr. Murat YEŞİL	
Üye	Prof. Dr. Zülfükar Kadir SARITAŞ		Üye	Vet. Hekim Engin GÖKSEL	
Üye	Prof. Dr. Hatice ÇİÇEK		Üye	(sivil toplum kuruluş üyesi) Halil KARGA	
Üye	Doç.Dr.Saliha Handan YILDIZ (Katılmadı)		Üye	(Halk üyesi) Yunus DOLU	
Üye	Doç.Dr.Murat Sırrı AKOSMAN				

ÖZGEÇMİŞ

I. BİREYSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Emrullah Özen

Doğum yeri ve tarihi: Çorum, 06.07.1990

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

İletişim Adresi: Zübeyde hanım mah. 7448/16 No:2/14 Karşıyaka/İZMİR

Telefon: +905543283396

E-mail: emrullah.ozen@ikc.edu.tr

II. EĞİTİM BİLGİLERİ

1993-2001: 23 Nisan İlköğretim Okulu

2001-2005: Çorum Fen Lisesi

2005-2010: Erciyes Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Yabancı dil: İngilizce

III. Ünvanları

2012: Diş hekimi

IV. MESLEKİ DENEYİM

2012-2018: İzmir Kâtip Çelebi Üniversitesi Araştırma Görevlisi/Doktora Öğrencisi