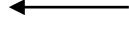


DT. İSMAIL ONDUR

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2017



Adınızı soyadınızı giriniz

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya
(sol yandaki gibi) olacak .



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

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

(DOKTORA TEZİ)

**KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI KÖK HÜCRENİN KEMİK İÇİ
DEFEKTLERİN İYİLEŞMESİNE ETKİSİ: DENEYSEL
ÇALIŞMA**

İSMAİL ONDUR

**DANIŞMAN
PROF. DR. HAKKI TANYERİ**

**AĞIZ DİŞ ÇENE CERRAHİSİ ANA BİLİM DALI
AĞIZ DİŞ ÇENE HASTALIKLARI PROGRAMI**

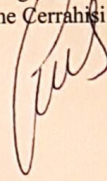
İSTANBUL-2017

TEZ ONAYI**DOKTORA TEZİ ONAYI**

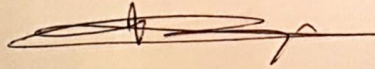
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Ağız Diş Çene Hastalıkları Programında Doktora öğrencisi Dt. İsmail Ondur tarafından Prof. Dr. Hakkı Tanyeri'nin danışmanlığında hazırlanan "Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücrenin Kemik İçi Defektlerin İyileşmesine Etkisi: Deneysel Çalışma" başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından 16/02/2017 tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı

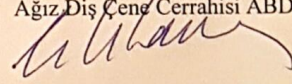
Prof. Dr. Gülsüm Ak
İstanbul Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi ABD

**Jüri-Danışman**

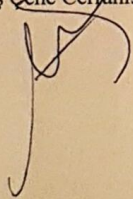
Prof. Dr. Hakkı Tanyeri
İstanbul Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi ABD

**Jüri**

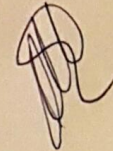
İbrahim Sina Uçkan
Medipol Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi ABD

**Jüri**

Prof. Dr. Nurgül Kömerik
Biruni Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Ağız Diş Çene Cerrahisi ABD

**Jüri**

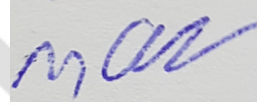
Prof. Dr. Gülümser Evlioğlu
İstanbul Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi
Protetik Diş Tedavisi ABD



BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Dt. İsmail Ondur



İTHAF

Hayatım boyunca benim arkamda duran desteklerini bir gün bile olsun benden esirgemeyen Annem Necla Ondur'a, Babam Ahmet Hulki Ondur' a, güler yüzünü benden hiç esirgemeyen Eşim Esra Ondur'a, hayatımda benim için çok değerli olan kardeşim Buğra Ondur ve oğlum Ahmet Eren Ondur'a ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bu doktora tezinin hazırlanmasında ve doktora eğitimim boyunca büyük emeği geçen sayın hocam Prof. Dr. Hakkı Tanyeri'ne, sevgili Doç. Dr. Alp Saruhanoglu'na ve Doç. Dr. Sertan Ergun'a, doktora çalışmam esnasında deney hayvanlarının çalışılmasında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Kemal Altunalmaz'a elde edilen kesitlerin histomorfolojik incelemesinde emeği geçen Doç. Dr. Vakur Olgaç ve çalışmanın her aşamasında desteklerini esirgemeyen sevgili eşim Dt. Esra Ondur'a teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26102

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLolar LİSTESİ.....	İX
ŞEKİLLER LİSTESİ	X
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XV
ABSTRACT	XVİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. KEMİK DOKUSU VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ	4
2.2. KEMİK TİPLERİ.....	6
2.2.1. Primer Kemik.....	6
2.2.2. Sekonder Kemik.....	6
2.2.2.1. Süngerimsi Kemik.....	6
2.2.2.2. Kortikal Kemik	7
2.3. KEMİK ZARLARI	7
2.3.1. Periost (Periosteum).....	7
2.3.2. Endosteum (Endost).....	8
2.4. KEMİK HÜCRELERİ	8
2.4.1. Osteoprogenitör Hücreler.....	8
2.4.2. Osteoblastlar	9
2.4.3. Osteosit	10
2.5. KEMİK YAPIMI	10
2.5.1. İntramembranöz Kemik Yapımı	10
2.5.2. Endokondral Kemik Yapımı	11
2.6. KEMİK ONARIMI.....	12

2.7. KEMİK DEFECTLERİNİN OSGMENTASYONUNDA KULLANILAN KEMİK GREFT MATERYALLERİ VE BİYOLOJİSİ.....	13
2.7.1. Uygulanan Kemik Grefti Tipleri ve Sınıflaması.....	14
2.7.1.1. Otogreftler	16
2.7.1.2. Allogreftler (Homojen Greftler).....	17
2.7.1.3. Ksenogreftler.....	18
2.7.1.4. Alloplastlar.....	19
2.8. YÖNLENDİRİLMİŞ KEMİK REJENERASYONU TEKNİĞİ	21
2.8.1. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu Tekniğinde Kullanılan Bariyer Membranlar.....	21
2.8.1.1. Rezorbe Olabilen Bariyer Membranlar.....	21
2.8.1.2. Rezorbe Olmayan Bariyer Membranlar	23
2.9. KEMİK İLİĞİNİN KEMİK OLUŞTURMA KAPASİTESİ	24
2.10. KÖK HÜCRELER.....	24
2.10.1. Embriyonik Kök Hücre.....	26
2.10.2. Yetişkin Kök Hücre	27
2.10.2.1. Hemopoetik Kök Hücreler	28
2.10.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler	28
2.10.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesinde Kullanılan Sahalar....	29
2.10.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilme Yöntemleri.....	30
2.10.2.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Özellikleri.....	32
2.10.2.2.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Başlıca Farklılaşma Protokolleri	32
2.10.2.2.4. Mezenkima Kök Hücrelerin Kullanım Alanları.....	33
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Operasyon Öncesi İşlemler	36
3.1.1. Genel Bilgi	36
3.1.2. Operasyon Öncesi Hazırlıklar	36
3.1.3. Genel Anestezi	37
3.1.4. Cerrahi Aşama:	37
3.1.5. Sakrifikasyon	44
3.1.6. Ameliyat Ekibi ve Görev Dağılımı	45
3.1.7. Histolojik Değerlendirme	45
3.1.8. İstatistiksel Değerlendirme	46

4. BULGULAR.....	47
4.1. Histolojik Bulgular	47
4.1.1. Kontrol Grubu Histolojik Bulguları.....	47
4.1.2. Bio-oss Uygulanan Defektlerin Histolojik Bulguları	50
4.1.3. Mezenkimal Kök Hücre Konsantrasyonu Uygulanan Defektlerin Histolojik Bulguları	53
4.1.4. Bio-oss ve Mezenkimal Kök Hücre Konsantrasyonun Kombine Uygulandığı Defektlerin Histolojik Bulguları	56
4.2. Histomorfometrik Bulgular.....	59
5. TARTIŞMA.....	78
KAYNAKLAR.....	88
HAM VERİLER	95
FORMLAR.....	96
ETİK KURUL KARARI	97
ÖZGEÇMİŞ.....	98

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1 Fibrozis değerlendirilmesi.....	59
Tablo 1a Grupların ikili değerlendirilme sonuçları.....	60
Tablo 1b Günlerin ikili değerlendirme sonuçları.....	61-62
Tablo 2 Kemik yapımı değerlendirilmesi.....	63
Tablo 2a Grupların ikili değerlendirilme sonuçları.....	64
Tablo 2b Günlerin ikili değerlendirme sonuçları.....	65
Tablo 3 Kemik iyileşmesi değerlendirilmesi.....	67
Tablo 3a Grupların ikili değerlendirilme sonuçları.....	67-68
Tablo 3b Günlerin ikili değerlendirme sonuçları.....	69-70
Tablo 4 Residüel greft değerlendirilmesi.....	71-72
Tablo 5 Maksilla ve mandibulaya göre fibrozis değerlendirilmesi.....	73
Tablo 6 Maksilla ve mandibulaya göre kemik yapımı değerlendirilmesi.....	74
Tablo 7 Maksilla ve mandibulaya göre kemik iyileşmesi değerlendirilmesi.....	75
Tablo 8 Totalde çenelere göre değerlendirmeler.....	76
Tablo 9 Totalde çenelere göre residüel greft değerlendirmesi.....	77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 3-1 Kemik iliğine ulaşılması ve aspirasyona başlanması	38
Resim 3-2 Gerekli aspirasyonun elde edilmesi.....	38
Resim 3-3 Elde edilen aspirasyonun kitin içine enjeksiyonu	39
Resim 3-4 SmartPrep2 cihazında santirifüj işleminin gerçekleştirilmesi.....	39
Resim 3-5 Santirifüj sonrası plazmanın mezenkimal kök hücre konsantrasyonundan uzaklaştırılması	40
Resim 3-6 Plazmanın uzaklaştırılmasından sonra kalan mezenkimal kök hücre konsantrasyonun toplanması.....	40
Resim 3-7 Elde edilen plazma ve mezenkimal kök hücre konsantrasyonun uygulamaya hazır şekilde sıringada toplanması.....	41
Resim 3-8 İnsizyonun yapılması	42
Resim 3-9 Periostun elevasyonundan sonra kemiğe ulaşılması ve fizyodispensera bağlı piyasamen 800 – 1000 devir /dak.‘da steril serum fizyolojikle soğutma altında trafen frezle 5mm genişliğinde 3,6 mm derinliğinde defekt oluşturulması	42
Resim 3-10 Oluşturulan defek bölgelerine uygun preperatların uygulanması (mezenkimal kök hücre konsantrasyonu)	43
Resim 3-11 Oluşturulan defek bölgelerine uygun preperatların uygulanması (sığırcı kaynaklı greft materyali).....	43
Resim 3-12 Hazırlanan preparatlar uygulandıktan sonra membranın yerleştirilmesi	44
Resim 3-13 Deri altı dokusu 2.0 Vicryl ile primer kapatılması.....	44
Resim 4-1 Maksilla 15. gün defekt bölgesinde genç mezenkim hücrelerinden oluşan aktif fibröz doku defect kenarında ince yeni kemik trabekülleri. (H&E ×100).....	47
Resim 4-2 Mandibula 15. gün defekt bölgesinde fibröz doku içine yeni kemik trabekülleri (H&E ×100).....	48
Resim 4-3 Maksilla 30. gün de defekt kenarlarından ilerleyen yeni kemik trabekülleri ve ortada aktif fibröz bağ dokusu (H&E ×100).....	48
Resim 4-4 Mandibula 30. gün defekt bölgesinde fibröz bağ dokusu içinde kalınca yeni kemik trabekülleri (H&E ×200).....	49
Resim 4-5 Mandibula 45. günde defekt alanı büyük ölçüde dolduran yeni kemik dokusu ve arada ince band biçiminde varlığını sürdüren fibröz doku gözlemlenmiştir. (H&E ×100).....	49

Resim 4-6 Maksilla 45. günde defekt bölgesini örten köprü biçiminde kemik yapımı ve altında fibröz bağ dokusu saptanmıştır. (H&E $\times 200$).....	50
Resim 4-7 Maksilla 15. günde Bio-oss uygulanan kemik defekt bölgesinde aktif fibröz bağ dokusu içinde rezidüel greft materyalleri (H&E $\times 200$)	50
Resim 4-8 Mandibular 15. gün Bio-oss uygulanan defekt bölgesinde fibröz doku içinde greft materyalleri çevresinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$).....	51
Resim 4-9 Maksilla 30. gün defekt bölgesinde fibröz doku içinde greft materyali çevresinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$).....	51
Resim 4-10 Mandibula 30. gün defekt bölgesinde yeni kemik trabekülleri arasında rezidüel greft materyalleri (H&E $\times 100$)	52
Resim 4-11 Maksillar 45. gün defekt bölgesini dolduran yeni kemik yapımı arasında rezidüel greft materyali (H&E $\times 100$)	52
Resim 4-12 Mandibula 45. gün defekt bölgesini dolduran trabeküler kemik dokusu arasında rezidüel greft materyali (H&E $\times 100$)	53
Resim 4-13 Mandibula mezenkimal kök hücre konsantrasyonu uygulanan defekt bölgesinde aktif fibröz doku içinde ince kemik trabekülleri (H&E $\times 100$).....	53
Resim 4-14 Maksilla 15.gün defekt bölgesinde fibröz doku içinde defekt kenarlarından ilerleyen yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 200$).....	54
Resim 4-15 Maksilla 30. Gün defekt bölgesinde fibröz doku içinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$).....	54
Resim 4-16 Mandibula 30. gün defekt bölgesinde amastomozlar yapan trabeküler yeni kemik dokusu arasında fibröz bağ dokusu (H&E $\times 100$)	55
Resim 4-17 Maksilla 45. günde defekt bölgesini büyük oranda dolduran yeni kemik dokusu arasında varlığını sürdüren ince fibröz doku (H&E $\times 200$)	55
Resim 4-18 Mandibula 45. gün defekt bölgesini büyük ölçüde kapatan kemik yapımı arasında fibröz bağ dokusu (H&E $\times 100$).....	56
Resim 4-19 Maksilla Bio-oss ve mezenkimal kök hücre konsantrasyonu kombine kullanıldığı 15. gün defect bölgesinde fibröz bağ dokusu içinde ince ve yeni kemik trabekülleri ve greft materyali (H&E $\times 200$)	56
Resim 4-20 Mandibula 15. gün defect bölgesinde fibröz bağ dokusu içinde greft materyali ve ince yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$)	57
Resim 4-21 Maksillar defect bölgesinde fibröz doku içinde greft materyali ve çevresinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$).....	57

Resim 4-22 Mandibula 30. gün defect bölgesinde defekti dolduran yeni kemik trabekülleri yeni kemik trabekülleri ile çevrelenen greft materyalleri ve arada fibröz bağ dokusu (H&E $\times 100$)	58
Resim 4-23 Maksilla 45. gün defekti dolduran yeni kemik dokusu arasında rezidüel kemik materyali (H&E $\times 100$).....	58
Resim 4-24 Mandibula 45. gün defect bölgesini dolduran kalın kemik trabekülleri arasında rezidüel greft materyali (H&E $\times 100$)	59



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

BMP	Kemik morfojenik Protein
FGF	Fibroblast büyüme faktörü
FDGF	Fibroblast türevli büyüme faktörü
TGF- β	Dönüştürücü büyüme faktörü
Col-1	Kolojen tip 1
BSP	Kemik sialoprotein
M-CSF	Granülosit koloni stimulan faktör
ALP	Alkalik fosfataz
İL	İnterlökin
PGE	Prostaglandin enzim
PDGF	Platelet türevli büyüme faktörü
PRP	Plateletten zengin plazma
DKKA	Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
DDKKA	Deminaralize Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
PTFE	Politetrafluoretilen
e-PTFE	Genişletilmiş politetrafluoretilen
CD	Yüzey farklılaşma antijeni
MKH	Mezenkimal kök hücre
DMEM-LG	Modifiye Eagle besiyeri az glikoz
DMEM-HG	Modifiye Eagle besiyeri yüksek glikoz
FCS	Fetal calf serumu
IBMX	İzobütilmetilksantin
ITS	İnsülin Transferrin Selenyum
BHA	Bütillenmiş hidroksianisol
FSK	Forskalin
VA	Valporik Asit
DMSO	Dimetil sülfosit
ACD-A	Antikoagulan sitrat dekstroz solüsyon

CE	ConformiteEuropeene - Avrupa Normlarına Uygunluk
MSH	Mezenkimal Stromal Hücre
HLA-DR	Human Leucocyte Antigen – İnsan lökosit antijeni
BMAC	Bone marrow aspirate concentrate – Kemik iliği aspirasyon konsantrasyonu



ÖZET

Ondur, İsmail. Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücrenin Kemik İçi Defektlerin İyileşmesine Etkisi: Deneysel Çalışma. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş Çene Cerrahisi ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2017.

Diş hekimliğinde biyomateryallerin kullanılmasındaki amaç uygulanan bölgede yeni kemik oluşumunu sağlamak ve desteklemektir. Yeni kemik yapımı sırasında biomateriyal uygulanan bölgeye osteoblast ve osteoklast göçü gerçekleşerek kemik büyümesi meydana gelir. Biyomateryelin rezorpsiyonu ve takibinde rezorpsiyon sahasında yeni kemik yapımı oluşmaktadır. Kemik iliği kaynaklı kök hücrenin defektlere yerleştirilmesinde ise içinde bulunan multipotent hücrelerin farklılaşmasıyla işlem sahasında osteoblast ve osteoklast hücreleri oluşur. İşlem sahasında hücre göçü beklenmeksizin daha hızlı kemik yapımı gerçekleşir. Rezorpsiyonunda gerçekleşmediği bu sahada yeni oluşan kemik matriksinin içinde rezorbe olmamış biomateriyal partikülleri bulunmaz. Bu sayede kemik iliği kaynaklı kök hücreden kaynağını alan osteoblast ve osteoklast hücrelerinin yönlendirdiği yeni kemik yapımı hastanın kendi kemik matriksine uygun şekilde gerçekleştirilmiş olunur. Bu çalışmanın amacı kemik içi defektlerin iyileşmesinde kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin etkinliğinin değerlendirilmesidir.

Toplam 6 deney hayvanı kullanılmıştır. Hayvanların alt ve üst çenenin, sağ ve sol dişsiz alanlarının herbirine ikişer adet olmak üzere alt çeneye 4 üst çeneye 4 toplam 8 tane 3.6 mm derinliğinde defekt oluşturulmuştur. Alt ve üst çene kemik kalitesi değişebileceğinden alt ve üst çeneye uygulanan greft materyalleri ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Alt ve üst çenede oluşturulan defektlerin bir tanesi kontrol gurubu olarak boş bırakılmıştır. Bir diğerine hayvanlardan kemik iliğinden elde edilen kök hücre konsantrasyonu uygulanmıştır (HarvestBMAC, Harvesttech, USA). Üçüncü defekte sığır kaynaklı greft materyali (Bio-oss, Geistlich, İsviçre) ve kemik iliği kaynaklı kök hücre karışımı uygulanmıştır. Dördüncü defekte ise standart grup olarak sığır kaynaklı greft materyali uygulanmıştır. Deney hayvanları operasyondan sonraki 15, 30 ve 45 inci günlerin sonunda ötenazi edilmiştir. Alınan örnekler histopatolojik olarak incelenmiştir.

Histopatolojik incelemenin ardından üst çene ile alt çene iyileşmesi arasında anlamlı farklılıkların gerçekleşmediği, defect bölgelerine uygulanan preparatların arasındaki farklılıklara bakıldığında ise uygulanan sığır kaynaklı greft materyali, kök hücre konsantrasyonun ve kombine kullanımlarının iyileşmeyi olumlu etkilediği fakat uygulanan bu üç preparatın ise birbirlerine anlamlı üstünlük sağlamadıkları görülmüştür.

Anahtar Kelimeler : Kök Hücre, Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu, Kemik İliği, Yeni Kemik Yapımı, Osteointegrasyon

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 26102

ABSTRACT

Ondur, İsmail. Effect of Bone Marrow Aspiration Concentrate Stem Cell Therapy in Osseous Defect Healing: Experimental Research. İstanbul University, Institute of Health Science, Oral and Maxillofacial Surgery. Ph. D Thesis. İstanbul. 2017.

In dental practice the aim of using biomaterials is to ensure the region and promote new bone formation. During new bone formation osteoblast and osteoclast cells migration occurs to the site biomaterial applied for bone regeneration. First biomaterial resorption occurs and then on the resorption site the new bone formation takes place. When bone marrow derived stem cells placed to the bone defects multipotent cells differentiate to the osteoblast and osteoclast cells therefore there is no need for cell migration and there is faster bone regeneration. Because resorption of biomaterials does not take place, there will not be any unneeded not resorb biomaterial particles on the new bone formation site. Thus, new bone formed by the osteoblast and osteoclast cells derived from bone marrow multipotent stem cells, is much proper and similar to the original bone of the patient. The aim of this study is to evaluate the efficiency of the bone marrow-derived multipotent stem cells on the new bone regeneration.

Six sheep used for this experiment. There are two, 3.6 mm depth, defects on the each edentulous sides of the mandibular and maxillary jaw of the sheep. Because of the differentiation on the bone quality of maxilla and mandible the defects of maxilla and mandible evaluated separately. One of the defects on the upper and lower jaw of the animals left empty as the control group of the experiment. The other defect filled with multipotent stem cell derived from bone marrow (HarvestBMAC, Harvesttech, USA). Third defect filled with mixture of bovine graft material (Bio-oss, Geistlich, Switzerland) and bone marrow-derived multipotent stem cell. And the final defect filled with just bovine graft material as a standard group of the experiment. The animals euthanize on the 15, 30 and 45 days and the samples analyze histopathologically.

Acording to Histopathological findings there is no significant difference between the healings at the defects located on the maxillary and the mandibular jaw. However the findings show that bovine bone graft, bone marrow aspiration concentrate and the mixture of these two improve the bone healing significantly which none of the three show a superiority to each other.

Key Words: Stem Cell, Guided Bone Regeneration, Bone Marrow, New Bone Formation, Osteointegration

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No.26102

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde özellikle dental implant uygulamalarının sayısının ve talebinin giderek artması sonucu dental implant uygulanabilecek kemik yetersizliklerinin üstesinden gelinebilme ihtiyacı artmıştır. Bu ihtiyacı karşılayabilmek için yönlendirilmiş doku rejenerasyonu yöntemi ile çeşitli greft ve membran materyalleri kullanılarak ihtiyaç duyulan kemik oluşumu elde edilmeye çalışılmaktadır. Özellikle üst çenede sinüs lifting, distraksiyon osteogenezisi, split osteotomileri gibi çeşitli major cerrahi işlemlerle de yetersiz kemik varlığının önüne geçilmeye çalışılmaktadır. Fakat bu gibi major cerrahi girişimler ne kadar da ön görülebilir olsa da hastanın işlem bölgesinde ikinci bir cerrahi saha gereksinimi oluşturmaktadır. Aynı seansta implantın yerleştirilememesi halinde ise hasta için ekstradan bir iyileşme zamanı gereksinimi olması gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Bu zaman kaybının ve major cerrahi girişimi gerektiren işlemlerin üstesinden gelebilmek için uzun zamandır çeşitli araştırmacılar yetersiz kemik bulunan bölgelerde yeni kemik oluşumunu provoke edebilecek nitelikte olan ve daha invazif girişimler ile uygulanabilecek greftler ve biyomateryaller üzerinde çalışmaktadırlar. Sorunsuz ve hızlı iyileşme sağlanabilmesi için iyileşmeyi olumlu etkileyebilecek materyaller yalın ve kombine olarak cerrahi işlemlerde kullanım alanı bulmaktadır.

Ogmentasyon işlemlerinde otojen, allojen ve alloplastik kemik greftleri kullanılmaktadır. Bu materyallerin kendilerine özgü avantaj ve dezavantajları vardır. Otojen greftler yüksek biyouyumluluğa sahiptir. Uygulama ve iyileşme sırasında greft materyalinin hücrel yapısının ve moleküler bileşenlerinin bir kısmı varlığını korumaktadır. İmmünolojik reaksiyona yol açmazlarken allojen greftler ve heterojen greftler antijenite oluşturabilir. Otojen greftlerin iki farklı bölgede operasyon sahası oluşturmaları operasyon süresini uzatmakta ve morbiditeyi arttırmaktadır. Ksenogreftler hayvansal kaynaklı donörlerden elde edilen ve çeşitli işlemlerle deproteinize edilerek organik kısmı uzaklaştırılmış greft materyalleridir. Ksenogreftlerin kullanıldığı deneysel hayvan çalışmalarında materyalin ideal bir yapı iskeletine sahip olduğu bildirilmektedir. Ksenogreftlerin iyileşme mekanizmaları incelendiğinde alıcı sahadaki kemikteki osteojenik hücrelerin rehberliğinde kemik büyümesi başladığı gözlenmektedir. Yüksek

biyoyumluluğa sahip olduğu ve tüm bu avantajlarından dolayı sıklıkla tercih edilmektedir.

Onarımın sağlanmasında, defektin durumu dışında hastanın ekonomik şartları da önemli etkindir. Greft materyallerinin maliyetlerinin yüksek olması nedeniyle araştırmacılar farklı çalışmalara yönelmişlerdir. Ogmentasyon işlemlerinde hastalar açısından bir diğer dezavantajda cerrahi sonrası 3 ila 8 ay süresinde defektin hacmine ve hastaya bağlı faktörlere göre değişen bekleme sürecidir.

Bu amaçla araştırmacılar cerrahi sonrası iyileşme süresini kısaltabilecek, oluşan kemik kalitesini arttıracak, maliyeti diğer greft materyallerine göre daha düşük olan yeni biyomateryaller arayışına girmişlerdir.

1800 lü yılların başında alman bilim adamı Carl Rudolph Virchow tüm hücreler başka hücrelerden gelişir öngörüsünde bulunmuştur. Günümüzde ise canlılarda kendilerini yenileme ve farklılaşma kabiliyeti bulunan hücreler bulunduğu kesinleşmiş ve bu hücreler kök hücreler olarak nitelendirilmiştir. Bu kök hücrelerin özel bir çeşidi olan mezenkimal kök hücreler çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent stromal hücrelerdir. Bu özelliğinden dolayı bu hücreler rejeneratif tıp için umut verici bir hücre kaynağıdır. Mezenkimal kök hücreler veya kemik iliği stromal kök hücreleri olarak adlandırılan bu öncül multipotent hücreler kırıldak, kemik, kas, tendon, bağ ve yağ hücrelerine farklılaşabilmektedir. Hücrelerin kolay izolasyonu ve kültürünün kolay olması bu hücreleri tedavi edici bir araç haline getirmektedir.

Mezenkimal kök hücrelerin kemik hücrelerine farklılaşabilmeleri göz önünde tutulduğunda yeni kemik oluşumu gerekli sahalarda yeni kemik yapımını provoke etmesi olasıdır. Hastanın kendinden elde edilmesi nedeni ile olası bir yabancı cisim reaksiyonuna neden olmamaktadır. Allojen ve alloplastik kemik greftleri ile kombine kullanımlarında ise osteokondüktif özellikleri bulunan bu biyomateryallere osteoindüktif özellikler kazandırmasında mümkündür. Yani yeni kemik yapımı gereken bölgede kemikleşmenin gerçekleşmesi için gereken kemik hücrelerinin etraftaki sağlıklı dokulardan göç etmesi beklenmeden direk uygulanan kemik greftinde kemikleşme başlanması gerçekleşebilmektedir. Mezenkimal kök hücre konsantrasyonu bu iyileşmesinin gerçekleşmesinde birincil faktördür. Elde edilen kemik iliği preparatlarının kültür ortamında çoğaltılması ile gerekli konsantrasyon elde edilebileceği gibi direk operasyon sırasında daha fazla miktarda alınan kemik iliğinin

özel cihazlarda santrüfj işleminden geçirilerekte gerekli konsantrasyon elde edilebilmektedir.

Mezenkimal kök hücre uygulaması teorikte çok şey vaat etmesine karşın yeterli kontrollü çalışma olmaması nedeni ile hala sonuçlar konusunda şüphe uyandırmaktadır. Literatürde konuyla ilgili deneysel çalışmaların eksikliği dikkati çekmektedir.

Bu çalışmanın amacı, kemik defektlerinin tedavisinde klinikte sıklıkla uygulanan sığır kaynaklı kemik greft materyali ile kültür edilmesine gerek kalmadan operasyon esnasında özel cihazlar ile hazırlanabilen mezenkimal kök hücre konsantrasyonun kombinasyonun defektlerin iyileşmesine olan etkisinin deneysel olarak hazırlanan modellerde histolojik ve histomorfometrik olarak değerlendirilmesidir.



2. GENEL BİLGİLER

Dental enfeksiyonlar, travmaya bağlı kemik kayıpları, kistik oluşumlar, dental implant komplikasyonu sonucu oluşabilecek marjinal kemik rezorpsiyonları, çeşitli rezeksiyon nedenleri gibi etkenlerden dolayı oluşabilecek farklı boyutlardaki kemik kayıplarının yerine konulabilmesi ve rezorbe kretlerin vertikal veya horizontal yönde genişletilebilmesi için bugüne kadar altın ve gümüş gibi metaller, ksenogreft, otogenic greft, allogreft ve alloplastik greft materyalleri uygulanmıştır.¹⁰⁸ Dokuların yerine koyulmasının amacı; kaybedilen vücut parçalarını hem form, hem fonksiyon, hem de estetik bakımından eski hallerine mümkün olduğunca en yakın olacak biçimde yeniden yaratmak ya da biçimlendirmektir.⁵⁵

Günümüzde de büyük kemik defektlerinin kapatılması ortopedik, rekonstrüktif ve çene yüz cerrahisinin en büyük sorunlarından biridir. Çene yüz bölgesinde oluşan kemik yetersizliklerinin rekonstrüksiyonlarında, otojen kemik greftlerinin, alloplastik ve allojenik materyallerin kullanılması, distraksiyon osteogenezisi ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu gibi birçok tedavi alternatifi mevcuttur. Bölgedeki kemiklerin yükseklik ve genişliklerinin artırılması amacıyla son zamanlarda çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Çağımızın popüler konularından biri de kök hücrelerdir. Kemik ogmentasyonunda yeni kemik oluşturabilmek için kemik hücrelerine farklılaşabilen kök hücrelerin kullanılması ile başarılı sonuçlar alınabilmektedir. Kemik ogmentasyonu yöntemlerinin daha iyi anlaşılabilmesi için kemiğin anatomik ve fizyolojik özelliklerinin bilinmesi önemlidir.

2.1. KEMİK DOKUSU VE BİYOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ

Kemik dokusu; sert ve stabil bir çerçeve içerisine entegre olmuş, metabolik olarak aktif hücrelerden oluşan, tüm dayanıklılığı ve sertliğine rağmen bireyin hayatı boyunca yıkılıp yeniden biçimlendirilen (remodeling), dinamik, canlı bir dokudur. Başlıca görevi olan vücuda destek ve koruma sağlamanın yanında, kalsiyum metabolizmasında da

etkin olarak rol oynamaktadır. Ayrıca kas ve tendonların yapışma yeri olan kemikler, iskelet kaslarına sağladıkları destek sayesinde vücut hareketlerine de yardımcı olurlar.
56,41

Kemik; organik ve inorganik elemanlardan oluşur. Ağırlığının yaklaşık % 20'si sudur. Kuru kemik ağırlığının %60-70'i inorganik kalsiyum fosfat, %30-35'i ise organik fibröz protein ve kollajenden oluşur.

Osteoid; osteoblastlar tarafından salgılanan mineralize olmamış organik matrikstir. %90'ı tip I kollajen; %10'u ise nonkonsellöz proteinler, glikoproteinler, proteoglikanlar, peptitler, karbohidratlar ve lipidlerden oluşur. Osteoid mineralizasyonu (inorganik mineral tuzlar tarafından oluşturulur) kemiğin gücünü ve sertliğini sağlar.

İnorganik yapısı son derece karmaşık bir kollajen protein lif ağından ve bu ağa çökelmiş durumda bulunan kalsiyum fosfat (%85), kalsiyum karbonat (%10), kalsiyum florid ve magnezyum florid (%5) gibi mineral tuzlardan oluşur. Kemikteki mineraller genellikle Hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) formundadır. Mineral kristaller hidroksiapatiti meydana getirir. Hidroksi Apatit kristallerinin kollajen liflerle olan birleşmeleri kemiğe özgün sertlik ve dayanıklılığını kazandırır.^{113,78}

Kemik matriksi içerisinde gömülü bulunan bazı proteinler bulunmaktadır. Bu proteinler kemik iyileşmesi üzerine etki etmektedirler. Bu proteinler, mezankimal kaynaklı hücrelerin (örn. Monosit, fibroblast) kemik hücreleri içine migrasyonuna, proliferasyonlarına ve diferansiasyonlarına katkıda bulunurlar. BMP (bone morphogenetic protein)'ler, "insülin-like growth factor", "transforming growth factor", "platelet derived-growth factor" ve "fibroblast growth factor" kemik iyileşmesini hızlandırır. Bu proteinlerden en iyi tanınan BMP'dir. Kemik matriks kaynaklı glikoprotein ailesinden biridir. Mezenkimal hücrelerden kemik hücrelere diferansiasyonu indükler. Vücutta az miktarda bulunmaktadır.

Kemik matriks, 3-7 mikron kalınlığında kemik lameli denilen tabakalar halindedir. Bu lamellerde, laküna adı verilen, tek sıra halinde dizili küçük boşluklar bulunur. Asıl kemik hücreleri olan osteositler, bu lakünaların içine yerleşmiştir. Kemik dokudaki bu lakünalardan her yere uzanan silindirik küçük kanalcıklar (kanaliküller) çıkar. Bu kanalcıklar birbirleriyle birleşerek, 4 matriks içinde ağsı yapıdaki boşluk sistemini oluşturur. Kanaliküler sistem; ara maddesi kalsifiye olan ve doku matriksi difüzyon özelliği göstermeyen kemik dokusunun beslenmesinde rol oynar.³⁹

Kemik içerisinde ayrıca; kemik metabolizmasından sorumlu canlı hücreler ile bu hücrelere yaşamsal desteği sağlayan son derece zengin vasküler ve nöral ağlar bulunmaktadır. Kan akımının 200-400 ml/dk'ya kadar ulaşabildiği bu yapılar sayesinde, her zaman yeterli miktarda protein ve mineral kemik dokusuna ulaşabilmekte ve kemiğin yapısal bütünlüğü korunabilmektedir.^{113,41,78}

Makroskobik olarak kemiğe bakıldığında, substansiya kompakta (kompakt kemik) ve substansiya spongiyoza (spongiyöz kemik) olarak isimlendirilen iki farklı kısım ayırt edilir. Bu her iki kısımda da, yukarıda bahsedilen kanaliküler sistem farklılık gösterir.

2.2. KEMİK TİPLERİ

2.2.1. Primer Kemik

Nonlameller, Woven, Reticulated, Örgü kemik olarakta adlandırılabilen kemik tipidir. Embriyolojik gelişimde, fraktür iyileşmesinin kallüs formasyonu safhasında, veya hiperparatiroidizm ve Paget hastalığı gibi bazı patolojik durumlarda izlenebilir. Primer kemik dokusu intrauterin hayatta şekillenir. Gelişi güzel yerleşmiş kollajen demetleri ve osteoblastların kapladığı düzensiz şekilli vasküler boşluklardan oluşur. Mineral komponenti sekonder kemikten azdır. Temel madde yeterince kalsifiye olmamıştır. Doku hücrelerinden oldukça zengindir. Kemik iyileşmesi sürecinde, Faz-I kemik olarak da adlandırılan örgü kemik, normalde yeniden şekillenir ve yerini Faz-II kemik olarak da bilinen olgunlaşmış sekonder kemik tipi olan, kompakt ya da süngerimsi kemiğe bırakır.^{56,41}

2.2.2. Sekonder Kemik

2.2.2.1. Süngerimsi Kemik

Olgunlaşmış kemik tiplerinden olan süngerimsi kansellöz veya spongiyöz kemik olarakta bilinen kemik tipi kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ve yassı kemiklerin iç yüzlerinde bulunur. Kemik trabekülleri ile içlerinde hematopoetik elemanların bulunduğu petek biçimli boşlukların meydana getirdiği bir ağdan ibarettir. Trabeküllerin aralarında kemik iliği ile dolu, düzensiz şekilli boşluklar vardır. Bunlar kemik iliğinde bol olarak bulunan kan damarlarından, sitoplazma uzantıları aracılığıyla besin maddelerini alırlar. Kemiğin yapısal desteğini sağlamak üzere kemik trabekülleri

genellikle dış kuvvetlere dik gelecek şekilde yerleşim gösterirler. Süngerimsi kemik, endosteal yüzeylerde sürekli bir yeniden biçimlendirme işlemine maruz kalır.^{56,41}

2.2.2.2. Kortikal Kemik

Kompakt veya lameller kemik olarak isimlendirilir Kompakt kemiklerde lameller, özel (havers sistem lamelleri), ara (interstisyel sistem lamelleri), iç ve dış sirkumferansiyel lameller olmak üzere üç farklı dizilim gösterir. Embriyolojik kemiğin periosteal ve endosteal yüzeylerini saran vasküler kanallar vasıtasıyla örgü kemikten farklılaşarak gelişir.

Özel lameller, ortasında havers kanallarını bulunduran düzensiz silindirik biçimli birimlerdir ve bu lamellerle havers kanalından oluşan bütünlüğe “osteon” adı verilir. Kompakt kemikte, dokunun çoğunluğunu bu osteonlar oluştururken, osteonlar arasında kalan alanlarda da değişik yönlerde seyreden ara lameller bulunur. Volkmann kanalları adı verilen yatay yerleşimli kanallar ise komşu osteonları birbirine bağlar. Kompakt kemiklerin iç ve dış yüzleri ise, sirkumferansiyel lameller ile çevrelenmiştir.

Dış sirkumferansiyel lameller, iç sirkumferansiyel lamellerden daha kalındır. Düz kemiklerin iç ve dış yüzeyleri ile uzun kemiklerin dış yüzeylerini oluştururlar. Kortikal kemiğin mekanik gücü osteonların sıkı yerleşimine bağlıdır.

Kemiğin dış ve iç yüzleri bir zarla örtülmüştür. Bunlardan dış yüzde bulunan periosteum (periost), iç yüzde bulunan ise endosteum (endost) olarak isimlendirilir. Periosttaki damarlar, birbirlerine de bağlanan volkman kanalları ile havers kanallarına ulaştığında, havers kanallarını periosta bağlarlar. Damarların dağılımı sırasında, damarların çapı giderek küçüldüğünden, havers kanalları içinde kapiller tipte kan damarı bulunur.^{11,41,56,111}

2.3. KEMİK ZARLARI

2.3.1. Periost (Periosteum)

Periost bütün kemiklerin, uzun kemiklerin eklem bölgeleri hariç dış kısmında bulunan membrandır. Periost yoğun düzensiz bağ dokusundan oluşmaktadır. Periost dış fibröz katman ve iç osteojenik (kambiyum) katman olmak üzere iki katmandan oluşur.

Fibröz katman fibroblastlardan oluşurken kambiyum tabakası osteoblast oluşumunu sağlayan progenitör hücrelerden oluşur. Bu osteoblastlar uzun kemiklerin kalınlığının artırılmasından ve diğer kemiklerin bütün gelişiminden sorumludur. Bir kemik kırık olduktan sonra progenitör hücreler kemik iyileşme süreci için gerekli olan osteoblastlara ve kondroblastlara dönüşürler.

Kemik dokusunun aksine, periost nosiseptif sinir sonlanmalarına sahiptir ve manipülasyona karşı periostu çok hasas yapmaktadırlar. Ayrıca periost içinde bulundurduğu kan akımı ile beslenmeyi sağlamaktadır. Periost kemiğe, sharpey lifleri adı verilen güçlü kollajen lifler ile bağlanmıştır. Bu bağlar kas ve tendonlar için bağlantı sağlamaktadır.⁸⁴

2.3.2. Endosteum (Endost)

Endosteum ince bir katman bağ dokusunda oluşan, uzun kemiklerin medular kavitesini oluşturan kemik dokusunun yüzeyinde bulunmaktadır. Bu endostal yüzey uzun süreli malnutrasyon sonucunda rezorbsiyona uğramakta ve daha az kortikal kalınlıkla sonuçlanmaktadır.

Kemik büyümesi sırasında, yukarıda bahsedildiği gibi gerekli olan osteoblast hücreleri periost tarafından üretilirken, kemiği gereksiz kalın ve kontrolsüz büyümesini engellemek için osteoklast hücreleri ise kemiği endost tarafından rezorbe eder.⁸⁴

2.4. KEMİK HÜCRELERİ

2.4.1. Osteoprogenitör Hücreler

Kemiğin rezorbe olmayan bütün alanlarında bulunurlar. Osteoprogenitör hücreler kemik iliği, periostun derin katmanlarında, internal meduller bölgelerdeki endosteum yüzeylerinde, Haver ve Volkmann kanallarının örtüsünde ve gelişmekte olan kemiklerin metafizindeki kıkırdakların matriksin trabeküllerinde saptanabilmektedir.

Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşabilme özelliğine sahip hücrelerdir. Bu farklılaşma büyüme faktörleri özellikle de Bone Morfogenic Protein(BMP, kemik morfojenik protein) yönlendirilmektedir. Buna ek olarak Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Platelet-derived Büyüme Faktörü (PDGF) ve

Transforming Büyüme Faktörü de (TGF- β) osteoprogenitör hücre bölünmesini olumlu yönde etkileyebilmekte ve dolaylı olarak osteogenezisi artırmaktadır.^{1,68}

Kemigin normal büyümesi sırasında aktif olan bu hücreler erişkinlerde inaktif durumdadır. Ancak kemik yaralanması gibi durumlarda aktive edilerek mitozla çoğalırlar ve çoğalan bu hücrelerin bir bölümü kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşür. Kemik yapımı (Osteogenez) durduğunda da osteoblastlar osteoprogenitör hücrelere dönüşebilirler.^{90,43}

Osteoprogenitör hücreler bir kez osteoblasta dönüşmeye başladığında, Osterix, Col1, BSP, M-CSF, ALP, osteokalsin, osteopontin ve osteonektin gibi genetik markerlar üretmektedir.^{97,110}

2.4.2. Osteoblastlar

Kemik yapımından sorumlu olan tek çekirdekli hücrelerdir. Özünde osteoblastlar, fibroblastik üretimin yanın da kemik sialoproteini ve osteokalsin üreten özelleşmiş fibroblastlardır. Bu hücreler osteoprogenitör hücrelerden kaynağını almaktadır. Bazı osteoblastlar da periostal ya da endostal yüzeylerde lining cells (astar hücreleri) olarak kalırlar. Osteoblastlar bölünmezler.¹⁰²

Osteoblastlar kemiğe güç ve dayanıklılığını sağlayan osteoit matriks üretmekte ve bu matriks genel olarak tip I kolojenden oluşmaktadır. Yani osteoblastlar kemik matriksinin organik kısmını salgırlar. Osteoblastlar ayrıca ürettikleri bu matriksin mineralizasyonundan da sorumludur. Osteoblastlar, salgıladıkları bu osteoit doku içinde gömülü kalırlar. Yeni aktif kemik oluşumu durduğunda osteoblastların aktiviteleri önce yavaşlar, sonra durur. Fosfataz tepkimesi hızlı biçimde düşen hücreler sonunda osteosit haline geçerler. Sentez durumunda olup olmamalarına göre morfolojik görünimleri değişir. Prizmatik, kübik ya da basık şekilli olabilirler.^{109,35,54}

Osteoblastların sitoplazmaları alkali fosfatazdan zengindir. Bu da temel maddede kalsiyum depolanmasını (kalsiyumfosfat halinde) osteoblastların ayarladığını gösterir. Osteoblast sayısı yaş, osteoproz ve kemik yapım ve rezorbsiyon dengesine bağlı olarak azalabilmektedir.¹¹

2.4.3. Osteosit

Kalsiyum tuzlarının birikmesiyle sertleşen kemik matriksi içerisinde hapis olmuş osteoblastlara osteosit denir. Osteositler çoğunlukla olgun kemiğin içinde bulunan yıldız şeklinde hücrelerdir. Bu hücreler organizma yaşadığı müddetce yaşamlarını sürdürebilirler. Osteositler bölünmezler ve osteoprogenitör hücrelerden kaynağını alırlar. Bazıları aktif osteoblastlara dönüşebilirler. Lakün adı verilen boşluklar içinde bulunurlar ve diğer osteositler ve kan damarları ile kanalikuli adı verilen uzun sitoplazmik uzantılar aracılığı ile bağlantı halindedirler. Bu durum, kemiğin kalsifiye olmuş matriksi içerisinde gömülü kalmış olan bu hücrelerin kan yoluyla gelen hormonlarla nasıl uyarılabildiğini ve bunlara hücrelerin nasıl yanıt verdiğini açıklamaktadır.

Osteositler hücresel aktiviteleri azalmış ve bölünemeyen hücreler olmasına rağmen mekanosensör mekanizması ile kemik matriksi döngüsünde aktif rol oynamaktadır. Osteositik osteolizis adı verilen hızlı ve geçici (osteoklastlara göre) bir mekanizma ile kemik yıkımını gerçekleştirmektedirler. Bu hücreler, hücre dışı kalsiyum ve fosfor seviyelerinin kontrolüne katkıda bulundukları gibi; hücreler arası etkileşim sayesinde lokal uyarılara yanıt olarak gelişen adaptif yeniden şekillendirme (remodeling) olayında da rol oynarlar.^{112,56,109,35}

2.5. KEMİK YAPIMI

Kemik embriyonik gelişimde iki değişik yol izliyerek yapılır.

2.5.1. İntramembranöz Kemik Yapımı

Mezenkimal doku yoğunlaşması ve perikondriyumdaki mezenkim hücrelerinin faaliyeti ile oluşan kemik yapımıdır. Bu yapım mekanizmasında mezenkim hücreleri osteoprogenitör hücrelere, onlarda osteoblastlara ve osteositlere dönüşerek kemik matriksini oluştururlar. Enkondral kemikleşmenin aksine, intramembranöz kemikleşmede kıkırdak oluşumu bulunmamaktadır. İntramembranöz kemikleşme kısa kemiklerin büyümesini ve uzun kemiklerin kalınlaşmasını sağlamakta ve kemik kırıklarının doğal iyileşmesinde rol oynamaktadır. Çoğu yassı kemik bu yolla iyileşir.

Processus coronoideus ve semfiz haricindeki mandibula bölgelerinde, kafatası kemiklerinde, sternum, pelvis, yüz kemiklerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında bu tip kemik yapımı görülür.

Periost ve kemik arasında oluşturdukları trabeküler kemik yapıları primer kemikleşme merkezi olarak adlandırılır. Bu merkezlerde mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşarak kemik matriksini oluştururlar. Paralel olmayan kollajenlerden oluşan trabeküller de, osteoblastlar matriks içine hapis olurlar ve osteosit'e dönüşürler. Trabeküller kemik yapımı ilerledikçe iç bağlantı güçlenir ve woven kemik oluşur. Oluşan bir çok kemikleşme merkezi birleşerek çeşitli kemik yapılarını oluştururlar.^{69,18,84}

2.5.2. Endokondral Kemik Yapımı

Memelilerin iskelet sistemin gelişimi esnasında sorumlu olan iki kemikleşme prosedüründen diğeridir. Endokondral kemikleşmenin gerçekleşmesi için kıkırdak yapının varlığı şarttır. Endokondral kemikleşme uzun kemiklerin uzaması için gerekli olan kemik yapımından ve kemik kırıklarının doğal iyileşmesinden sorumludur.

Kıkırdak model kondrositlerin devamlı hücre bölünümü ve ekstraselüler matriks salınımına eşlik ederek uzunlamasına büyür. Bu büyüme intersitisyel (dokular arasında) büyüme denir. Kıkırdak yapımının kalınlaşması ise periferel kıkırdak yüzeylerindeki, kaynağını perikondriumdan alan kondroblastların ekstraselüler matriks salgılaması ile oluşur. Bu kıkırdak yapı daha sonrasında kemik çatı için bir model meydana getirir ve rezorbisyonunu takiben yeni kemik oluşumu gerçekleşir.

Kemikleşme ilk olarak diyafizin ortasında primer kemikleşme merkezinde başlar. Perikondrium periosta dönüşmeye başlar ve periost değişimini geçirmemiş ve ileride osteoblastlara dönüşecek olan osteoprogenitör hücreleri bulundurur. Osteoblastlar kıkırdak model üzerine osteoid salgırlar ve bu yeni kemik yapımı için destek sağlar. Primer kemikleşme merkezindeki kondrositler büyümeye başlar ve hipertrofiye uğrar. Bu hücreler kolojen ve diğer proteoglikanların salgılamayı durdururlar. Mineral depolanması için gerekli olan alkalen fosfataz enzimini salgırlar. Matriksin kalsifikasyonu gerçekleşir. Osteoprogenitör hücreler periostal aralıktan girerler kalsifiye olmuş matriksi bir çatı olarak kullanarak osteoid doku salınımını

oluşturur. Osteoklastlar süngerimsi kemiği yok ederek medular boşluğu yani kemik iliği için gerekli olan alanı oluşturur.

Uzun kemiklerin uç kısımlarında (epifizde) ise ikincil (sekonder) bir kemikleşme merkezi oluşmaktadır. Bu bölgedeki kemik oluşumu ile primer kemikleşme merkezindeki kemik yapım mekanizması benzerlik göstermektedir. Primer ve sekonder kemik yapım merkezleri arasında kalan kıkırdak epifiziyal plak olarak adlandırılır ve kemik ile yer değişecek olan yeni kıkırdak yapımına devam eder. Bu değişimin sonucunda kemiğin boy olarak uzaması gerçekleşmiş olur. Yeterli miktarda epifiz oluşumu sonrası eklem yüzeyi dışındaki bölgeler kemikleşir. Eklem yüzeyleri kıkırdak özelliğini yaşam boyu korur.^{69,19,17}

2.6. KEMİK ONARIMI

Kemik onarımı 3 evrede gerçekleşen bir süreçtir.

Birinci evrede hematoma oluşumu ve inflamatuvar yanıt gerçekleşir. Oluşan kırık yada defekt bölgesinde damarsal yaralanma ile hematoma oluşur. Makrofajların ve trombositlerin bölgeye göçü gerçekleşir. Sitokin salınımı başlar (PDGF, TGF- β , IL1-IL6, PGE2). Bu faktörler kemik iliği, periost ve kıkırdak hematomaunda bulunan hücreleri uyararak iyileşmenin başlamasını sağlar. Mezenkimal hücre proliferasyonu oluşur. Mezenkimal hücreler ve fibroblastlar hematomaun yerini alır. Hematomun olgunlaşması ile yeni kan damarı ağı kallusun içine büyür. Osteoprogenitör hücreler ve büyüme faktörleri de bu damar ile ortama ulaşır.

İkinci evrede kallus oluşumu gerçekleşerek tamir dönemine geçilir. Hematomda kollojen matriks oluşur. Mezenkimal hücreler kondrositlere dönüşür, primer kallus oluşur (kartilaginöz, yumuşak, köprüleşen kallus). Bu yapı içinde düzensiz olarak yeni kemik ve kıkırdak yapı gözlenmektedir. Bu hipertrofik kıkırdak yapı terminal kondrosit farklılaşması, kondrositlerin kalsifikasyonu, kondrositlerin apoptozu, angiogenesis ve osteogenesis aşamalarından geçerek yeni olgunlaşmamış kemiği (sekonder kemik, sert kallusu) oluşturur.

Üçüncü evrede ise remodeling işlemidir. Ortaya çıkan sekonder kemik yeniden şekillenerek olgun lamellar kemik haline gelir. Medullar boşluk tekrar ortaya çıkar. Bu

dönemde kemik maruz kaldığı streslere bağlı (wolf kanunu) olarak fonksiyonel gereksinimlerini karşılayacak şekilde düzenlenir.^{76,5}

2.7. KEMİK DEFEKTLERİNİN OGMENTASYONUNDA KULLANILAN KEMİK GREFT MATERYALLERİ VE BİYOLOJİSİ

Greft materyallerinin kullanım amacı, alıcı doku ve organların defektlerinin rekonstrüksiyonunda defekt bölgesinde yer tutucu özellik sağlaması ile birlikte operasyon sahasında yeni doku yapımını uyarıcı özellik göstermesi ve iyileşme için yanıt oluşturabilmesidir.

Kemik onarımında sırası ile hematom oluşumu ve inflamatuvar cevap, kallus oluşumu ve remodeling işlemleri gerçekleşmektedir. Yani bir kemik defektinin iyileşebilmesi için defekt bölgesinde hücrelerin göç edip yerleşebileceği ve yeni kemik yapımının oluşabileceği bir matriks oluşması gerekmektedir. Operasyon esnasında uygulanan kemik grefti materyalleri ile bu matriks elde edilmeye çalışılıp, bu matriks çerçevesinde oluşacak yeni kemik yapımı yönlendirilmeye çalışılmaktadır. Ayrıca kemik greftinin tipine ve özelliklerine bağlı olarak yeni kemik yapımını uyarıcı özelliklerinden faydalanılmak amaçlanmaktadır. Kemik greftlerinin biyolojisini ve çalışma prensiplerinin anlaşılabilmesi için bazı kavramların açıklanması gerekmektedir.^{81,9,38}

Bunlar;

Osteointegrasyon: Greft materyalinin arasında fibröz bir bağdokusu oluşturmadan alıcı kemik yüzeyine kimyasal olarak bağlanabilme özelliğidir.

Osteokondüksiyon: Uygulandığı kemik bölgesinden damarsal yapıların grefte ilerleyebilmesi ve greftin oluşturduğu matriks üzerinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilme özelliğidir.

Osteoindüksiyon: Operasyon sahasındaki kemik dokusundan yüksek farklılaşma özelliğine sahip plüripotent hücrelerin osteoblastik fenotipe sahip hücrelere dönüşebilmesini indükleyebilme özelliğine sahip olabilmesidir.

Osteogenezis: Greft materyalinin içinde bulundurduğu hücresel elemanların osteoblastik özelliklerini göstererek uygulandığı bölgede yeni kemik yapımını sağlayabilmesidir.

2.7.1. Uygulanan Kemik Grefti Tipleri ve Sınıflaması

Kompozisyonlarına göre Bauer ve Muschler kemik grefti materyallerini sınıflandırmışlardır.⁹

1. OTOGREFTLER

- a. Aspire kemik iliği ya da işlenmiş kemik oluşturabilen hücreler
- b. Kansellöz kemik
- c. Non-vaskülarize kortikal kemik
- d. Vaskülarize kemik

2. ALLOGREFTLER

- a. Greft Kemiksel Yapısına Göre
 - i. Kortikal
 - ii. Kansellöz
 - iii. Osteokondral
- b. Greft İşlenme Prosedürüne Göre
 - i. Taze
 - ii. Dondurulmuş
 - iii. Dondurulmuş – Kurutulmuş
 - iv. Demineralize
- c. Greft Uygulanan Sterilizasyon İşlemine Göre
 - i. Steril şekilde işlenmiş
 - ii. Radyasyona maruz bırakılmış
 - iii. Etilen dioksit uygulanmış
- d. Granül Yapısına Göre (Paketlenmiş Üründe)
 - i. Toz
 - ii. Partiküllü

- iii. Jel
- iv. Macun kıvamlı ya da Putty
- v. Çip
- vi. Şerit ya da blok
- vii. Masif

3. Sentetik İskeletsel Materyaller

- a. Osteokondüktif blok ya da granüller
- b. Osteokondüktif simanlar
- c. Osteokondüktif proteinler
- d. Kompozitler

Kemik greftlerinin günümüzde kabul gören bir başka sınıflaması da aşağıdaki gibidir.^{25,83}

A- İnsan kaynaklı kemik greftleri

- Otojen greftler (Otogreftler)
- Homojen Greftler (Homogreftler)

1. Allojenik greftler (Allogreftler)

a-Taze dondurulmuş kemik

b-Dondurulmuş - kurutulmuş kemik allogrefti (FDBA)

c-Demineralize edilmiş dondurulmuş - kurutulmuş kemik allogrefti (DFDBA)

2. İzojenik Greftler (İzogreftler)

a-Taze kansellöz kemik ve kemik iliği

B- İnsan kaynaklı olmayan kemik greftleri

1- Ksenojenik greftler (Ksenogreftler)

a -Sığır kaynaklı hidroksiapatit

b-Mercan kalsiyum karbonat

2- Alloplastik greftler (Alloplastlar)

a-Polimerler

b-Bioseramikler

i- Trikalsiyum fosfat

ii- Hidroksiapatit

c- Bioaktif camlar

2.7.1.1. Ototogreftler

Operasyon sırasında veya öncesinde hastanın kendisinden elde edilen kemik grefti materyalidir. Osteojenik özellik taşıdığından bütün greft tiplerine göre altın standart olarak kabul edilmektedir. Canlı osteoblastlar ve osteoprogenitör kök hücreleri içerirler ve uygulandıkları alanda kemikleşmeyi osteogenezis ile gerçekleştirebilen tek greft tipidir.

Otojen kemik grefti elde edilmeden önce kortikal ve kansellöz kemikler arasında ayırım yapmak gerekmektedir. Bu greftler değişik iskelet bölgelerinden değişik formlarda elde edilebilmektedir. Kortikal kemik greftleri form sağlayıp rijit bir yapı oluştururken, kansellöz kemik greftlerine göre daha az osteogenezisi artırıcı yetenekleri vardır. Kansellöz kemik ve kemik iliğinin ise kortikal kemik greflere göre avantajı osteojenik aktiviteyi indükleme kapasitelerinin olması ve osteoblastlara dönüşebilen canlı hücrelere sahip olmalarıdır. Bu greftin tek bilinen dezavantajı mekanik direncinin az olması ve bioaktivitesinin yüksek olması nedeni ile hızlı rezorbe olabilmesidir. Bu iki tip otogreftlerinin avantajlarının aynı anda kullanılabilmesi adına kortikokansellöz kemik grefti kullanılabilmektedir. Ancak bu greft hem kortikal hem de kansellöz kemiklerin kuvvetli özelliklerini aynı derecede kombine etmemektedir.^{89,15}

İntraoral olarak mandibular semfiz ve ramus, tüber maksilla, ekzostozlar, dişsiz alanlar otogreft elde edilebilmesi için donör sahalardır. Ekstraoral olarak ise kosta, scapula, kalvarium, metatarsus, fibula, iliak kemik, radius, tibia gibi iskeletsel bölgeler

yüksek biyolojik uyumluluğa sahip, nonimmünjenik matriks kullanımı esasına dayalı verici bölgelerdir.^{88,99}

Kısa sürede damarlanması ve immünolojik cevaba neden olmamaları, alıcıya hastalık transferi riski taşımamaları ve ilave maliyet gerektirmemeleri otogreftlere avantaj sağlamaktadır. Elde edilebilmesi için ikincil bir operasyon sahası gerektirmeleri, buna bağlı olarak operasyon süresinin uzaması, donör bölgenin morbiditesi, büyük defektlerde yeterli miktarda elde edilememesi, nekroz, sınırlı damarlanma, greftin alıcı bölgeye yerleştirilmesindeki güçlükler, yüksek enfeksiyon riski, hospitalizasyon zorunluluğu ve en önemlisi iyileşme döneminde ve sonrasında, önceden tahmin edilemeyen, bazı vakalarda % 60-70 oranına ulaşabilen, rezorbsiyon riski olmak üzere çeşitli dezavantajları vardır.^{58,98,122,27}

2.7.1.2. Allogreftler (Homojen Greftler)

Donör olarak aynı türün değişik bireylerinden elde edilen kemik grefti tipidir. Alt grubu olarak izogreftler ise aralarında genetik benzerlik bulunan bireylerden (örneğin tek yumurta ikizleri) elde edilen greft türüdür. Verici bulma güçlüğü neden ile sık kullanılmamaktadır. Donör ve alıcı arasında genetik benzerlik olmadan elde edilen greftler ise allogreft olarak adlandırılmaktadır. Bu greftin immünolojik özelliklerinin, hastalık taşıma potansiyelinin ortadan kaldırılması adına ve materyalin uzun süre muhafaza edilebilmesi için kimyasal işlemlere tabi tutulması, dondurulma, dondurulup kurutulma, demineralizasyon gibi işlemlere tabi tutulmamaktadır.⁷⁵

Günümüzde en sık kullanılan allogreftler dondurulmuş kurutulmuş kemik greftleri (DKKA) ve demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftleridir (DDKKA). DKKA mineralize formda ve osteokondüktif özellik göstermektedir. Yeni kemik yapımını indüklemeyken, yeni kemik yapımı için iskelet görevi görmektedir. Mezenkimal dokulara yerleştirildiklerinde rezorbe olarak yeni kemik ile yer değiştirmektedir.^{57,77} DDKKA'da yeni kemik yapımı ise osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon aşamalarından geçerek meydana gelir. Demineralizasyon, mineral fazı ayırarak kortikal kemiğin osteojenik potansiyelini artırır böylece kemik uyarıcı proteinlerin açığa çıkmasını sağlar. Kemik oluşumunu uyaran bu proteinlerin genel adı kemik morfogenetik proteinleridir.¹⁰⁷ Vaskülerizasyonun iyi olduğu kemik bölgelerine uygulandıklarında defekt bölgesinin çevresindeki mezenkimal hücrelerin defekt

bölgesine göç etmesine ve bölgede bağlanmasına izin verirler. Böylece osteogenezisi uyarırlar. Kemik oluşturmayan bölgelere uygulandıklarında ise greftlerin endokondral kemikleşmeyi uyardığı görülmüştür.¹¹⁷

Allogreftler spongioz, kortikal ya da bunların kombinasyonu halinde bulunabilmektedir. DDKKA greftlerinin üretimi sırasında takip edilen işlem basamakları markalar arasında farklılıklar gösterebildiği için osteoindüktif kapasitelerinde belirli bir standardizasyon bulunmamaktadır. Düşükte olsa hastalık bulaşma riski, immün reaksiyona neden olma ihtimali, maliyeti ve finansal nedenler kullanım alanları sınırlandırmaktadır.⁸⁷

2.7.1.3. Ksenogreftler

Ksenogreftler alıcı için farklı türde donörlerden elde edilen kemik grefti materyalidir. Bu tip greftler için olası verici materyaller doğal hidroksiapatit ve organize olmamış sığır kemiğidir. Donörlerden elde edilen kemik greftleri immün reaksiyon oluşmaması ve antijenik özelliklerin yok edilmesi adına kaynatma, proteinden arındırılma, dondurma, dondurulup - kurutulma, kuru ısıtma ve radyasyona tabi tutuma gibi işlemlerden geçirilmektedir. Bu işlemler sonucunda ise kemikteki osteoindüktif proteinlerin belli oranda kaybına yol açabilmektedir.

Doğal hidroksiapatit, mercanın kalsiyum karbonat iskeletinden sentezlenir. Hidroksiapatit ortalama 200 µm'lik por çapı ile doğal kemiğin üç boyutlu mikroskopik yapısına sahiptir. Bu porlu yapı kemik iliğinden gelen hücrelerin porlara göç edebilmesine ve daha sonra damarlanmanın bu alanda gerçekleşmesine izin vermektedir. Materyal yüksek derecede biyouyumludur.⁴²

Sığır kaynaklı ksenogreftler ise sığır kemiklerinin tam olarak deproteinize edilmesi ve bütün organik bileşenlerinden arındırılması ile elde edilir. Geri kalan inorganik bölüm, poröz hidroksiapatit partikülleridir ve yapısal olarak insan kansellöz kemiğine benzer.³³

Ksenogreftler kullanıldıkları alıcı sahada yeni kemik yapımı için iskeletsel bir çatı oluştururlar. Bu oluşan çatı çerçevesinde alıcı sahadaki kemik osteojenik hücrelerinin rehberliğinde kemik büyümesi başladığı gözlenmektedir. Bu durumda greft partikülleri arasında örgün kemikten oluşan köprüler meydana gelmekte ve

ksenogreftten oluşan bu yapı total mineralize doku olarak adlandırılmaktadır. Örgü kemik kombinasyonu ile oluşmuş bu olgunlaşmamış doku yeniden şekillenme ve yer değiştime periyotları ile lameller kemiğe dönüşmektedir. Yani bu tip greftler kemik yeni oluşumunda osteokondüktif bir katkı göstermektedirler.⁶³

Ksenogreftler işlem sırada hazır bir şekilde bulunmaları, işlem sırasında ne kadar ihtiyaç duyuluyorsa o kadar temin edilebilmesi ve elde edilebilmeleri için hastaya ikincil bir operasyon gerektirmemeleri gibi avantajları vardır. Geç dönem vasküler penetrasyon, yavaş kemik iyileşmesi, hızlı kemik rezorpsiyonu, geç yada tamamlanmayan greft-kemik bütünleşmesi gibi dezavantajları vardır.

2.7.1.4. Alloplastlar

Allogreftlerin ve ksenogreftlerin dezavantajlarının üstesinden gelinmek üzere dizayn edilmiş sentetik kaynaklı greft biyomateriyalleridir. Osteokondüktif etki dışında yeni kemik oluşumuna başka etkisi bulunmayan tek greft tipidir. Yani uygulanan cerrahi alanın etrafındaki osteoz hücrelerin defek bölgesinde yeni kemik yapımına elverişli olmadığı durumlarda, defetin tamamı alloplastik biyolojik materyaller ile doldurulmaktadır. Bölgedeki kemik eksikliği oluşak yeni kemik ile değil, greft materyallinin kendisi ile tamamlanmaya çalışılmaktadır.²⁵

Alloplastlar üç temel tip üzerinde kullanıma sunulmuşlardır. Biyoseramiler, biyoaktif camlar ve polimerler bu üç ana grubu oluşturur. Biyoseramikler kullanılan işlem metoduna bağlı olarak değişik karakter özellikleri gösteren inorganik/nonmetalik kompozisyonlardan oluşan geniş bir ailedir. Biyoseramik greftler genel olarak kalsiyum fosfatlardan oluşurlar ve kemiğin mineral komponentlerini barındıran greft materyalleridir. Günümüzden en bilinen ve geniş kullanım sahası bulan fosfat grubu seramik greftler hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ ve beta trikalsiyum fosfat $[Ca_3(PO_4)_2]$ greft materyalleridir. Kalsiyum fosfat seramikler ile uygulandıkları bölgedeki kemik arasında Ca ve PO iyon alışverişi olduğu belirtilmiştir. Bu alışverişin implantasyondan hemen sonra bir hidroksiapatit katmanı oluşturduğu ve yeni kemik yapımında bu katmanın olumlu sonuçlar verdiği belirtilmiştir.^{80,51}

Sentetik hidroksiapatit, insan kemiğine benzer kimyasal birleşimi nedeniyle, en sık kullanılan allogreft malzemesidir. Yüksek bir kimyasal stabilitesi vardır, daha az

enflamasyona ve antijenik reaksiyona neden olur. Materyalin içine kemik dokusunun ve kan damarlarının göç edebilmesine izin veren gözeneklerin oluşumunun uyarılması için gerekli mikrostrüktür yapı kontrol edilebilmektedir. Buda yeni kemik yapımının ihtiyaç duyulduğu alana özel greft tipi dizayn edilebilmesine olanak sağlamaktadır. Bu değişik tiplerdeki hidroksiapatit türevi greftlerin belirlenmesinde internal gözenek çapı referans alınmaktadır. Poröz formdaki tipi hızlı bir şekilde greft içine doğru fibrovasküler doku büyümesine izin vermektedir. Bunun sonucunda da greft stabilitesi yüksek olur ve mikro hareketlere karşı direnci artmaktadır. Hidroksiapatit kaynaklı seramik greftlerin kullanımında verici saha morbiditesi ortadan kaldırılsa da granüler migrasyon ve tamamlanmayan rezorpsiyon gibi uzun dönem problemleri ile karşılaşılabilir. ¹⁰³

Trikalsiyum fosfat türevi seramik greftler kimyasal olarak hidroksiapatit türevi greftlere benzerdir. Fakat doğal kemiğe benzer kimyasal kompozisyona sahip değildir. Uygun olmayan porözitesi, göreceli olarak daha küçük gren büyüklüğü ve altı hafta gibi kısa bir süre içinde hızlı rezorpsiyonu gibi nedenlerden dolayı zayıf bir kemik grefti alternatifi olarak görülmektedir. Uygulandıkları cerrahi sahada diğer kemik greft materyalleriyle benzer iyileşme aşamaları takip eder. Ancak kemiğin mikro yapılarını göstermekte yetersiz kalır. Materyalin bilinen dezavantajları tahmin edilemeyen ve hızlı rezorpsiyon oranı olarak belirtilmiştir. ⁸⁵

Biyoaktif cam greftler kalsiyum tuzu sodium tuzu ve silikon karışımıdır. Silikon dioksit (silikat) ana bileşeni oluşturur. İki silikon bazlı ailenin kemiğe direkt olarak kaynama yeteneği vardır. Granüllerin ortalama boyutu 300-355µm dir. Cam yüzeylerin hidroksikarbonat apatit tabakası oluştuğu ve materyalin kemiğe bağlandığı bildirilmiştir. Fizyolojik sulu çözeltilere maruz kaldığı zaman biyoaktif cam yüzeyinde oluşan silika açısından zengin bir jel katmanının sonucu olan biyoaktif cam ve kemik arasında mekanik olarak güçlü bir bağ oluşur. Bu jel içerisinde Ca^{+2} ve PO_4^{-2} iyonları kemiğinkine benzer bir şekilde hidroksiapatit kristalleri oluşturmak için kombine olurlar bu nedenle daha güçlü bir kimyasal bağ oluştururlar. Yüksek mekanik dirençleri, erken restorasyona imkan sağlamaları yanında uygulama esnasında kırılabilirmeleri gibi dezavantajları bulunmaktadır. ¹⁰⁴

2.8. YÖNLENDİRİLMİŞ KEMİK REJENERASYONU TEKNİĞİ

Ağız kavitesi içinde çeşitli nedenler ile oluşabilecek kemik defektlerinin yerlerinin doldurulabilmesi için geliştirilmiş uygulama kolaylığı ile en yaygın kullanım alanı bulan yöntem yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tekniğidir. Bu teknik defektin sadece yeni kemik yapımı için izole edilmesi esasına dayanmaktadır. Defekt alanında istenmeyen fibröz doku hücreleri ve ürünlerini yara bölgesinden uzak tutan fakat besleyici sıvı ve gazların geçişine imkan veren bir bariyer membranının kullanımı gerekmektedir. Yeni kemik yapımının gerçekleşmesinin istenildiği bölgenin içerisine doğru yeni kemik ile yumuşak doku oluşumu ilerlemektedir. Yumuşak doku ilerlemesi o bölgeyi dolduracak yeni kemik yapımını durdurmakta veya azaltmaktadır. Bahsedilen membranlar ile yeni kemik yapımının gerçekleşmesinin istenildiği sınırlar çizilmekte ve yeni kemik yapımının bu sınırlar içerisinde gerçekleşmesi amaçlanmaktadır.^{3,82}

Defekt bölgelerine uygulanan kemik greftlerinin stabilitesi yeni kemik yapımı ve kemik greftlerinin başarısı için çok önemli bir unsurdur. Kemik greftleri ile doldurulan kavitelerin üzerine yerleştirilen membranların özellikler fiksasyon vidaları ile sabitlendikleri durumlarda kemik greftinin stabilizasyonuna olumlu etki etmektedir. Uygulanan kemik grefti için bir çatı görevi görmekte ve daha fazla kemik rejenerasyonu oluşturulmasında pozitif etki etmektedir. Bu anlamda bariyer membranın temel işlevinin kemik rejenerasyonu için belli bir sürede uygun bir ortam sağlamak olduğu söylenebilir.¹¹⁵

2.8.1. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu Tekniğinde Kullanılan Bariyer Membranlar

Bariyer membranların iki tipi mevcuttur. Bunlar:

1. Rezorbe Olabilen Bariyer Membranlar
2. Rezorbe Olmayan Bariyer Membranlar

2.8.1.1. Rezorbe Olabilen Bariyer Membranlar

Rezorbe olabilen membranlar glükolitik ve laktik polimerlerinden oluşmaktadır. Uygulandıkları bölgede hidroliz ile absorbe edilirler. Minimum altı hafta ile sekiz ay

içerisinde rezorbe olurlar. Krebs döngüsünde karbondioksit ve su ile elemine edilirler. Rezorbsiyon hızı ve süresi greftin kullanımında göz önünde bulundurulmalıdır. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu gerçekleştirilirken kullanılan greft tipinin kemikleşmesi için gerekli olan süre boyunca membranın özelliklerini koruması gerekmektedir. Çıkartılmaları için ikincil bir cerrahi işlem gerektirmemelerinin yanı sıra erken rezorbsiyon ve enflamatuvar yanıt geliştirebilmeleri gibi özellikleri bulunmaktadır.^{37,105,23}

İki tip rezorbe olabilen membran bulunmaktadır. Bunlar; organik esaslı kollajen membranlar ve sentetik esaslı membranlardır. Kollajen insan vücudunun ve periodonsiyumunun yapı taşıdır. Tip-1 kollajen periodontal konnektif dokuda bulunan temel komponenttir. Kollajen yüksek gerilme direnci, düşük uzama kabiliyeti, kontrol edilebilir çapraz bağlantısı, düşük antijenitesi ve pıhtılaşma üzerine olumlu etkileri olan bir materyaldir. Yüksek oranda kalsiyum bağlama özelliğine sahiptir. Fibroblastlarda kemotaksise ve fibrin bağlanmasını provake ederek yara iyileşmesine yardımcı olmaktadır. Manipulasyonu kolaydır. Doku kalınlığını arttırması gibi avantajları mevcuttur.^{50,71,93,106}

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tekniğinde kullanım alanı bulan kollajen membranların ana materyali tip 1 kollajendir. Bu kollajen kaynağını insandan (göbek kordonu), sığırdan (tendon, deri) veya domuzdan (deri) alabilmektedir. Kollajen membranların rezorbsiyon süresinin 2-6 hafta arasında gerçekleşmektedir.¹¹⁹

Sentetik esaslı membranlar laktik asit ve glikolik asit polimerlerinden oluşturulmaktadır. 1-2 ay içinde rezorbsiyonları gerçekleşmektedir. Absorbsiyonları gerçekleşirken serbest asitler ortaya çıkar. Bu da kemik formasyonu üzerinde negatif etkisi olan asit çevrenin oluşmasına neden olur. Absorbsiyon hızları polimer içeriklerine göre değişmektedir. Moleküler ağırlıkları, moleküler yapıları ve yüzey alanları değiştirilerek bu süreç kontrol altına alınabilmektedir. İnert olmaması, operasyon sahasının tam olarak kapatılamaması, ekspoz olma ve bakteriyel infiltrasyon riski gibi nedenlerden son yıllarda kollajen membranların kullanımı ön plana çıkmaktadır.^{45,49}

2.8.1.2. Rezorbe Olmayan Bariyer Membranlar

İlk olarak teflon esaslı politetrafluoretilen (PTFE) içerikli membranlar kullanılmaya başlanmıştır. Bu membranlar sonradan içeriğindeki teflon geliştirilerek expanded politetrafluoretilen (e-PTFE) membranlar olarak kullanım alanı bulmuşlardır. Bilinen en inert biyomateryallerden biridir. Uzun yıllardır e-PTFE materyallinin alıcıda bırakılması gereken vasküler greft gibi bir çok medikal uygulamada kullanılmıştır. Osteopromotif amaçlı kullanılan e-PTFE doku sıvıları ve makro moleküllere karşı geçirgenlik göstermektedir. Bu şekilde geçişi istenmeyen hücreler alandan uzakta tutulabilirken besinler yara bölgesine rahat hareket etme imkanı bulmaktadır.²⁴

Porozite, kalınlık gibi özellikleri uygulama amacına göre seçilmelidir. e-PTFE membranlar, osseöz rejenerasyonu ilerlemek amacıyla dizayn edilmiştir. İki ayrı mikro yapıya sahiptir. Materyalin sert ve bükülmez olan yeri, membranın içteki kısmıdır. Oklüziv bağ dokusunun içe doğru büyümesini önler. Membranla kemik arasındaki ara bölgenin devamlılığının sağlanmasına yardımcıdır. Periferal kısımda ise, bağ dokusunun içeri girmesine izin veren daha açık bir mikro yapı gözlemlenir. Bu kısım daha esnektir. Böylece defektin sınırlarının yumuşak bir şekilde örtülmesi sağlanır.²⁴

Bütün membranlardan olduğu gibi e-PTFE membranlardan da defekt bölgesinde sağlam bir çatı oluşturması istenilmektedir. Bu yüzden e-PTFE membranların geniş defektlerde uygulandıkları yaşanabilen kolaps probleminin üstesinden gelmek adına titanyum destekli membranlar geliştirilmiştir. Bu yöntemde e-PTFE membranların içerisine bir iskelet oluşturmak için titanyum destekler konulmuş ve kolapsa karşı membranın direnci arttırılmaya çalışılmıştır.^{118,16}

Günümüze kadar yapılan çalışmaların çoğu e-PTFE membran kullanımında başarılı sonuçlara ulaşıldığını göstermektedir. Ancak bu membranlarda yumuşak doku dehisensi olabilmekte ve membran ekspozu ile meydana gelen enfeksiyon kemik kazanç miktarını ve başarıyı önemli derecede azaltmaktadır. Ayrıca membranın çıkarılması için ikinci bir cerrahi işlem gerektirmesi ve dolaylı olarak rejenere olan kemik kaybına neden olması dezavantajı olarak bilinmektedir.^{29,12,96}

2.9. KEMİK İLİĞİNİN KEMİK OLUŞTURMA KAPASİTESİ

1869 yılında Gaujon tarafından kemik iliğinin kemik oluşturma kapasitesi incelenmiştir. Kemik yapımını indükleyen osteojenik prekürsör hücreleri kemik iliğinin içerdiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bir çok çalışmada kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilemesi amacı ile kemik defektlerine yerleştirilen greft materyalleri ile otojen kemik iliği beraber uygulanmıştır.²⁸ İlk olarak Burwell ve Dikson yaptıkları çalışmada ksenogreft ile kemik iliğini birlikte kullandıkları ortopedik çalışmada, greft materyalini damardan zengin bölgelere veya kemik iliği ile birlikte uyguladıklarında yeni kemik yapımının olumlu yönde etkilendiğini bildirmişlerdir.¹⁰¹

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu gibi yeni kemik oluşturulması için yapılan bütün işlemlerde osteogenezezin indüklenmesi temel amaçtır. Bu amaca uygun en yüksek potansiyele sahip kemik grefti ise taze otojen iliak kanselöz kemik greftleridir. Bu greftler trabeküllerinin arasında kemik iliği taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda iliak greftlerin büyük bölümünün rezorbe olduğunu ve canlılığını yitirdiğini fakat kalan ilik materyalinin osteogenezi sağladığını göstermişlerdir. Konak hücreleri, hem kemik matriksi ile hemde ilik hücrelerinin özel olmayan mezenkimal hücreleri tarafından indüklenmesi ile kemik üretmeye başlarlar. Fakat yeni kemik yapımının büyük bölümü yerleştirilen greft ve ilik materyalinin içerisinde canlılığını koruyabilen osteoblastlar ile gerçekleşir. Yerleştirilen kemik iliği içerisinde bulunan hücreler nekroz olurlarken etrafında bulunan hücreleri uyarırlar yada spesifik olmayan mezenkimal hücreleri indüklerler. Kemik iliği içerisinde az miktarda bulunan mezenkimal hücrelerinde olaya katkıda bulundukları düşünülmektedir. Konulan ilik materyalinin fazlalığı yeni oluşan kemik miktarını önemli oranda etkilemektedir.¹⁰¹

2.10. KÖK HÜCRELER

Mitoz bölünme ile spesifik hücre tiplerine farklılaşabilme yeteneğine sahip ve daha fazla kök hücre oluşturabilmek için kendini yenileyebilme özelliğine sahip hücrelerdir. Bütün çok hücreli organizmaların doku ve organlarının oluşmasını sağlayan ana hücre tipidir.

Bir hücrenin kök hücre sayılabilmesi için iki özelliği bulundurması gerekmektedir. Bu özellikler; farklılaşmamış safhasını sürdürerek, çok sayıda hücre bölünmesi yaparak kendini yenileyebilmesi ve yetkinlik özelliğini göstererek özelleşmiş hücrelere farklılaşabilme yeteneğidir.¹¹⁶

Farklılaşma aşamasında ana kök hücre sayısının azalmaması için gerekli olan kendini yenileme süreci iki şekilde gerçekleşebilmektedir.

1. Asimetrik hücre bölünmesi (Zorunlu asimetrik replikasyon) ile: Bir kök hücre kendisi ile özdeş olan bir ana hücreye bölünür, diğer oğul hücre ise farklılaşır.
2. Stoklastik farklılaşma: Bir kök hücre iki farklı oğul hücreye bölündüğünde başka bir kök hücre mitoz girer ve ana hücreye özdeş iki kök hücreyi üretir.

Kök hücrelerin yetkinlikleri değerlendirildiğinde ise farklılık gösterdikleri belirlenmiştir. Yani kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre farklılık gösterebilmektedir. Bu özelliklerine göre şu şekilde sınıflandırabilirler:^{44,79}

1. Totipotent (Omnipotent) kök hücreler: Embriyonik yada ekstra embriyonik hücre tiplerine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Bu hücreler tüm ve yaşayan bir organizmayı oluşturabilirler. Yumurta ve sperm hücrelerinin kaynaşması ile oluşurlar.
2. Pluripotent kök hücreler: Totipotent hücrelerin soyundan gelirler ve üç germ tabakasından meydana gelen neredeyse tüm hücrelere farklılaşabilme yeteneğine sahiptirler.
3. Multipotent kök hücreler: Bir miktar hücrelere farklılaşabilen hücre tipidir.
4. Oligopotent kök hücreler: Lenfoid yada miyeloid kök hücreler gibi sadece birkaç hücre tipine farklılaşabilirler.
5. Unipotent kök hücreler: Sadece bir hücre tipine (kendilerine) dönüşebilen hücre tipidir.

Memelilerde kök hücrelerin iki yaygın tipi bulunur. Bunlar blastokist evresinin iç tabakasından elde edilen embriyonik kök hücreler ve çeşitli dokulardan bulunan yetişkin kök hücrelerdir.

2.10.1. Embriyonik Kök Hücre

Embriyonik kök hücreler blastokist ya da morula evrelerinin erken safhalarında trofoblast ve iç hücre kümesinden köken alan epiblastlardan elde edilen hücre tipidir. Blastokist evresi 50 ile 150 hücreden meydana gelen ve insan embriyosunun yaklaşık dört - beş günlük ilk evrelerindendir. Bu dönemde embriyonik kök hücreler pluripotent hücrelerdir. Yani üç germ tabakasından (endoderm, ektoderm ve mezoderm) da türevlenen hücre tiplerine farklılaşabilirler.⁷

Embriyonik kök hücrelerin yetişkin kök hücrelere göre en büyük avantajı kültürde uzun süre özelliklerini kaybetmeden üretilebilmesidir. Bu hücreler, farklılaşmasının yönlendirilmesi ile potansiyel olarak tüm hücre tiplerine yönlenebilmektedir.

Pluripotent olan embriyonik kök hücreler doğru farklılaşma için özgül sinyallere ihtiyaç duymaktadırlar. Embriyonik kök hücreler sınırsız genişleme ve pluripotensi yeteneklerinin birleşimlerinden dolayı, teorik olarak yenileyici tip ve hastalık sonrası doku onarımı için olası kaynaklardır. Nakil reddini engellemede kullanılması mümkün olan ve uygun hücrelere farklılaşma yeteneğini bulunan bu hücreler araştırmacıların hala yüzleşmekte olduğu bazı engelleri de bulundurmaktadır. Eğer bir vücuttan diğerine doğrudan verilirlerse bu kök hücreler teratomaya yol açabilecek bir çok farklı hücreye farklılaşabilirler.¹²¹

Bu özellikleri bakımından kök hücreler kanser, sinir sistemi hastalıkları (Alzheimer) ve hasarları, metabolik hastalıklar (diyabet), organ yetmezlikleri, romatizmal hastalıklar, kalp hastalıkları, kemik hastalıkları ve daha birçok alanda kullanıma sahiptirler. Günümüzde bu hastalıkların bazılarının tedavisinde organ veya doku nakilleri yapılmaktadır. Ancak, organ veya doku nakli gerektiren hastaların çokluğu, uygun organ ve dokunun her zaman bulunamaması gibi sorunlarla sürekli karşılaşılmaktadır. Bilim ve teknolojiye son gelişmeler doğrultusunda kök hücrelerin bu alanda kullanılması gündeme gelmiştir.⁷

2.10.2. Yetişkin Kök Hücre

Yetişkin kök hücreler organizmanın canlılığı boyunca sınırlı olmakla birlikte kendilerini yenileyebilme özelliğini korumaktadır. Elde edildikleri dokuya dönüşme potansiyelleri daha yüksek olan multipotent kök hücrelerdir. Embriyonik kök hücreler gibi vücut dışarısında uzun süre çoğalma yeteneklerini koruyamamaktadırlar. Tüm hücre tiplerine dönüşmemedikleri için teratokarsinom oluşturma riskleri düşüktür.

Yetişkin kök hücreler bulundukları doku veya organa özelleşmiş hücre tiplerine farklılaşabilmektedir. Somatik kök hücre de denilen erişkin kök hücrelerinin esas görevi bulundukları tamir etmek ve dokunun devamlılığını sağlamaktır.²

Yetişkin kök hücreler kemik iliği, kas, göz, sinir, karaciğer ve deri gibi dokularda bulunur. İnsan vücudunda en fazla erişkin kök hücre kemik iliğinde bulunmaktadır. Bu tür hücreler çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanım alanı bulabilmektedir. En sık kullanılan kullanım alanı bulunduğu tedavi prosedürü lösemi hastalarında kemik iliğinden elde edilen kök hücre transplantasyonudur.³⁰

Yetişkin kök hücrelerin belirli bir yerleşimleri olmadığı için elde edilmeleri kolay olmamaktadır. Örneğin kemik iliğinden farklı olarak beyinde kök hücreler farklı bölgelere dağılmış olarak bulunmaktadır.

Belirli bir zamana kadar yetişkin kök hücrelerin farklı bir dokuya ait hücre tipine farklılaşabileceği düşünülmemekteydi. Ancak günümüzde bu mümkün olarak kabul edilmektedir. Örneğin, kemik iliği kök hücrelerinin iskelet kasına farklılaştığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Belirtildiği gibi bu farklılaşma sadece aynı germ tabakasından gelişen hücre yönüne doğru da yönelim olmaktadır. Bu özellik ‘plastisite’ veya ‘transdiferansiyasyon’ olarak isimlendirilmektedir.³⁶

Yetişkin kök hücrelerin farklılaşma ve değişme potansiyellerinin embriyonik kök hücrelere göre kısıtlı olması, elde edilmesinin çok zor olması ve bütün yetişkin kök hücre tiplerinin keşfedilmemiş olması gibi dezavantajları vardır.

En iyi bilinen ve en çok kullanım alanı bulunan yetişkin kök hücre tipleri kemik iliği içinde bulunan mezenkimal kök hücreler ve hemopoetik kök hücrelerdir.

2.10.2.1. Hemopoetik Kök Hücreler

Hakkında en fazla bilgiye sahip kök hücre tipidir. Kendi kendini yenileyebilme ve kanı oluşturan bütün kan hücrelerine (lenfosit, ertirosit, monosit, trombosit vb.) farklılaşabilme özelliğine sahip hücre tipidir. Hemopoetik kök hücreler kaynağını kemik iliğinden alırlar. Fakat sadece kemik iliği hemopoetik hücrelere kaynak oluşturmamaktadır. Kemik iliği dışında kordon kanından, periferik kandan ve fetal karaciğerden bir miktar elde edilebilmektedirler. Gelişimleri sırasında kendilerini destekleyen bölgeler arasında göç edebilirler. Buna en güzel örnek transplante edilen hemopoetik kök hücrelerin hepsinin bir gün içerisinde alıcının kemik iliği kavitesine dönmesidir.^{100,70}

2.10.2.2. Mezenkimal Kök Hücreler

Alman patolog Cohnheim tarafında 130 yıl önce kemik iliğinde non-hematopoetik hücrelerin varlığı ileri sürülmüştür. Fakat Mezenkimal hücrelerin ilk kez tanımlanması 1976 yılında Fridenstein tarafından yapılmıştır. Fridenstein fetal buzağı serumu kullanılarak yapılan kemik iliği kültürlerinde adezyon yeteneği gösteren morfolojik olarak fibroblastlara benzeyen hücre kolonilerinin bulunduğunu ve bunların kemik ve yağ hücrelerine farklılaşma yeteneğine sahip olduklarını göstermiştir.⁴⁰

Mezenkimal hücreler kemik iliği de dahil olmak üzere dokularda çok az sayıda bulunmaktadır. Ayrıca adeziv özelliklerine bağlı olarak bulundukları dokulardan yeterli sayıda elde edilmelerinde zorluklar vardır. Tedavi, hatta araştırma amaçlı kullanım için bile in-vitro kültür ortamında çoğaltılmaları gerekir. Bu hücrelerin in vitro çoğaltılmaya elverişli, dayanıklı hücreler oldukları, kültürde proliferasyon ve farklılaşma yeteneklerini korudukları bilinmektedir.³²

Bu hücreler, fiziksel (fibroblastoid ve adezyon göstermeleri) ve yüzey antijen özellikleri (stromal karakterde ve adezyon molekülleri ekspresyonu) yanında kemik, kıkırdak ve yağ dokusuna farklılaşabilme özellikleri ile tanımlanırlar. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri hemopoetik hücreler için gerekli birçok büyüme faktörünü salgılar (makrofaj koloni stimule eden faktör, stem cell faktör gibi); ayrıca diğer kök

hücreler ile ortak olan bazı gen ekspresyonları yanında konnektif dokuya özgün moleküler ve adezyon moleküllerini eksprese eder.^{94,120}

Farklı dokulardan morfolojik ve biyolojik olarak benzer özelliklere sahip mezenkimal kök hücreler izole edilebilmektedir. Ancak yine de hücrelerin farklılaşma ve immünomodulatör özellikleri, in vivo etkinliği gibi konularda hücrelerin geliştirildiği çevre koşullarına bağlı değişiklikler olduğu bildirilmektedir.^{120,65}

Mezenkimal hücrelerin fenotipik özellikleri ile yapılan çalışmalar genellikle primer hücreden ziyade kültürde çoğaltılmış hücrelerde araştırılmıştır. Kültürde çoğaltılmış hücrelerin özelliklerinin in vivo fenotipik özellikleri yansıttığı konusunda şüpheler bulunmaktadır. Çoğaltılmış hücreler ile yapılan analizlerin aksine fetal akciğer ve karaciğer dokularında elde edilen ve çoğaltılmadan yapılan incelemelerde mezenkimal kök hücrelerin CD4 pozitif olduğu gösterilmiştir. Bu bulgular da mezenkimal kök hücrelerin kültür ortamında antijenik özelliklerinin değiştiğini düşündürmektedir.^{120,65}

2.10.2.2.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilmesinde Kullanılan Sahalar

Mezenkimal kök hücrelerin ana kaynağı kemik iliğidir. Kemik iliğinde, mezodermden köken alan hematopoetik, endotel ve mezenkimal kök - progenitor hücreler bulunmaktadır. Farklı çalışmalarda kemik iliği aspirasyonunda 100 milyon mononükleer hücreye karşı ortalama 2 ile 100 arasında değişen sayıda MKH mevcut olduğu gösterilmiştir. Çocuklarda 29 CFU /1 milyon mezenkimal kök hücre oranı varken; ileri yaşlarda bu oran 3.2 CFU/1 milyon mezenkimal kök hücre oranına kadar inmektedir.¹⁰ Günümüzde mezenkimal kök hücrelerler bir çok farklı dokulardan;

- a. Kemik iliği
- b. Kemik trabeküler dokusu
- c. Kordon kanı
- d. Placenta, Wharton jeli
- e. Amnion mayi,
- f. Yağ dokusu,
- g. Tendonlar,
- h. Sinoviyal membran,

- i. Karaciğer,
- j. Dişten elde edilebilmektedir.

Periferik kanda varlığı ise tartışmalıdır. Periferik kanda osteojenik farklılaşma yeteneği olan non-hematopoetik ve mezenkimal kök hücre karakterinde hücreler olduğu gösterilmiştir. Özellikle ağır hasar olan durumlarda, kemik kırığı, multiorgan yetmezliği hallerinde periferik kandan mezenkimal kök hücre izole edildiği gösterilmiştir. Kemik iliği, göbek kordonu, periferik kan, amnionik sıvı, periost, yağ dokusu, sinovial membran ve kas gibi bir çok kaynaktan elde edilebildiği gibi maksillofasiyal bölgede de izolasyonu ile ilgili çalışmalar bulunmaktadır.

Ağız ortamında en kolay ulaşılabilen bölgelerden biri olan ve sürekli yenilenmekte olan diş etinin mezenkimal kök hücre için potansiyel bir kaynak olabileceğiyle ilgili bir çalışmaya literatürde rastlanılmıştır. Ayrıca dental folikül dokusundan izolasyonu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Çalışmada, çekim endikasyonu konulmuş gömülü 20 yaş diş olan 6 hastada insizyon esnasında çıkarılan diş etinden ve dental folikül dokusundan alınan doku örneklerinden hücre kültürü yapılmış ve tüm örneklerde adezyon özelliği gösteren mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu yapılmış ve kültürde çoğaltılmıştır. Akım sitometri yöntemiyle hücrelerin immünofenotipleri tanımlanmış ve adiposit, osteosit, kondrosit, ve nöronal hücrelere farklılaşma potansiyelleri araştırılmıştır. Her iki dokudan da geliştirilen MKH'lerin stromal antijenleri yüksek oranda taşıdığı gösterilmiştir (%60-98)

2.10.2.2.2. Mezenkimal Kök Hücrelerin Elde Edilme Yöntemleri

Kemik rejenerasyonunda mezenkimal kök hücre bazlı üç temel yöntem vardır. Birincisi kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre organizmadan alınıp, kültürde çoğaltılıp uygun taşıyıcı ile yine aynı organizmaya verilmesidir. Kemik iliği organizmadan alınır. Mezenkimal kök hücreler izole edilerek hücre kültüründe çoğaltılır. Osteoindüktif bir matriks ile kombine edilerek kemik defekt bölgesine yerleştirilir.²² Köpek spinal füzyon modelleri, koyun ve köpek femur ve tibia da büyük segmental kemik defekt modelleri bu bağlamda kullanılmıştır.^{64,74} Özellikle köpeklerde yapılan femur defekt modelinde poröz hidroksiapatit / β -trikalsiyum (Zimmer, Warsaw, IM), seramik silindirik taşıyıcı ile kullanılan otojen mezenkimal kök hücrelerin

iyileşmenin özellikle 12. haftasında en yüksek miktarda kemikleşmeyi sağladığı görülmüştür.

İkincil strateji olarak mezenkimal kök hücreler hematopetik hücre yüzey belirteçleri içermediğinden immün sistemi uyarmaz, bundan dolayı bunların allojen olarak çoğaltılıp kullanılabilir hücre kültürleri veya bankaları elde edilebilir.^{8,21} Mezenkimal kök hücrelerin kemik iyileşmesinde allojen olarak kullanımı köpeğin femurundaki kritik büyüklükteki defektlerde kemik iyileşmesi araştırılmıştır. Poröz hidroksiapatit / β -trikalsiyum seramik silindirik taşıyıcı ile kullanılan allojen mezenkimal kök hücrelerin yeni kemik oluşturduğu ve çalışmanın hiç bir aşamasında immün reaksiyona ve antikorlara neden olmadığı tespit edilmiştir.⁴ Ayrıca yeni kemikleşmenin endokondral yapıdan çok intramembranöz yolla oluştuğu tespit edilmiştir. Femur diafizindeki yeni kemik oluşumunun yeniden şekillenmesinin de uygun olduğu görülmüştür. Bu çalışma allojen kök hücrelerin otojen kök hücreler kadar immün reaksiyona neden olmadan kemik iyileşmesinde etkili olduğunu savunmaktadır. Bu sonuçla allojen mezenkimal kök hücrelerin cerrahi olarak kemik iyileşmesi için yapılan amelyatlarda kullanılabileceği öngörülmektedir. Mezenkimal kök hücrelerin dondurularak saklanması ve kişinin kendi kök hücre kültürünü beklemeye gerek bırakmaması nedeniyle tercih sebebi olabilmektedir.

Üçüncü yöntem olarak ise, büyük kemik iliği aspiratlarının (selektif hücre retansiyonu) konsantre edilerek hücre kültürü yapılmaksızın otolog olarak eş zamanlı intraoperatif olarak verilmesidir. Ancak bu teknik, kültürle elde edilen mezenkimal hücre konsantrasyonuna erişememektedir. Bu hücrelerin osteoindüktif ve osteokondüktif materyallerle kemik defekti bölgelerine verilmeleri bu hücrelerin yeterli çoğalma ve farklılaşmalarını sağlamıştır. Bu amaçla yapılan çalışmada demineralize kemik matriksi ve mineralize kanselöz kemik kombinasyonu (Allomatrix, Veterinary Transplant Services, Kent WA) selektif hücre retansiyonundan elde edilen mezenkimal kök hücre ile kombine edilmiştir. Selektif hücre retansiyonu tekniği ile kemik greft materyali oluşturulması mezenkimal kök hücrelerin yapışma özellikleri kullanılarak büyük miktarda kemik iliği aspirasyonları ile elde edilen mezenkimal kök hücrelerin sayıca az olsa da osteoindüktif ve osteokondüktif materyallerle birleştirilip uygun kemik greft materyalleri elde edilebilir. Bu çalışma sonucuna göre allomatrix ile kombine

edilmiş selektif hücre retansiyonundan elde edilen mezenkimal kök hücreler otojen kansellöz kemik kadar iyi bir iyileşme paterni göstermiştir.²⁰

2.10.2.2.3. Mezenkimal Kök Hücrelerin Farklılaşma Özellikleri

Mezenkimal kök hücrelerin, özellikle rejeneratif tıp uygulamaları için en çok ilgi çeken özelliği, bu hücrelerin uygun mikro çevre koşullarında başta konnektif doku olmak üzere çok çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilme potansiyeli varlığının gösterilmiş olmasıdır. Mezenkimal kök hücreler tek hücre düzeyinde osteoblastları, kondroblastları, adipositleri, fibroblastları ve iskelet myoblastlarını da içeren mezodermal hücrelere diferansiye olabilmektedirler.^{94,120}

Caplan ve ark.'nın ardından çeşitli araştırmacılar in vitro koşullarda uygun stimulanlarla osteojenik (kemik yapıcı), adipojenik (yağ yapıcı), kondrojenik (kıkırdak yapıcı), miyojenik (kas yapıcı) farklılaşma kapasitelerini ve hematopoetik stroma oluşturabildiklerini göstermiştir. İlerleyen zamanda mezenkimal kök hücrelerden pankreas beta hücreleri, hepatosit, endotel ve epitelooid hücrelere dönüşüm olduğu, yine uygun koşullar sağlandığında, nöronal hücreler (nöron, glial hücre, astrosit) geliştiği de gösterilmiştir. Bunlar içinde, özellikle nörona farklılaşmanın mümkün olup olmadığı halen tartışmalıdır.

Farklılaşma potansiyeli ile ilgili diğer bir konu ise, mezenkimal kök hücrelerin, adiposit, osteosit gibi kendi kökeninden değil de farklı bir doku hücresine (hepatosit, pankreas beta hücresi gibi) trans-farklılaşma (transdifferentiation) oranının in-vivo koşullarda çok düşük olduğu, ancak çok az sayıda hücrede trans-farklılaşma gelişebildiği, o nedenle de bu mekanizmanın hasar tamirinde ancak sınırlı bir etkisi olabileceğidir.

2.10.2.2.3.1. Mezenkimal Kök Hücrelerin Başlıca Farklılaşma Protokolleri

Adipojenik Farklılaşma: %90-100 oranında konfluent olana kadar geliştirilen mezenkimal kök hücreler üzerine, büyüme vasatı yerine DMEM-LG içerisinde %10 FCS, 1 µM deksametazon, 60 µM indometazin, 500µM IBMX (İzobütilmetilksantin) ve 5µg/ml insülin ile hazırlanan adipojenik kokteyl konularak farklılaşma uyandırılır, sonra analiz edilir.

Osteojenik Farklılaşma: %50-60 oranında confluent olana kadar geliştirilen mezenkimal kök hücreler üzerine, büyüme vasatı yerine, DMEM-LG içerisinde %10 FCS, 100 nM deksametazon, 10 nM betagliserofosfat ve 0.2 mM askorbik asit ile hazırlanan osteojenik farklılaşma vasatı konularak farklılaşma uyarılır. Üç hafta sonra kültürdeki ekstraselüler matrikste kalsifikasyon, kalsiyum fosfat depoları belirgin olarak tespit edilir.

Kondrojenik Farklılaşma: Hücreler, bir hücre pelletinde kültür edilerek boyutlu bir ortam sağlanmış olur. Hücre pelleti üzerine DMEM-HG içerisinde 100 nM deksametazon, 10 ng/ml TGF β , 50 μ g/ml askorbik asit ve 50 mg/ml ITS+Premiks ilave edilerek hazırlanmış olan kıkırdaklaşma vasatı konularak 37 °C ve %5 CO₂ koşullarında farklılaşmaya bırakılır ve yine üç hafta sonra doku kesitinde kıkırdak gelişimi incelenir.

Nöronal Farklılaşma: Doku kültür kapları içindeki hücreler üzerine, DMEM-LG içerisinde 200 μ M BHA (Bütillenmiş hidroksianisol), 10 μ M forskolin (FSK), 20 mM valporik asit (VA), 2% DMSO, 25 mM KCl, 1 μ M hidrokortizon, 5 μ g/ml insulin ve %1 pen/streptomisin ile hazırlanan farklılaşma vasatı konulur. 45 inci dakika ile 24 üncü saat arasındaki morfolojik değişiklikler takip edilir.

Mezenkimal kök hücrelerin, kendi dizinleri dışındaki farklı hücre dizilerine de farklılaşabilme niteliği “kök hücre plastisitesi” adı altında toplanmıştır. Kök hücre plastisitesi, bir hücrenin köken aldıkları dokuların dışındaki dokulara farklılaşma özelliğini tanımlamaktadır.

2.10.2.2.4. Mezenkima Kök Hücrelerin Kullanım Alanları

Mezenkimal kök hücreler bugüne kadar konvensiyonel tedavi metodlarının yetersiz kaldığı pek çok değişik hastalığın tedavisinde gelecek vaat eden bir yöntemdir. Mezenkimal kök hücrelerin hastanın kendisinden kolaylıkla elde edilebilmesi, kültür ortamında istenilen miktar kadar çoğaltılabilmesi, multipotansiyel özelliği ve farklı dokulara migrasyon gerçekleştirebilmesi bu tedavinin bir çok hastalığa alternatif bir tedavi protokolü oluşturabilmesini sağlamaktadır.

Kemik iliği ve organ nakil hastalarında özellikle immünosupresif özelliklerinin ve stroma desteği sağlayıcı özelliklerinin önemli katkıları olabileceği düşünülmektedir. Yeni gelişen hematopoezin desteklenerek kemik iliği reddinin önlenmesi ve allojenik transplantlarda graft versus host hastalığının önlenmesi veya tedavisinde katkıları son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Otolog ve allojenik hematopoetik kök hücre transplantasyonunda yeni gelişen hematopezi destekleyerek engraftmanın güçlendirilmesi sağlanmıştır. Allojenik hücrelerin lösemi üzerindeki immunolojik etkisini (graft versus lösemi) feda etmeksizin gerçekleştirebilecek bir immunsupresyon, graft versus host tedavisinde önemli bir gelişme sağlamaktadır.^{67,26}

Mezenkimal kök hücrelerin belki de en ilgi çeken tedavi alanı rejeneratif amaçlı kullanımlarıdır. Herhangi bir dokunun tamir edilebilmesi sadece tamiri gerçekleştiren hücreleri değil aynı zamanda aktarılan mezenkimal kök hücrelerin prolifer olabileceği ve özel büyüme faktörleri ve sitokinlerle etkileşebileceği yeterli bir yapıya da (scaffold) ihtiyaç gösterir. Mezenkimal kök hücrelerin osteosit ve kondrosite in vitro olarak farklılaşabileceğinin gösterilmesi ile mezenkimal kök hücreler in-vivo doku tamirinde kullanılmaya başlanmıştır. Birçok hayvan modelinde hidroksiapatit matrikslerinde yüklenmiş mezenkimal kök hücreler segmental kemik defektlerinin giderilmesinde başarı ile kullanılmıştır. Osteogenesis imperfekta bulunan çocuklara kemik iliği hücrelerinin infüze edilmesi ile hücreler herhangi bir yan etki gözlenmeksizin engraft olmuşlar aynı zamanda ortalama osteoblast sayısı üç ay sonra artış göstermiş yeni lameller kemik oluşumu izlenmiştir. Bu çocuklarda kırık sıklığı azalmış ve vücut büyüme hızı artmıştır.⁴⁸ Izuta ve ark. çıkardıkları tavşan menisküslerinde avasküler zonda tam kat defekt oluşturarak in vitro şartlarda fibrin yapıştırıcı ile mezenkimal kök hücre uygulamışlardır. Yaptıkları değerlendirmelerde mezenkimal kök hücre uygulanan menisküslerin tamir edildiğini göstermişlerdir.⁵²

Diagnositik görüntüleme ile hepatosellüler karsinom tespit edilen dokuz karaciğer sirozlu hastaya periferik venöz yoldan kendi kemik iliklerinden alınan mononükleer hücreler infüze edilmiş ve hastaların karaciğer fonksiyonlarında istatistiksel yönden anlamlı düzelme olduğu, karaciğer hepatosit rejenerasyonunun arttığı, karaciğerdeki fibrozisin iyileştiği, altı ay sonra ortalama serum albümin ve total protein miktarının anlamlı seviyede arttığı ve hastaların hiç birinde belirgin yan etki görülmediği rapor edilmiştir.¹¹⁴

Multipelskleroz, amiotrofik lateral skleroz gibi hastalıklarda deneme veya deneysel araştırma kapsamında kullanılmaya başlanmış, güvenle verilebildiği hastalık belirtilerinde yavaşlama sağlanabileceği bildirilmiştir.

İn-vitro ortamda ekspanse edilen mezenkimal kök hücreler mükemmel bir taşıyıcı olarak gen tedavilerinde umut vaat etmektedir. Hayvan deneylerinde fare ve köpek kaynaklı mezenkimal kök hücrelerin insan kaynaklı büyüme faktörü hormonu ile IL-3 gibi genlerle transduce edilmesinden sonra tekrar hayvanlara infüze edilmesi ile birlikte birkaç ay içinde bu hormon ve sitokinlerin plazmada eksprese edilmeye başlandığı izlenmiştir.³⁴

Mezenkimal kök hücreler ile in-vivo ve in-vitro deneysel araştırmalar çok sayıda olsa da rapor edilen klinik uygulama sayısı oldukça azdır. Ön çalışmalar güvenli olduğunu düşündürse de uzun süreli takip edilen hasta sayısının artırılması gerekmektedir. Ayrıca etkinliği konusunda çalışmaların sayısı yeterli değildir. Bu nedenle yaygın kullanıma geçmeden önce çok daha fazla sayıda hastada klinik deneyim kazanılması gerekmektedir. Klinik uygulamaların etik kurul kararları doğrultusunda ve önceliğin başka tedavi şansı olmayan, ilerleyici, ağır hastalıklara verilerek yapılması ile henüz çok yeni olan bu hücresel tedavinin maddi kazanç amaçlı ve kontrolsüz kullanımının önüne geçilmeye çalışılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Operasyon Öncesi İşlemler

3.1.1. Genel Bilgi

Çalışmada toplam altı adet erkek koyun kullanılmıştır. Hayvan deneylerinin yapılabilmesi için çalışmaya başlanmadan önce İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (İ.Ü.HADYЕК) Komitesi'nden 27.06.2012 tarihli 2012/ 89 karar nolu yazılı onay alınmıştır.

Deney hayvanları İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Cerrahi Anabilimdalı tarafından genel sağlık kontrolleri yapılarak temin edilmiştir. Deney hayvanları satın alınmasından sakrifikasyonlarına kadar geçen sürede İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi'ne ait hayvan barınaklarında saklanmış, klinik operasyonların gerçekleştirilmesi için aynı fakültenin küçükbaş klinikleri uygun görülmüştür. Operasyonlardan sonra bu kliniklerden barınaklara taşınan hayvanlar, iyileşme dönemi boyunca gözlem altında tutulmuşlardır. Çalışma, İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliği tarafından desteklenmiştir. (Proje no:26012)

Herbir koyunun mandibula ve maksillasına dörder adet defekt oluşturulmuştur. Herbir çenenin sağ ve sol segmentinde ikişer adet defekt bulunmaktadır. Oluşturulan defektlere greft materyalleri her koyunda ve çenede bir kez uygulanmak şartı ile rasgele uygulanmıştır. Oluşturulan defektlerin bir tanesi boş bırakılmış, ikincisi sığır kaynaklı greft materyali (Bio-oss, Geistlich, İsviçre), üçüncüsü kemik iliği kaynaklı kök hücre konsantrasyonu (HarvesBMAC, Harvesttech, USA) sonuncusu ise sığır kaynaklı greft materyali (Bio-oss, Geistlich, İsviçre) ve kemik iliği kaynaklı kök hücre konsantrasyonu (HarvesBMAC, Harvesttech, USA) karışımı ile doldurulmuş ve kollajen esaslı membran (Bio-guide, Geistlich, İsviçre) ile yönlendirilmiş doku rejenerasyonu uygulanmıştır.

3.1.2. Operasyon Öncesi Hazırlıklar

Deney hayvanlarına ameliyat öncesinde üç adet işlem uygulanmıştır:

1-) Tartılma ve kayıt alınması (Deney hayvanlarının ortalama ağırlıkları 45 kg olarak tespit edilmiştir.)

2-) Preoperatif profilaksi :

- Sefritriakson grubu antibiyotik (İsef, Flakon, 1g, İ. E. Ulugay İlaç) i.v. olarak bir saat önce bir doz ve her 12 saatte 1/2 doz uygulanmıştır.

- Diklofenak potasyum grubu NSAİ (Dicloran, Flakon, Deva İlaç) i.m. olarak bir saat önce bir doz uygulanmıştır.

3-) Opere edilmesi düşünülen bölgelerin üstündeki tüylerinin traşlanması ve bir antiseptikle (Betadin) silinmiştir.

3.1.3. Genel Anestezi

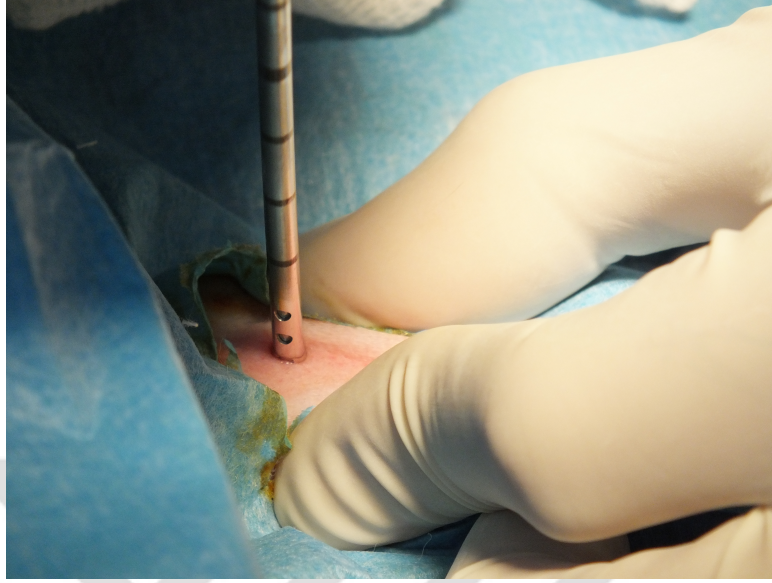
Deney hayvanlarının ortalama ağırlıkları 40-45 kg olarak seçilmiştir. Hayvanlar barınaklardan yardımcı personel tarafından ameliyathaneye taşınmış ardından operasyona başlanmıştır. Pre-anestezik olarak xylazine (Rompun, 0.2-0.5 mg/kg i.m., Bayer, Almanya) kullanımının ardından damar yolu açılmıştır. Ketamin hidroklorürün (Ketalar, 5mg/kg Flakon, Eczacıbaşı) intravenöz uygulanmasıyla ön anestezi sağlanmış ve hayvanlar entübe edilmiştir. Entübasyon sonrasında ise % 3.5'luk isofluran (Forane, Abbott) induksiyon amacıyla ve ardından % 1.5'luk isofluran idame dozu olarak kullanılmış ve bu şekilde denekler genel anesteziye alınmışlardır.

3.1.4. Cerrahi Aşama:

Genel anesteziye alınan deney hayvanlarından greftleme sürecine geçilmeden önce kemik iliği kaynaklı kök hücre konsantrasyonun elde edilmesi için kemik iliği aspirasyonu gerçekleştirilmiştir ve kullanılan kitin firmasının talimatlarına uygun olarak aspire edilen ilik işlenmiştir (HarvesBMAC, Harvesttech, USA). Firmanın talimatlarına uygun olarak steril kişi tarafınca;

1. Heparin (25000 unit/ml) x 2 adet / NaCl (% 0.9) 30ml; toplam solüsyon setteki yerine dökülmüştür.
2. Grup 1 ve Grup 2 deki tüm enjektörler heparin ile 2 kez yıkanmıştır. (Enjektörlere bir miktar solüsyon çekildi çalkalandı ve geri bırakıldı).
3. 4 ml ACD-A solüsyonunu torbaya aktarılmıştır (kırmızı iğne başlığı ile), elle masaj yapar gibi dağıtılmıştır.

4. Deney hayvanlarından aspirasyon yeşil başlık kullanılarak başlatılmıştır, mavi ile derinleştirilmiştir (küt uclu).



Resim 3-1 Kemik iliğine ulaşılması ve aspirasyona başlanması

5. 30ml VacLok takılarak kademesi ayarlanarak beklenmiştir, 30 ml tamamlanana kadar bu işlem tekrarlanmıştır.



Resim 3-2 Gerekli aspirasyonun elde edilmesi

6. Alınan kemik iliği torbaya eklenmiştir. Elle masaj yaparak dağıtılmıştır.

7. İkinci 30ml VacLok takılmıştır, kademesi ayarlanmıştır ve 30 ml kemik iliği çekilene kadar beklenmiştir.
8. Alınan kemik iliği torbaya ilave edilmiştir.
9. Torbanın kilidi açılmıştır.
10. 60ml transfer şırıngası ile hazırlanan preparat (iğne takılarak) alınmıştır ve çalışma kartuşuna aktarılmıştır.



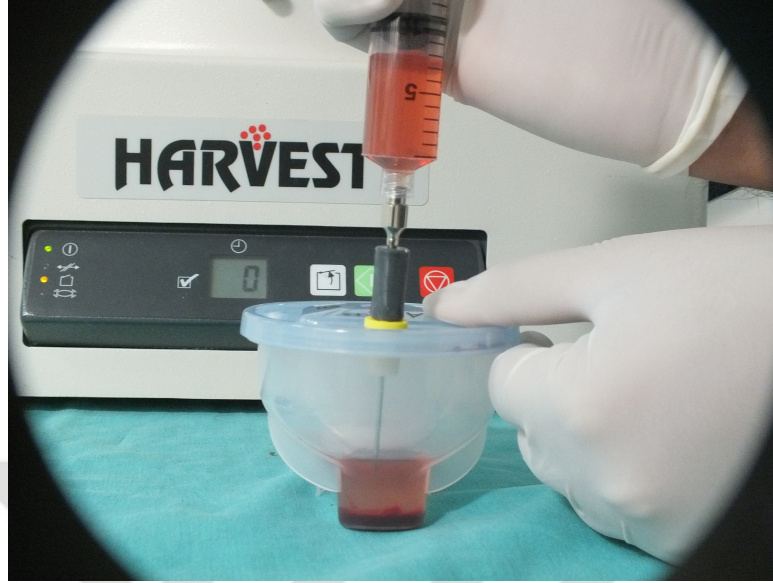
Resim 3-3 Elde edilen aspirasyonun kitin içine enjeksiyonu

11. SmartPrep2 cihazında 14 dk santrifuj edilmiştir.



Resim 3-4 SmartPrep2 cihazında santrifüj işleminin gerçekleştirilmesi

12. Kartuşun üst kısmında sarı uçlu enjektör ile plazma çekilmiştir, balon-hava kabarcığı oluncaya kadar çekmeye devam edilmiştir.



Resim 3-5 Santirifüj sonrası plazmanın mezenkimal kök hücre konsantrasyonundan uzaklaştırılması

13. Kalan plazma ve Stemcell (kök hücre) gümüş uçlu enjektör ile çekilmiştir ve birkaç kez çek-bırak işlemi tekrarlanmıştır.



Resim 3-6 Plazmanın uzaklaştırılmasından sonra kalan mezenkimal kök hücre konsantrasyonunun toplanması

14. Tüpteki başlık atılmıştır. Steril alanda steril tüpe aktarılmıştır.



Resim 3-7 Elde edilen plazma ve mezenkimal kök hücre konsantrasyonun uygulamaya hazır şekilde sıringada toplanması

15. Uygulama yapılacak bölgeye hazırlanan preparat aktarılmıştır.

Kemik iliği kaynaklı kök hücre konsantrasyonu hazırlanırken, işlem yapılacak deney hayvanının maxilla ve mandibulasına insizyon yapılarak (bkz. Resim 3-8) deri ve periostun ayrı ayrı kaldırılması sonrasında kemiğe ulaşılmıştır. Kemiğin rahatça görüldüğü geniş bir çalışma ortamı sağlandıktan sonra fizyodispensıra bağlı piyasamen 800 – 1000 devir /dak.'da steril serum fizyolojikle soğutma altında trafen frezle 5mm genişliğinde 3,6 mm derinliğinde dört adet defekt oluşturulmuştur (bkz. Resim 3-9).

Oluşturulan defektlere (alt ve üst çenenin herbirine);

1. Defekt (kontrol gurubu): Boş
2. Defekt: Yalnızca kemik iliği kaynaklı kök hücre konsantrasyonu (HarvesBMAC, Harvesttech, USA) (bkz. Resim 3-10)
3. Defekt: Sığır kaynaklı greft materyali (Bio-oss, Geistlich, İsviçre) ve kemik iliği kaynaklı kök hücre konsantrasyonu (HarvesBMAC, Harvesttech, USA) karışımı
4. Defekt (standart gurup): Sığır kaynaklı greft materyali (Bio-oss, Geistlich, İsviçre) (bkz. Resim 3-11)

olacak şekilde rastgele uygulanmıştır. Oluşturulan defek bölgelerinin üzeri membran (Bio-guide, Geistlich, İsviçre) ile örtülmüştür (bkz. Resim 3-12). Deri altı dokusu 2.0

Vicryl ile deri ise 0 numara Polipropilen ile ayrı ayrı sturlanarak insizyon hattı primer şekilde kapatılmıştır.



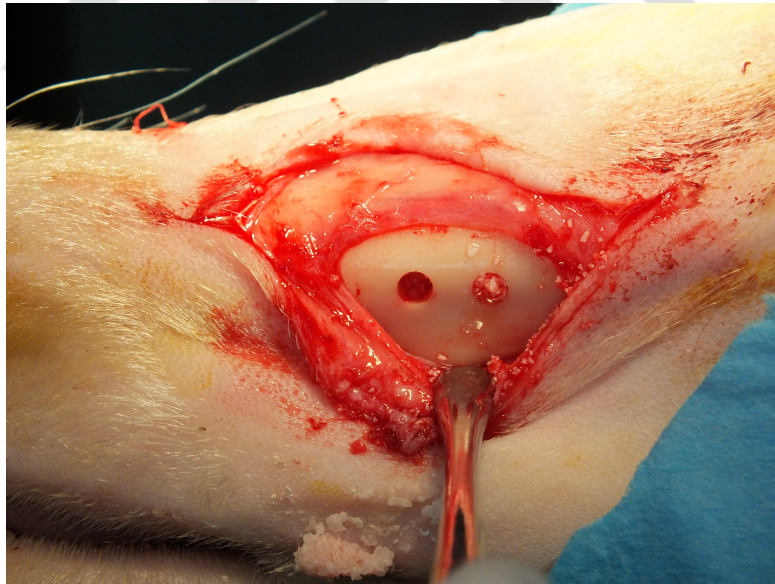
Resim 3-8 İnsizyonun yapılması



Resim 3-9 Periostun elevasyonundan sonra kemiğe ulaşılması ve fizyodispensera bağlı piyasamen 800 – 1000 devir /dak.'da steril serum fizyolojikle soğutma altında trafen frezle 5mm genişliğinde 3,6 mm derinliğinde defekt oluşturulması



Resim 3-10 Oluşturulan defek bölgelerine uygun preperatların uygulanması (mezenkimal kök hücre konsantrasyonu)



Resim 3-11 Oluşturulan defek bölgelerine uygun preperatların uygulanması (sığır kaynaklı greft materyali)



Resim 3-12 Hazırlanan preparatlar uygulandıktan sonra membranın yerleştirilmesi



Resim 3-13 Deri altı dokusu 2.0 Vicryl ile primer kapatılması

3.1.5. Sakrifikasyon

Deney hayvanlarının ikisi 15 inci günde, ikisi 30 uncu günde, diğer ikisi ise 45 inci günde sakrifiye edilmiştir. Hayvanlara ksilazin ve ketamin ile anestezi uygulandıktan sonra İ.V. olarak pentothal sodium %10 'luk solüsyonundan 50 mg/kg

dozunda kullanılarak ötanazi uygulanmıştır. Bu işlem sonrasında tüm parçalar % 10'luk formol içeren kaplara koyulmuştur.

3.1.6. Ameliyat Ekibi ve Görev Dağılımı

Operasyonlar İ.Ü. Veterinerlik Fakültesi küçükbaş hayvan kliniklerinde tam sterilizasyon koşulunda daha önceden hazırlanan ekip tarafından gerçekleştirilmiştir. Ekipteki görev dağılımı şu şekilde sıralanılabilir:

- **Veteriner Cerrah:** Deney hayvanının genel anesteziye alınması, entubasyonu, her türlü ilaç ve genel anestezi uygulamaları, deri ve periostun kaldırılarak kemiğe ulaşılması, anestezi sırasında ve sonrasında deney hayvanının tüm genel sağlığının kontrolü
- **Diş Hekimleri:** Greft materyalinin hazırlanma prosedürü ve yerleştirilmesi, flaplerin kapatılması, tüm asistans, solunum cihazının kontrolü, yapılan işlemlerin fotoğraflanarak arşivlenmesi, kullanılan tüm ekipmanın temini ve sterilizasyonu,
- **Yardımcı Personel:** Ameliyat sırasında yapılan her tür işleme asistans, ameliyathanenin hazırlanması ve toplanması, solunum cihazının kontrolü, deney sonrası hayvanların post-operatif bakımları ve beslenmelerinin temini.

3.1.7. Histolojik Değerlendirme

Gönderilen materyal %10 luk tamponlanmış formalinde bir hafta süre ile fikse edildi. Fiksasyondan sonra tüm materyal %50 'lik formik asit ve %20 'lik sodyum sitrat çözeltilerinden birer ölçek alınarak hazırlanan solusyonda dekalsifiye edildi. Dekalsifiye parçalar rutin doku takibinden geçirildikten sonra hazırlanan parafin bloklardan elde edilen 5-7 mikron kalınlığındaki kesitler hematoxilen – eosin (H&E) yöntemiyle boyanıp ışık mikroskopunda (Olympus BX60) incelendi.

İnceleme sırasında 'Olympus Soft İmaging system analySIS FIVE (Tokyo Japan) görüntü analiz sistemi kullanıldı. İncelenen kesitler 400 büyütme altında tüm görüntü alanını kaplayan üçer saha alınarak digital görüntüler elde edildi. Bu alanlarda iltihap, nekroz, rezidüel kemik grefti, yabancı cisim reaksiyonu, fibrozis, membranöz ve kondral kemik yapımı göz önünde bulundurularak yeni kemik yapımının kapladığı

alanlar hesaplandı. Bu bulgulara bir büyük büyütme alanında kapladıkları bölgelerin yüzdesine göre %0 (-), % 5-30 (+), % 30-60 (++) ve % 60 < (+++) olmak üzere değer verildi. Kemik yapım değerlendirilmesinde ise Allen' in kırık iyileşmesi metodu kullanıldı.

3.1.8. İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Parametrelerin iki grup arası karşılaştırmalarında Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi ve Continuity (Yates) Düzeltmesi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

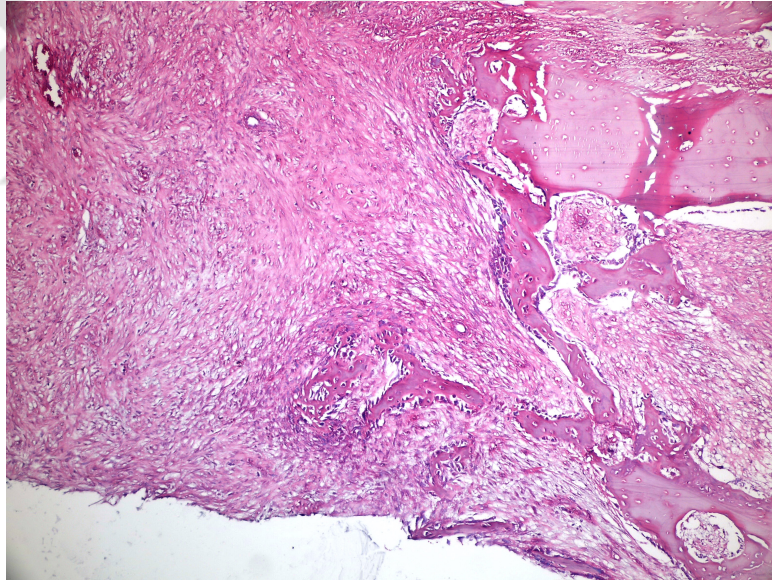
4. BULGULAR

Çalışmanın başından sakrifikasyon süresine kadar hiçbir hayvanda komplikasyona rastlanmamıştır. Altı deney hayvanında toplam 48 defekte histolojik inceleme yapılmıştır.

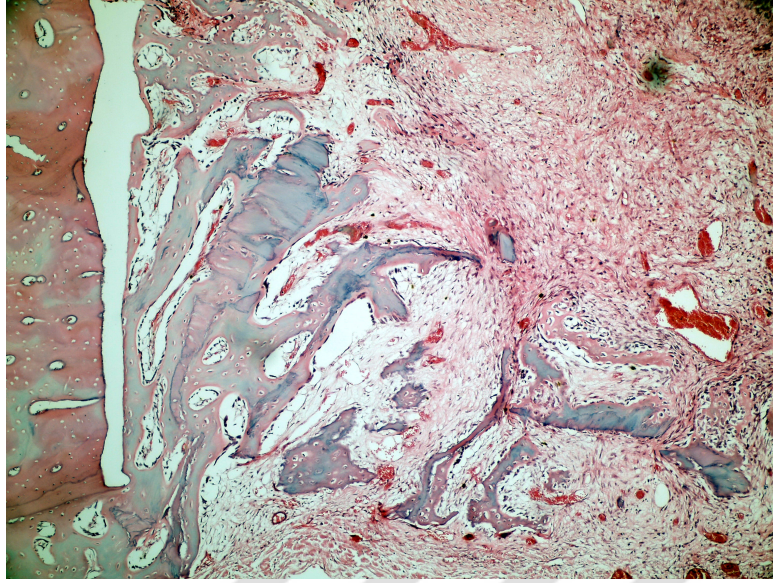
4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. Kontrol Grubu Histolojik Bulguları

Kontrol grubu olarak boş bırakılan defektlerin 15 inci gününde maxilla ve mandibular defektlerin her ikisinde de aktif fibröz bağ dokusu ile dolu olduğu ve yeni kemik trabeküllerinin defekt kenarlarında periost çevresinde oluşmaya başladığı ve defekt ortasına ilerlediği saptandı.

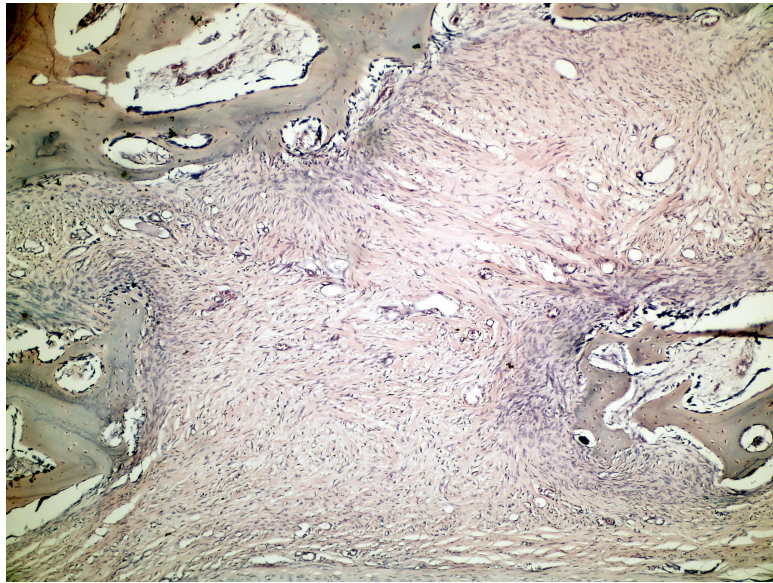


Resim 4-1 Maksilla 15. gün defekt bölgesinde genç mezenkim hücrelerinden oluşan aktif fibröz doku defect kenarında ince yeni kemik trabekülleri. (H&E $\times 100$)

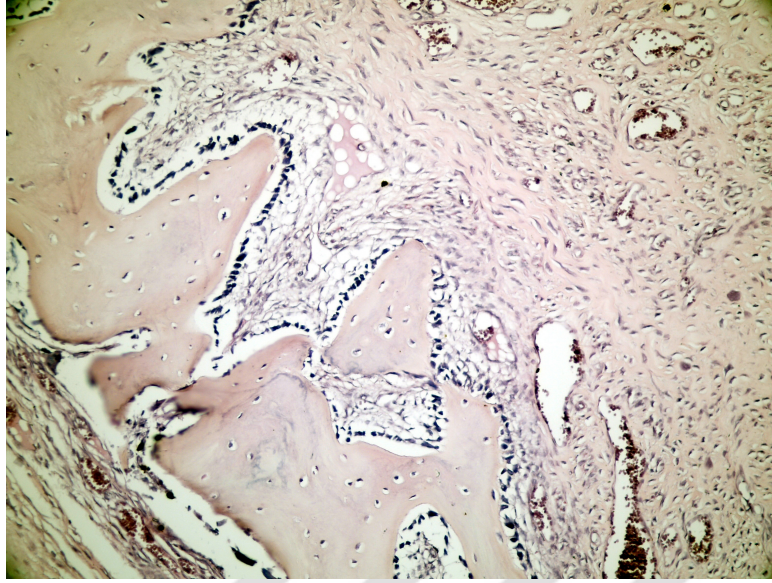


Resim 4-2 Mandibula 15. gün defekt bölgesinde fibröz doku içine yeni kemik trabekülleri (H&E ×100)

30 uncu günde fibröz bağ dokusunun içine kalınca yeni kemik trabekülleri oluştuğu ve birbirleri ile anastomozlar yaptıkları gözlenmiştir.

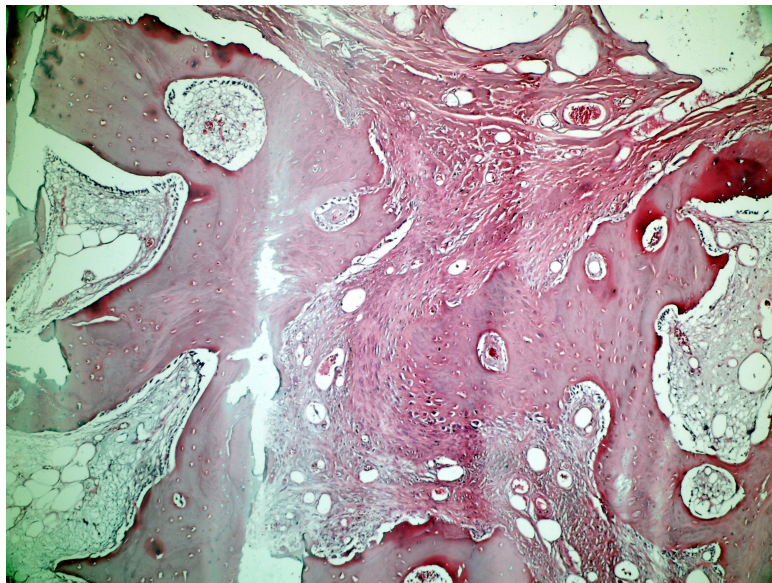


Resim 4-3 Maksilla 30. gün de defekt kenarlarından ilerleyen yeni kemik trabekülleri ve ortada aktif fibröz bağ dokusu (H&E ×100)

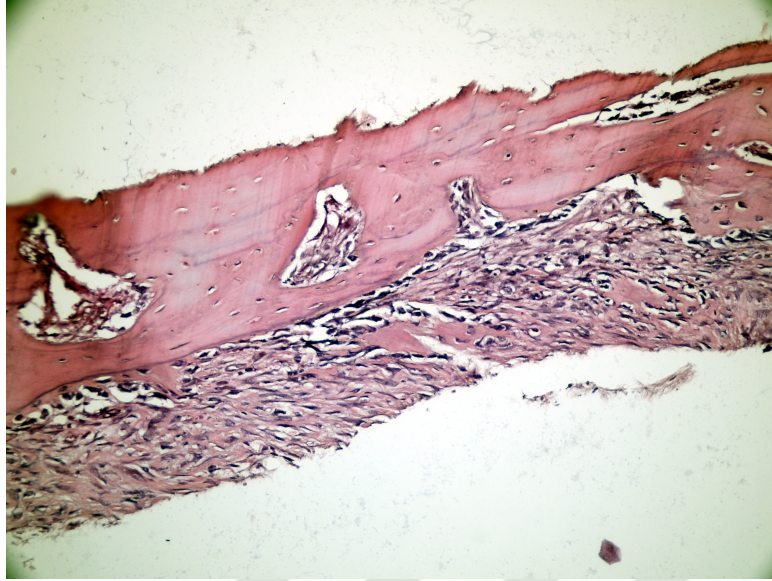


Resim 4-4 Mandibula 30. gün defekt bölgesinde fibröz bağ dokusu içinde kalınca yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 200$)

45 inci günde defektler hemen hemen tamamı ile yeni kemik dokusu ile dolmuştur. Maksilla defektleri daha trabeküler yapıda kemik dokusu içerirken, mandibula defektleri daha kompakt, kortikal kemik ile kapanmıştır.



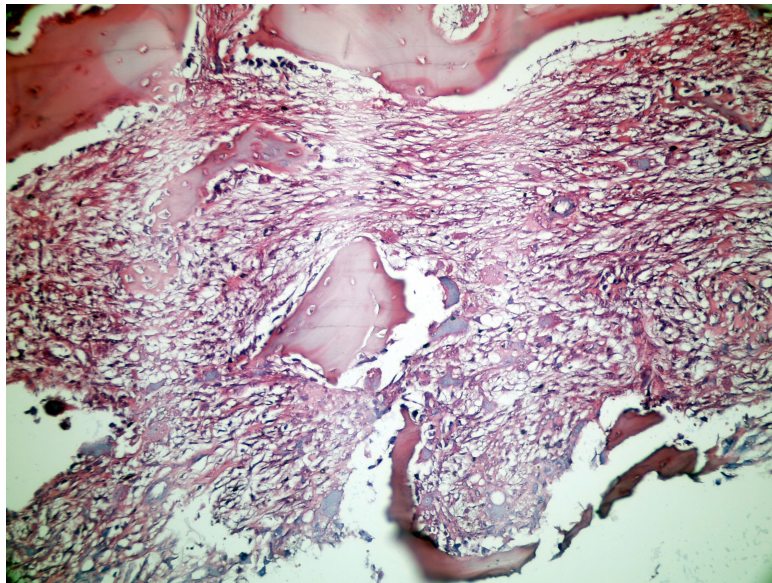
Resim 4-5 Mandibula 45. günde defekt alanı büyük ölçüde dolduran yeni kemik dokusu ve arada ince band biçiminde varlığını sürdüren fibröz doku gözlemlenmiştir. (H&E $\times 100$)



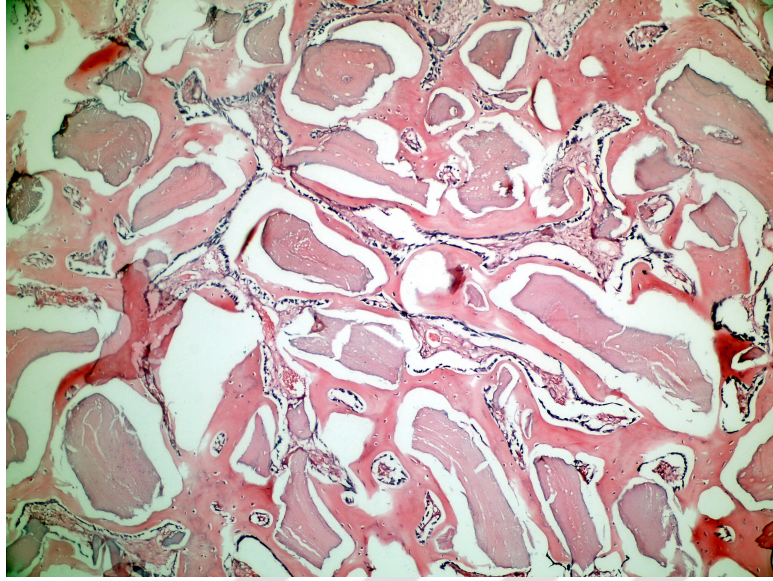
Resim 4-6 Maksilla 45. günde defekt bölgesini örten köprü biçiminde kemik yapımı ve altında fibröz bağ dokusu saptanmıştır. (H&E $\times 200$)

4.1.2. Bio-oss Uygulanan Defektlerin Histolojik Bulguları

15 inci günde defektlerde aktif fibröz doku içerisinde rezidüel greft materyali ile dolu olduğu saptanmıştır. Maksillar defektte, defekt kenarlarından ilerleyen az sayıda ince kemik trabekülleri görülürken, mandibula defektinde kemik trabekülleri greft materyallerini çevreler tarzda ve daha fazla olarak görüldü.

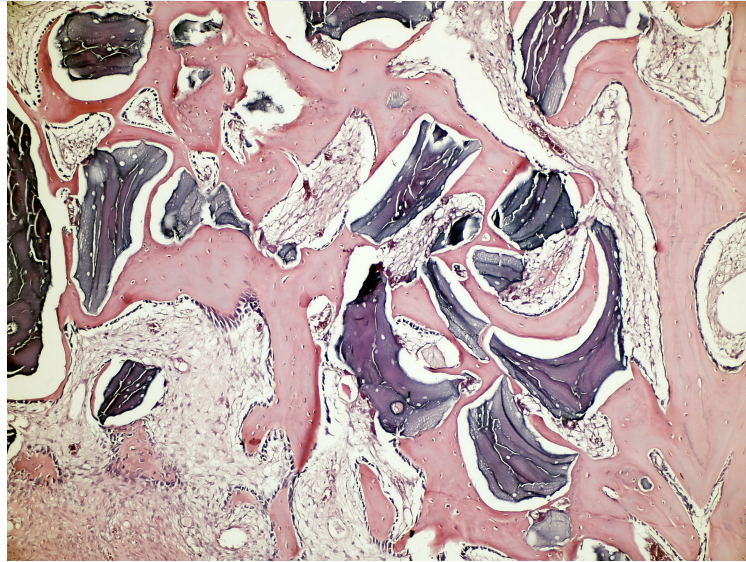


Resim 4-7 Maksilla 15. günde Bio-oss uygulanan kemik defekt bölgesinde aktif fibröz bağ dokusu içinde rezidüel greft materyalleri (H&E $\times 200$)

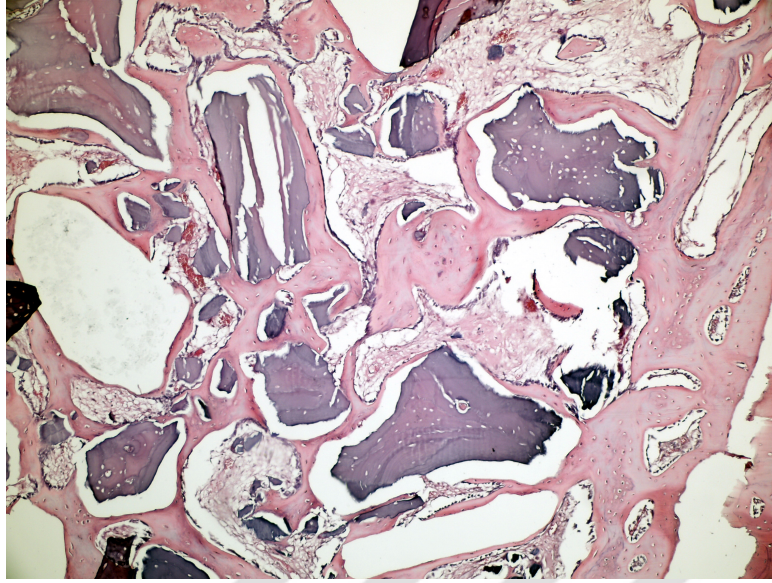


Resim 4-8 Mandibular 15. gün Bio-oss uygulanan defekt bölgesinde fibröz doku içinde greft materyalleri çevresinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$)

30 uncu gün sığır kaynaklı kemik greft materyali uygulanan grupta her iki çenede de greft materyalini çevreleyen yeni kemik trabekülleri saptanmaktadır.

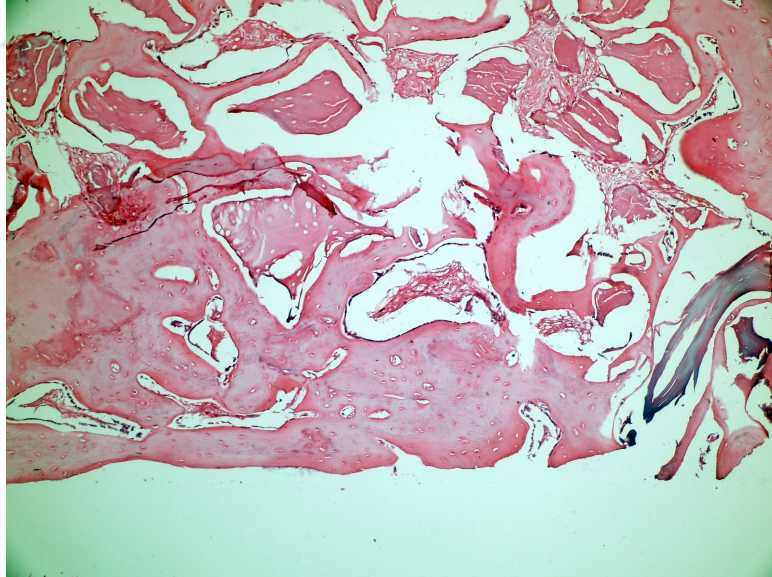


Resim 4-9 Maksilla 30. gün defekt bölgesinde fibröz doku içinde greft materyali çevresinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$)

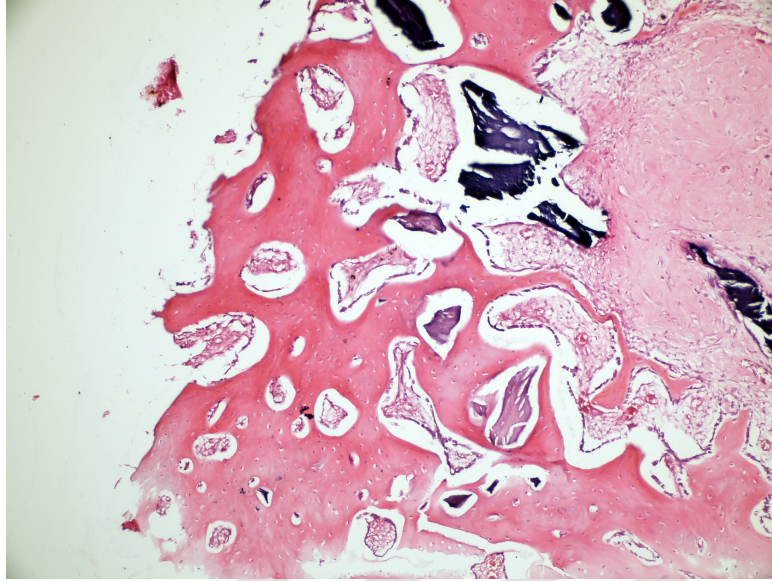


Resim 4-10 Mandibula 30. gün defekt bölgesinde yeni kemik trabekülleri arasında rezidüel greft materyalleri (H&E ×100)

45 günlük gruplarda mandibulada daha belirgin olmak üzere defekt bölgesi kemik dokusu ile dolmuştur. Fakat oluşan yeni kemik alanı içindeki rezidüel greft materyalleri dikkati çekmektedir.



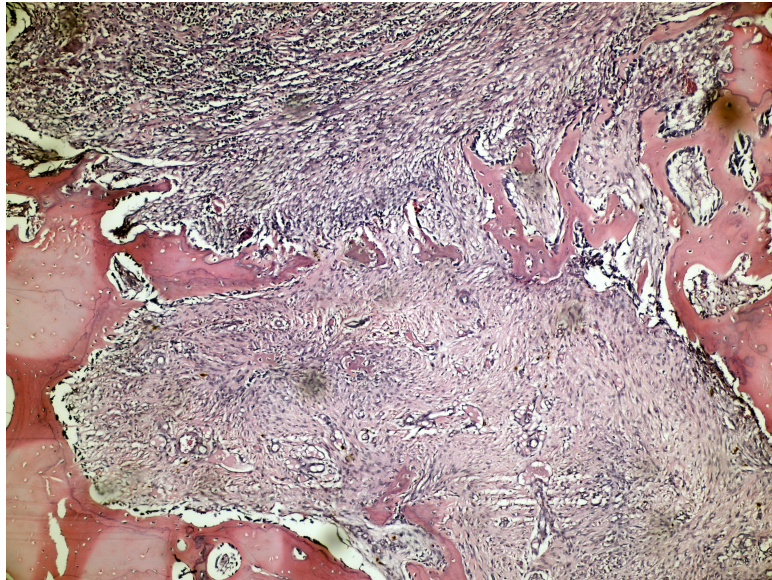
Resim 4-11 Maksillar 45. gün defekt bölgesini dolduran yeni kemik yapımı arasında rezidüel greft materyali (H&E ×100)



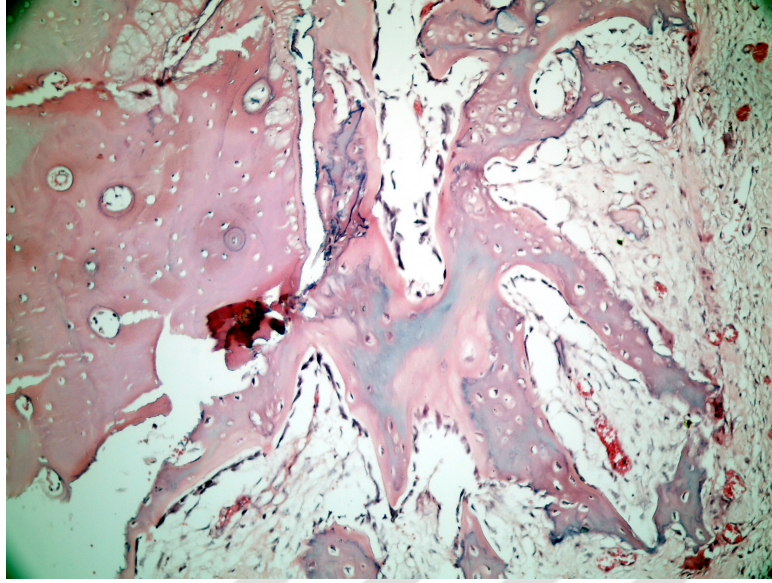
Resim 4-12 Madibula 45. gün defekt bölgesini dolduran trabeküler kemik dokusu arasında rezidüel greft materyali (H&E $\times 100$)

4.1.3. Mezenkimal Kök Hücre Konsantrasyonu Uygulanan Defektlerin Histolojik Bulguları

Mezenkimal kök hücre konsantrasyonu uygulanan defektlerin 15 inci gününde gruplarda defekti dolduran fibröz bağ dokusu içinde ince kemik trabekülleri görülmektedir.

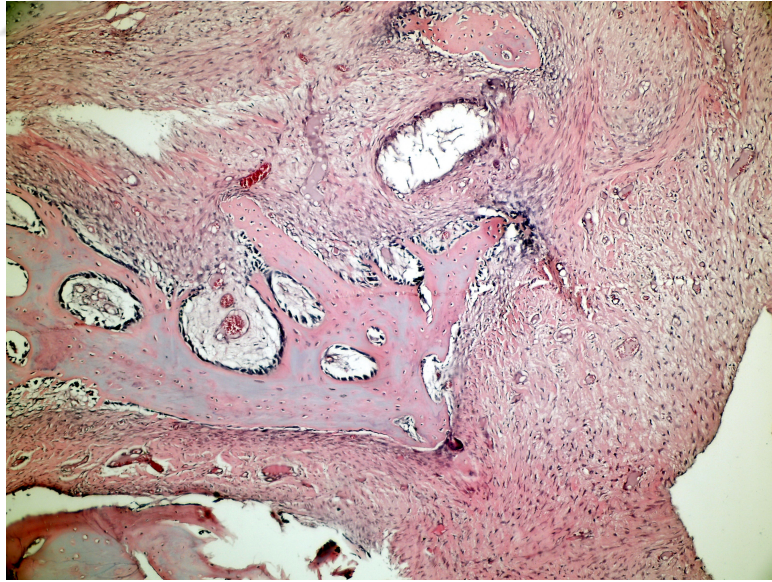


Resim 4-13 Mandibula mezenkimal kök hücre konsantrasyonu uygulanan defekt bölgesinde aktif fibröz doku içinde ince kemik trabekülleri (H&E $\times 100$)

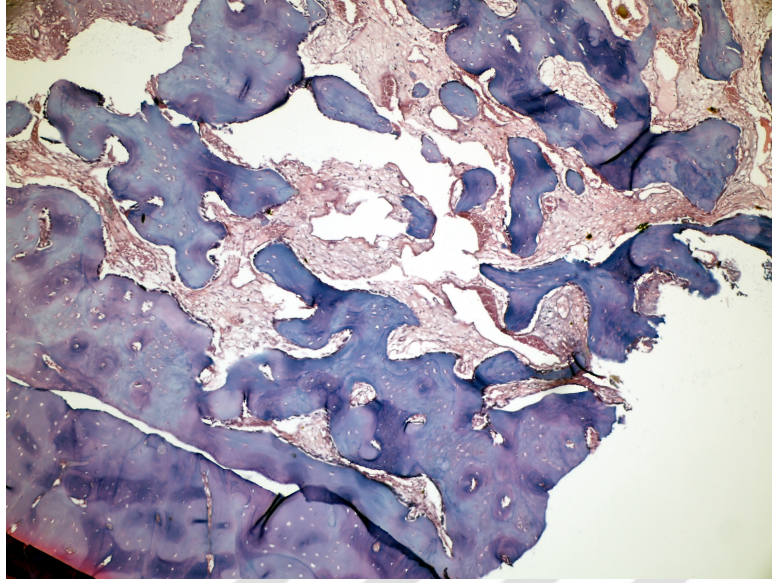


Resim 4-14 Maksilla 15.gün defekt bölgesinde fibröz doku içinde defekt kenarlarından ilerleyen yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 200$)

30 uncu gün gruplarında fibröz doku içinde mandibulada daha belirgin olmak üzere kalın kemik trabekülleri görülmektedir.

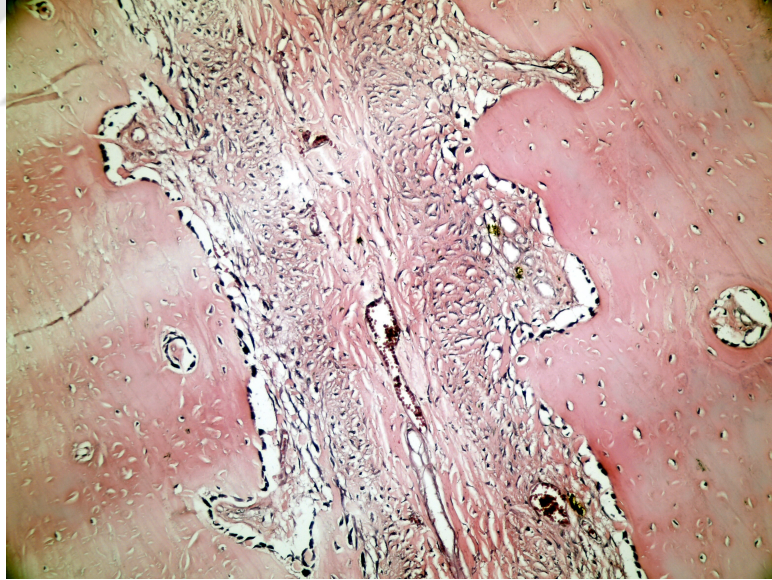


Resim 4-15 Maksilla 30. Gün defekt bölgesinde fibröz doku içinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$)

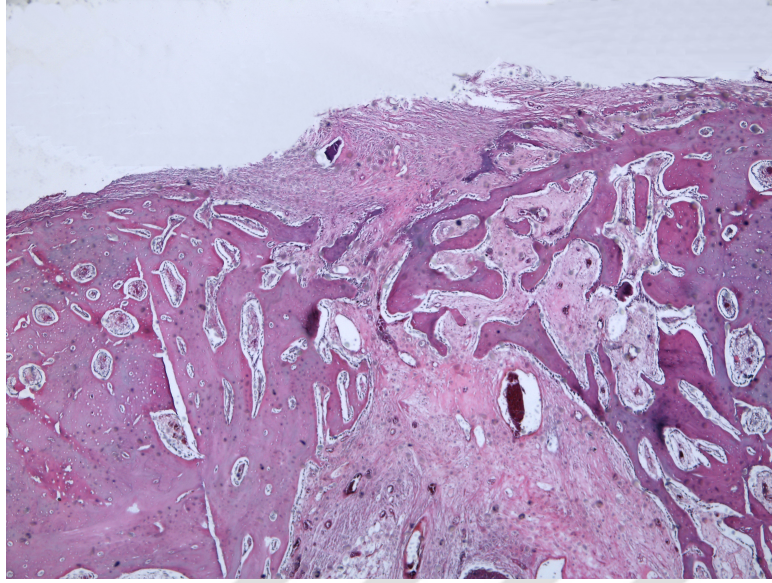


Resim 4-16 Mandibula 30. gün defekt bölgesinde amastomozlar yapan trabeküler yeni kemik dokusu arasında fibröz bağ dokusu (H&E $\times 100$)

45 inci günde defekt bölgelerinde büyük oranda yeni kemik yapımı ile dolmuş durumdadır. Arada ince fibröz doku varlığını sürdürmektedir.



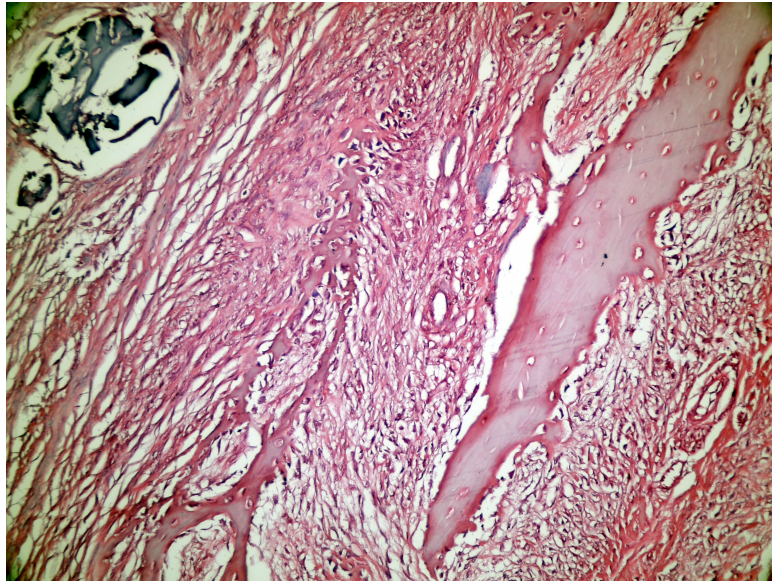
Resim 4-17 Maksilla 45. günde defekt bölgesini büyük oranda dolduran yeni kemik dokusu arasında varlığını sürdüren ince fibröz doku (H&E $\times 200$)



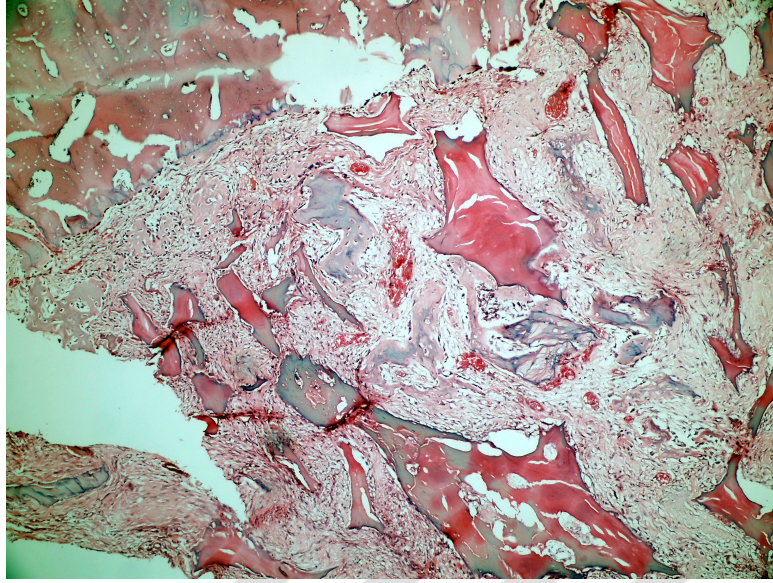
Resim 4-18 Mandibula 45. gün defekt bölgesini büyük ölçüde kapatan kemik yapımı arasında fibröz bağ dokusu (H&E ×100)

4.1.4. Bio-oss ve Mezenkimal Kök Hücre Konsantrasyonun Kombine Uygulandığı Defektlerin Histolojik Bulguları

Bio-oss ve mezenkimal kök hücre konsantrasyonun kombine kullanıldığı grubun 15 inci gün histolojisi incelendiğinde defekt bölgesinde fibröz doku içinde greft materyali ince kemik trabekülleri saptanmaktadır.



Resim 4-19 Maksilla Bio-oss ve mezenkimal kök hücre konsantrasyonu kombine kullanıldığı 15. gün defect bölgesinde fibröz bağ dokusu içinde ince ve yeni kemik trabekülleri ve greft materyali (H&E ×200)

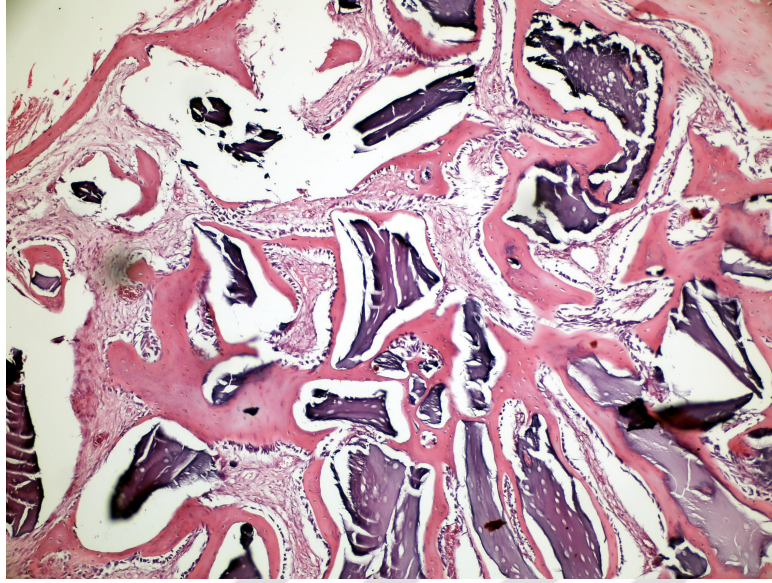


Resim 4-20 Mandibulla 15. gün defect bölgesinde fibröz bağ dokusu içinde greft materyali ve ince yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$)

30 uncu gün defektlerinde fibröz doku içinde greft materyali çevresinde materyali çevreleyen yeni kemik trabekülleri görülmektedir.

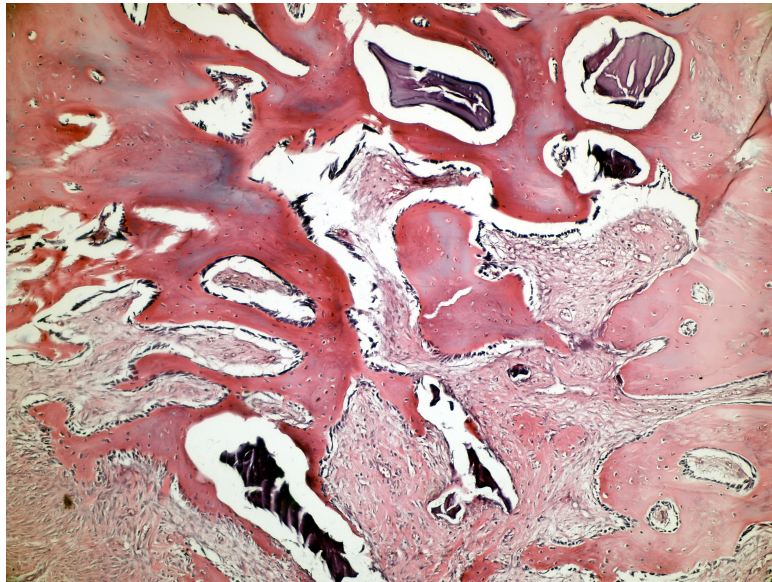


Resim 4-21 Maksillar defect bölgesinde fibröz doku içinde greft materyali ve çevresinde yeni kemik trabekülleri (H&E $\times 100$)

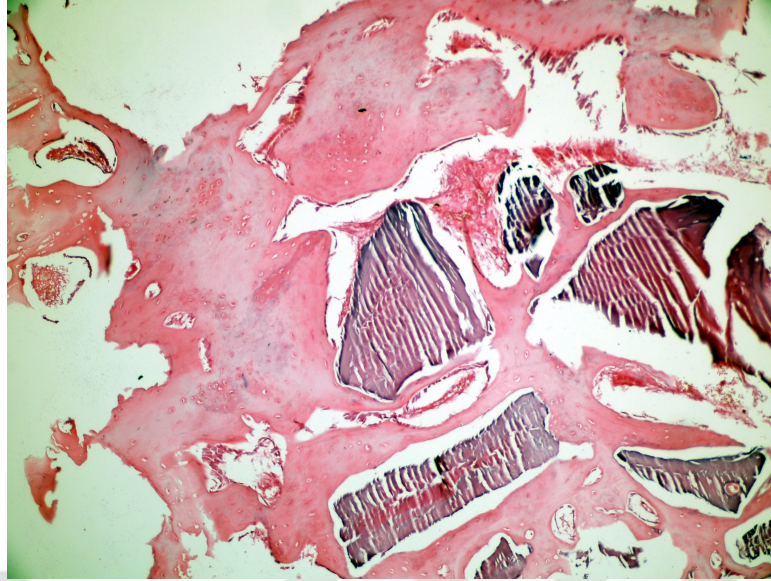


Resim 4-22 Mandibula 30. gün defect bölgesinde defekti dolduran yeni kemik trabekülleri yeni kemik trabekülleri ile çevrelenen greft materyalleri ve arada fibröz bağ dokusu (H&E $\times 100$)

45 inci gün gruplarında 15 ve 30 uncu günlerde görülen kemik trabeküllerinin daha genişlediği saptanmıştır. Grupların hiçbirinde nekroz, iltahap, yabancı cisim reaksiyonu görülmemiştir.



Resim 4-23 Maksilla 45. gün defekti dolduran yeni kemik dokusu arasında rezidüel kemik materyali (H&E $\times 100$)



Resim 4-24 Mandibula 45. gün defect bölgesini dolduran kalın kemik trabekülleri arasında rezidüel greft materyali (H&E ×100)

4.2. Histomorfometrik Bulgular

Tablo 1: Fibrozis değerlendirilmesi

	BOS	Bioss	Kök Hücre	Bioss+Kök Hücre	
Fibrozis	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	p
Maksilla					
15.Gün	3±0 (3)	2±0 (2)	3±0 (3)	3±0 (3)	0,002**
30.Gün	2,5±0,58 (2,5)	2±0 (2)	2±0 (2)	2±0 (2)	0,093
45.Gün	2±0 (2)	2±0 (2)	2±0 (2)	2±0 (2)	1,000
p	0,026*	1,000	0,004**	0,004**	
Mandibula					
15.Gün	3±0 (3)	2,5±0,58 (2,5)	2±0 (2)	2±0 (2)	0,012*
30.Gün	3±0 (3)	2±0 (2)	2±0 (2)	1±0 (1)	0,002**
45.Gün	3±0 (3)	1±0 (1)	1±0 (1)	0,5±0,58 (0,5)	0,005**
p	1,000	0,009**	0,004**	0,009**	

Kruskal-Wallis Testi

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Tablo 1a: Grupların ikili değerlendirme sonuçları

Fibrozis	15. gün	30. gün	45. gün
	p	p	p
Maksilla			
BOS/ Bioss	0,008**	0,127	1,000
BOS/ Kök Hücre	1,000	0,127	1,000
BOS/ Bioss+Kök Hücre	1,000	0,127	1,000
Bioss/ Kök Hücre	0,008**	1,000	1,000
Bioss/ Bioss+Kök Hücre	0,008**	1,000	1,000
Kök Hücre/ Bioss+Kök Hücre	1,000	1,000	1,000
Mandibula			
BOS/ Bioss	0,127	0,008**	0,008**
BOS/ Kök Hücre	0,008**	0,008**	0,008**
BOS/ Bioss+Kök Hücre	0,008**	0,008**	0,013*
Bioss/ Kök Hücre	0,127	1,000	1,000
Bioss/ Bioss+Kök Hücre	0,127	0,008**	0,127
Kök Hücre/ Bioss+Kök Hücre	1,000	0,008**	0,127
<i>Mann Whitney U test</i> ** $p<0.01$ * $p<0.05$			

Maksillada,

Grupların 15.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.002$; $p<0.01$) (Tablo 1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Bioss grubunun 15.gün fibrozis görülmesi düzeyi, Boş, Kök hücre ve Bioss+Kök hücre gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Diğer gruplar arasında 15. gün fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 1a).

Gruplar arasında 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1).

Mandibulada,

Grupların 15.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.012$; $p<0.05$) (Tablo 1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Boş grubunun 15.gün fibrozis düzeyi, Kök hücre ve BioSS+Kök hücre gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Diğer gruplar arasında 15.gün fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 1a).

Grupların 30.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.002$; $p<0.01$) (Tablo 1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Boş grubunun 30.gün fibrozis görülmesi düzeyi, BioSS, Kök hücre ve BioSS+Kök hücre gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Kök hücre grubunun 30.gün fibrozis düzeyi, BioSS ve BioSS+Kök hücre gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). BioSS ve BioSS+Kök hücre gruplarının 30.gün fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 1a).

Grupların 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.005$; $p<0.01$) (Tablo 1). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Boş grubunun 45.gün fibrozis düzeyi, BioSS, Kök hücre ve BioSS+Kök hücre gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p_1:0.008$, $p_2:0.008$, $p_3:0.013$; $p<0.01$, $p<0.05$). Diğer gruplar arasında 45.gün fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 1a).

Tablo 1b: Günlerin ikili değerlendirme sonuçları

Fibrozis	BOS	BioSS	Kök Hücre	BioSS+Kök Hücre
	p	p	p	p
Maksilla				
15.gün-30. gün	0,127	1,000	0,008**	0,008**
15.gün-45. gün	0,008**	1,000	0,008**	0,008**
30.gün-45. gün	0,127	1,000	1,000	1,000

Mandibula				
15.gün-30. gün	1,000	0,127	1,000	0,008**
15.gün-45. gün	1,000	0,013*	0,008**	0,013*
30.gün-45. gün	1,000	0,008**	0,008**	0,127
<i>Mann Whitney U test</i>				
	<i>*p<0.05</i>	<i>**p<0.01</i>		

Maksillada;

BOŞ Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.026$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün fibrozis düzeyi, 45.günden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Diğer günler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1b).

Bioss Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:1.000$; $p>0.05$).

Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün fibrozis düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.günler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1b).

Bioss+Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün fibrozis düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.günler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1b).

Mandibulada;

BOŞ Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:1.000$; $p>0.05$) (Tablo 1).

Bioss Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.009$; $p<0.01$) (Tablo 1).

Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 45.gün fibrozis düzeyi, 15.gün ve 30.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p_1:0.013$; $p_2:0.008$; $p<0.05$ $p<0.01$). 15.gün ve 30.günler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1b).

Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 1). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 45.gün fibrozis düzeyi, 15.gün ve 30.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 15.gün ve 30.günler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1b).

Bioss+Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.009$; $p<0.01$) (Tablo 1). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün fibrozis düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ($p_1:0.008$; $p_2:0.013$; $p<0.01$ $p<0.05$). 30.gün ve 45.günler arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 1b).

Tablo 2: Kemik yapımı değerlendirilmesi

Kemik Yapımı	BOS	Bioss	Kök Hücre	Bioss+Kök Hücre	p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Maksilla					
15.Gün	1±0 (1)	1±0 (1)	2±0 (2)	1,5±0,58 (1,5)	0,012*
30.Gün	2,5±0,58 (2,5)	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	0,093
45.Gün	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
p	0,009**	0,004**	0,004**	0,005**	
Mandibula					
15.Gün	2±0 (2)	2,5±0,58 (2,5)	2±0 (2)	2±0 (2)	0,093
30.Gün	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
45.Gün	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
p	0,004**	0,111	0,004**	0,004**	
Kruskal-Wallis Testi	**p<0.01	*p<0.05			

Tablo 2a: : Grupların ikili değerlendirme sonuçları

Kemik Yapımı	15. gün	30. gün	45. gün
	p	p	p
Maksilla			
BOS/ Bioss	1,000	0,127	1,000
BOS/ Kök Hücre	0,008**	0,127	1,000
BOS/ Bioss+Kök Hücre	0,127	0,127	1,000
Bioss/ Kök Hücre	0,008**	1,000	1,000
Bioss/ Bioss+Kök Hücre	0,127	1,000	1,000
Kök Hücre/ Bioss+Kök Hücre	0,127	1,000	1,000
Mandibula			
BOS/ Bioss	0,127	1,000	1,000
BOS/ Kök Hücre	1,000	1,000	1,000
BOS/ Bioss+Kök Hücre	1,000	1,000	1,000
Bioss/ Kök Hücre	0,127	1,000	1,000
Bioss/ Bioss+Kök Hücre	0,127	1,000	1,000
Kök Hücre/ Bioss+Kök Hücre	1,000	1,000	1,000
<i>Mann Whitney U test **p<0.01</i>			

Maksillada;

Grupların 15.gün görülen kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.012; p<0.05) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Kök hücre grubunun 15.gün kemik yapımı düzeyleri, Boş ve Bioss gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur (p:0.008; p<0.01) (Tablo 2a). Diğer gruplar arasında 15.gün kemik yapımı düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 2a).

Grupların 30.gün ve 45.günlerdeki kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 2).

Mandibula çene tipinde,

Grupların 15.gün, 30.gün ve 45.günlerdeki kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2).

Tablo 2b: Günlerin ikili değerlendirme sonuçları

Kemik Yapımı	BOS	Bioss	Kök Hücre	Bioss+Kök Hücre
	p	p	p	p
Maksilla				
15.gün-30. gün	0,013*	0,008**	0,008**	0,013*
15.gün-45. gün	0,008**	0,008**	0,008**	0,013*
30.gün-45. gün	0,127	1,000	1,000	1,000
Mandibula				
15.gün-30. gün	0,008**	0,127	0,008**	0,008**
15.gün-45. gün	0,008**	0,127	0,008**	0,008**
30.gün-45. gün	1,000	1,000	1,000	1,000
<i>Mann Whitney U test</i>				
	* $p<0.05$	** $p<0.01$		

Maksillada;

BOŞ Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.009$; $p<0.01$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik yapımı düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p_1:0.013$; $p_2:0.008$; $p<0.05$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2b).

Bioss Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik yapımı düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2b).

Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik yapımı düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2b).

Bioss+Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.005$; $p<0.01$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik yapımı düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.013$; $p<0.05$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2b).

Mandibulada;

BOŞ Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik yapımı düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2b).

Bioss Grubunun; Grupların 15.gün, 30.gün ve 45.günlerdeki kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2).

Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik yapımı düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2b).

Bioss+Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 2). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik yapımı düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden

anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2b).

Tablo 3: Kemik iyileşmesi değerlendirilmesi

Kemik iyileşmesi	BOS	Bioss	Kök Hücre	Bioss+Kök Hücre	p
	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS (medyan)	
	(medyan)	(medyan)	(medyan)		
Maksilla					
15.Gün	0±0 (0)	0±0 (0)	2±0 (2)	1±0 (1)	0,002**
30.Gün	3±0 (3)	4±0 (4)	4,5±0,58 (4,5)	4±0 (4)	0,005**
45.Gün	4±0 (4)	5±0 (5)	5±0 (5)	5±0 (5)	0,002**
p	0,004**	0,004**	0,009**	0,004**	
Mandibula					
15.Gün	2±0 (2)	2,5±0,58 (2,5)	2±0 (2)	3±0 (3)	0,012*
30.Gün	3±0 (3)	4±0 (4)	5±0 (5)	5±0 (5)	0,002**
45.Gün	5±0 (5)	5±0 (5)	5,5±0,58 (5,5)	5,5±0,58 (5,5)	0,172
p	0,004**	0,005**	0,009**	0,009**	
Kruskal-Wallis Testi	*p<0.05	**p<0.01			

Tablo 3a: Grupların ikili değerlendirme sonuçları

Kemik İyileşmesi	15. gün	30. gün	45. gün
	p	p	p
Maksilla			
BOS/ Bioss	1,000	0,008**	0,008**
BOS/ Kök Hücre	0,008**	0,013*	0,008**
BOS/ Bioss+Kök Hücre	0,008**	0,008**	0,008**
Bioss/ Kök Hücre	0,008**	0,127	1,000
Bioss/ Bioss+Kök Hücre	0,008**	1,000	1,000
Kök Hücre/ Bioss+Kök Hücre	0,008**	0,127	1,000

Mandibula			
BOS/ BioSS	0,127	0,008**	1,000
BOS/ Kök Hücre	1,000	0,008**	0,127
BOS/ BioSS+Kök Hücre	0,008**	0,008**	0,127
BioSS/ Kök Hücre	0,127	0,008**	0,127
BioSS/ BioSS+Kök Hücre	0,127	0,008**	0,127
Kök Hücre/ BioSS+Kök Hücre	0,008**	1,000	1,000
<i>Mann Whitney U test</i>	<i>**p<0.01</i>	<i>*p<0.05</i>	

Maksillada,

Grupların 15.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.002$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Kök hücre grubunun 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, Boş, BioSS ve BioSS+Kök hücre gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$) (Tablo 3a). BioSS+Kök hücre grubunun 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, Boş ve BioSS gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Boş ve BioSS gruplarının 15.gün kemik iyileşmesi düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3a).

Grupların 30.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.005$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Boş grubunun 30.gün kemik iyileşmesi düzeyi, BioSS, Kök hücre ve BioSS+Kök hücre gruplarından anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p_1:0.008$, $p_2:0.013$, $p_3:0.008$; $p<0.01$, $p<0.05$). Diğer gruplar arasında 30.gün kemik iyileşmesi düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 3a).

Grupların 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.002$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Boş grubunun 45.gün kemik iyileşmesi düzeyi, BioSS, Kök hücre ve BioSS+Kök hücre gruplarından anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Diğer gruplar arasında 45.gün

kemik iyileşmesi düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 3a).

Madibulada,

Grupların 15.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.012$; $p<0.05$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Bioss+Kök hücre hücre grubunun 15.gün kemik iyileşmesi düzeyleri, Boş ve Kök hücre gruplarından anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$, $p<0.01$) Diğer gruplar arasında 15.gün kemik iyileşmesi düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (Tablo 3a).

Grupların 30.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.002$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; Boş grubunun 30.gün kemik iyileşmesi düzeyleri, Bioss, Kök hücre ve Bioss+Kök hücre gruplarından anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Bioss hücre grubunun 30.gün kemik iyileşmesi düzeyleri, Kök hücre ve Bioss+Kök hücre gruplarından anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). Kök hücre ve Bioss+Kök hücre gruplarının 30.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3a).

Grupların 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p:0.172$; $p>0.05$) (Tablo 3).

Tablo 3b: Günlerin ikili değerlendirme sonuçları

Kemik İyileşmesi	BOS	Bioss	Kök Hücre	Bioss+Kök Hücre
	p	p	p	p
Maksilla				
15.gün-30. gün	0,008**	0,008**	0,013*	0,008**
15.gün-45. gün	0,008**	0,008**	0,008**	0,008**
30.gün-45. gün	0,008**	0,008**	0,127	0,008**

Mandibula				
15.gün-30. gün	0,008**	0,013*	0,008**	0,008**
15.gün-45. gün	0,008**	0,013*	0,013*	0,013*
30.gün-45. gün	0,008**	0,008**	0,127	0,127
<i>Mann Whitney U test</i>	<i>*p<0.05</i>	<i>**p<0.01</i>		

Maksillada;

BOŞ Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 45.günden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$) (Tablo 3b).

Bioss Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 45.günden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$) (Tablo 3b).

Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.009$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p_1:0.013$, $p_2:0.008$; $p<0.05$, $p<0.01$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3b).

Bioss+Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 45.günden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$) (Tablo 3b).

Mandibulada;

BOŞ Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.004$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 45.günden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$) (Tablo 3b).

Bioss Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.005$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.013$; $p<0.05$). 30.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 45.günden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$) (Tablo 3b).

Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.009$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p_1:0.008$, $p_2:0.013$; $p<0.01$, $p<0.05$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3b).

Bioss+Kök Hücre Grubunun; 15.gün, 30.gün ve 45.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.009$; $p<0.01$) (Tablo 3). Anlamlılığın hangi günlerden kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; 15.gün kemik iyileşmesi düzeyi, 30.gün ve 45.günlerden anlamlı şekilde düşük bulunmuştur ($p_1:0.008$, $p_2:0.013$; $p<0.01$, $p<0.05$). 30.gün ve 45.gün arasında anlamlı bir farklılık bulunamamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3b).

Tablo 4: Residüel greft değerlendirilmesi

Resüdel Greft	BOS	Bioss	Kök Hücre	Bioss+Kök Hücre	p
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Maksilla					
15.Gün	0 (%)0	4 (%)100	0 (%)0	4 (%)100	0,001**
30.Gün	0 (%)0	4 (%)100	0 (%)0	4 (%)100	0,001**
45.Gün	0 (%)0	4 (%)100	0 (%)0	4 (%)100	0,001**

Mandibula					
15.Gün	0 (%0)	4 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0,001**
30.Gün	0 (%0)	4 (%100)	0 (%0)	0 (%0)	0,001**
45.Gün	0 (%0)	4 (%100)	0 (%0)	2 (%50)	0,008**
<i>Ki-kare Test **p<0.01</i>					

Maksillada;

Gruplar arasında 15.günde residüel greft görülme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). Boş ve kök hücre gruplarında 15.günde hiç residüel greft görülmezken, BioSS ve BioSS+Kök hücre gruplarının tamamında residüel greft görülmüştür.

Gruplar arasında 30.günde residüel greft görülme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). Boş ve kök hücre gruplarında 15.günde hiç residüel greft görülmezken, BioSS ve BioSS+Kök hücre gruplarının tamamında residüel greft görülmüştür.

Gruplar arasında 45.günde residüel greft görülme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). Boş ve kök hücre gruplarında 15.günde hiç residüel greft görülmezken, BioSS ve BioSS+Kök hücre gruplarının tamamında residüel greft görülmüştür.

Mandibulada;

Gruplar arasında 15.günde residüel greft görülme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). BioSS grubunun oranı, boş, kök hücre ve bioSS+kök hücre gruplarının oranlarından anlamlı düzeyde yüksektir.

Gruplar arasında 30.günde residüel greft görülme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). BioSS grubunun oranı, boş, kök hücre ve bioSS+kök hücre gruplarının oranlarından anlamlı düzeyde yüksektir.

Gruplar arasında 45.günde residüel greft görülme oranları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p:0.001; p<0.01). BioSS grubunun oranı, boş, kök hücre ve bioSS+kök hücre gruplarının oranlarından anlamlı düzeyde yüksektir.

Tablo 5: Maksilla ve mandibulaya göre fibrozis değerlendirmesi

Fibrozis	Maksilla		Mandibula	p
	Ort±SS (medyan)		Ort±SS (medyan)	
15.Gün				
BOS	3±0 (3)		3±0 (3)	1,000
Bioss	2±0 (2)		2,5±0,58 (2,5)	0,127
Kök Hücre	3±0 (3)		2±0 (2)	0,008**
Bioss+Kök Hücre	3±0 (3)		2±0 (2)	0,008**
30.Gün				
BOS	2,5±0,58 (2,5)		3±0 (3)	0,127
Bioss	2±0 (2)		2±0 (2)	1,000
Kök Hücre	2±0 (2)		2±0 (2)	1,000
Bioss+Kök Hücre	2±0 (2)		1±0 (1)	0,008**
45.Gün				
BOS	2±0 (2)		3±0 (3)	0,008**
Bioss	2±0 (2)		1±0 (1)	0,008**
Kök Hücre	2±0 (2)		1±0 (1)	0,008**
Bioss+Kök Hücre	2±0 (2)		0,5±0,58 (0,5)	0,013*
Mann-Whitney U Test	*p<0.05	**p<0.01		

Boş grupta; 15.gün ve 30.günlerde çenelere göre fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). 45.günde mandibulanın fibrozis düzeyi, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$).

Bioss grubunda; 15.gün ve 30.günlerde çenelere göre fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). 45.günde maksillanın fibrozis düzeyi, mandibuladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$).

Kök hücre grubunda; 15.günde maksillanın fibrozis düzeyi, mandibuladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.günde çenelere göre fibrozis düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık

bulunmamaktadır ($p>0.05$). 45.günde maksillanın fibrozis düzeyi, mandibuladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$).

Bioss+Kök hücre grubunda; 15.gün, 30.gün ve 45.günlerde maksillanın fibrozis düzeyi, mandibuladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p_1:0.008$; $p_2:0.008$; $p_3:0.013$; $p<0.01$; $p<0.05$).

Tablo 6: Maksilla ve mandibulaya göre kemik yapımı değerlendirilmesi

Kemik Yapımı	Maksilla	Mandibula	p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
15.Gün			
BOS	1±0 (1)	2±0 (2)	0,008**
Bioss	1±0 (1)	2,5±0,58 (2,5)	0,013*
Kök Hücre	2±0 (2)	2±0 (2)	1,000
Bioss+Kök Hücre	1,5±0,58 (1,5)	2±0 (2)	0,127
30.Gün			
BOS	2,5±0,58 (2,5)	3±0 (3)	0,127
Bioss	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
Kök Hücre	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
Bioss+Kök Hücre	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
45.Gün			
BOS	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
Bioss	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
Kök Hücre	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
Bioss+Kök Hücre	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000

Mann-Whitney U Test

* $p<0.05$

** $p<0.01$

Boş grupta; 15.günde mandibulanın yeni kemik yapımı düzeyi, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.günlerde çenelere göre yeni kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Bioss grubunda; 15.günde mandibulanın yeni kemik yapımı düzeyi, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.013$; $p<0.05$).

30.gün ve 45.günlerde çenelere göre yeni kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kök hücre grubunda; 15.gün, 30.gün ve 45.günlerde çenelere göre yeni kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Bioss+Kök hücre grubunda; 15.gün, 30.gün ve 45.günlerde çenelere göre yeni kemik yapımı düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 7: Maksilla ve mandibulaya göre kemik iyileşmesi değerlendirmesi

Kemik İyileşmesi	Maksilla		Mandibula	p
	Ort±SS (medyan)		Ort±SS (medyan)	
15.Gün				
BOS	0±0 (0)		2±0 (2)	0,008**
Bioss	0±0 (0)		2,5±0,58 (2,5)	0,013*
Kök Hücre	2±0 (2)		2±0 (2)	1,000
Bioss+Kök Hücre	1±0 (1)		3±0 (3)	0,008**
30.Gün				
BOS	3±0 (3)		3±0 (3)	1,000
Bioss	4±0 (4)		4±0 (4)	1,000
Kök Hücre	4,5±0,58 (4,5)		5±0 (5)	0,127
Bioss+Kök Hücre	4±0 (4)		5±0 (5)	0,008**
45.Gün				
BOS	4±0 (4)		5±0 (5)	0,008**
Bioss	5±0 (5)		5±0 (5)	1,000
Kök Hücre	5±0 (5)		5,5±0,58 (5,5)	0,127
Bioss+Kök Hücre	5±0 (5)		5,5±0,58 (5,5)	0,127

Mann-Whitney U Test

* $p<0.05$

** $p<0.01$

Boş grupta; 15.günde mandibulanın kemik iyileşmesi düzeyi, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 30.günde çenelere göre kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir

farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$). 45.günde mandibulanın kemik iyileşmesi düzeyi, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$).

Bioss grubunda; 15.günde mandibulanın kemik iyileşmesi düzeyi, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.013$; $p<0.01$). 30.gün ve 45.günlerde çenelere göre kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Kök hücre grubunda; 15.gün, 30.gün ve 45.günlerde çenelere göre kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Bioss+Kök hücre grubunda; 15.gün ve 30.günlerde mandibulanın kemik iyileşmesi düzeyi, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.008$; $p<0.01$). 45.günde çenelere göre kemik iyileşmesi düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 8: Totalde çenelere göre değerlendirmeler

		Maksilla	Mandibula	p
		Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Fibrozis	15.Gün	2,75±0,45 (3)	2,38±0,5 (2)	0,035*
	30.Gün	2,13±0,34 (2)	2±0,73 (2)	0,580
	45.Gün	2±0 (2)	1,38±1,02 (1)	0,009**
Yeni Kemik Yapımı	15.Gün	1,38±0,5 (1)	2,13±0,34 (2)	0,001**
	30.Gün	2,88±0,34 (3)	3±0 (3)	0,151
	45.Gün	3±0 (3)	3±0 (3)	1,000
Kemik iyileşmesi	15.Gün	0,75±0,86 (0,5)	2,38±0,5 (2)	0,001**
	30.Gün	3,88±0,62 (4)	4,25±0,86 (4,5)	0,146
	45.Gün	4,75±0,45 (5)	5,25±0,45 (5)	0,005**

Mann-Whitney U Test

** $p<0.01$

* $p<0.05$

Maksillanın 15.gün ve 45.günlerdeki fibrozis düzeyleri, mandibuladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p_1:0.035$; $p_2:0.009$; $p<0.05$;

$p<0.01$). Çenelere göre 30.gün fibrozis düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Mandibulanın 15.gündeki yeni kemik yapım düzeyleri, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p:0.001$; $p<0.01$). Çenelere göre 30.gün ve 45.günlerdeki yeni kemik yapımı düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Mandibulanın 15.gün ve 45.günlerdeki kemik iyileşmesi düzeyleri, maksilladan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p_1:0.001$; $p_2:0.005$; $p<0.01$). Çenelere göre 30.gün kemik iyileşmesi düzeyleri arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 9: Totalde çenelere göre residüel greft değerlendirilmesi

Residüel Greft	Maksilla	Mandibula	p
	n (%)	n (%)	
15.Gün	8 (%50)	4 (%25)	0,273
30.Gün	8 (%50)	4 (%25)	0,273
45.Gün	8 (%50)	6 (%37,5)	0,722

Continuity (yates) düzeltmesi

Çenelere göre 15.gün, 30.gün ve 45.günlerde residüel greft görülme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$)

5. TARTIŞMA

Yapılan çalışmada koyun çene kemiklerinde oluşturulan defektlere uygulanan greft materyali (Bio-oss), kök hücre konsantrasyonu (BMAC) ve greft materyali ile birlikte kök hücre konsantrasyonun kombine kullanımının yeni kemik yapında etkinliği değerlendirilmiştir.

Kök hücre basitce düşünüldüğünde yaşamın kaynağıdır. Vücudumuzda yaşlanan ve ölen hücrelerin yerlerine yenileri oluşturulmaktadır. Canlı vücudundaki bütün hücrelerin ilk ana hücresine kök hücre adı verilir ki bu hücreler de farklı hücrelere dönüşebilmektedir. Kök hücreler farklılaşma, kendini yenileme ve köklülük gibi karakteristik özelliklere sahiptirler.

Erişkin kök hücrelerden biri olan mezenkimal kök hücreler çeşitli hücre tiplerine farklılaşabilen multipotent stromal hücrelerdir. İnsan mezenkimal kök hücreleri rejeneratif tıp için umut verici bir hücre kaynağı olarak kabul edilir. Mezenkimal kök hücreler veya kemik iliği stromal kök hücreleri olarak adlandırılan bu öncül multipotent hücrelerin kıkırdak, kemik, kas, tendon, bağ ve yağ hücrelerine farklılaşabilme yeteneği vardır. Hücrelerin yüksek ex-vivo potansiyallinin olması bu hücrelerin tedavi edici bir araç haline getirmektedir.

Günümüzde kullanılan greft materyalleri ön görülebilirlikleri ve kullanılabilirlikleri açısından kabul görmüş olsalar da bütün greft materyallerinin kendisine özgü avantajları ve dezavantajları mevcuttur. Mesela otojen greftler altın standart olarak kabul edilmelerine rağmen hızlı rezorpsiyona uğramaktadırlar. Bu da yeni kemik oluşumu için gerekli olan çatinın gerektiğinden daha kısa sürede kaybolmasına yada yetersiz kalmasıyla sonuçlanabilmektedir. Allojen greft materyalleri ise gerekli apozisyon ve rezorbsiyon senkronunu gerçekleştiremediklerinden kullanıldıkları operasyonlarda oluşan yeni kemikte rezidüel kemik greftleri kalmasına ve böylece tam mağnası ile oluşan yeni kemikiğin homojen bir yapıya kavuşmasına engel olmaktadır. Bu iki farklı greftin avantajlarının aynı anda elde edilebilmesi için ise kombine kullanılmaları cerrahi işlemlerde gerçekleştirilmektedir. Fakat kombine kullanımlarında ise yeni kemik yapımı için gerekli hücrelerin çevre sağlıklı dokulardan göç etmesi beklenmekte ve uygulanan bölgenin çevresindeki sağlıklı kemiğin yetersiz

kalması durumunda ise istenen yeni kemik yapımının oluşmaması gerçekleşebilmektedir.

Bu durumlar göz önüne alındığında iyileşme sürecinin hızlı başlaması ve iyileşme sürecinde özellikle iyileşmeden sorumlu hücrelerin bölgede bulunmasını artırıcı yada tetikleyici bir takım rekonstrüktif işlemlerin allojenik greft materyalleri ile birlikte kullanımının gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Multipotent mezenkimal kök hücre konsantrasyonun içerdiği kemik hücrelerine farklılaşabilme ve damarlanmayı artırma kapasitesi allojenik greflerin yeni kemik yapımında ihtiyaç duydukları bu özellikleri tek başına veya kombine kullanımlarında karşılayabilecektir.

Jager ve ark. yaptıkları prospektif çalışmada yaşları 4 ile 87 arasında değişen 39 hastada 1cm × 1cm daha büyük lokal kemik defektlerinin iyileşmelerini incelemişlerdir. Kemik defektleri multipotent mezenkimal hücre konsantrasyonu ile porlu hidroksiapatit granülü veya domuz kollojen spongistanın kombine olarak kullanımı ile tedavi edilmiştir. İki bağımsız kişi tarafından defektler ikinci ve altıncı haftada, altıncı ve 12 inci ayda incelenmiştir. Sonuç olarak mezenkimal kök hücre konsantrasyonu ile hidroksiapatitin kombine kullanımının jelatin spongistan ile kullanımına göre kemik iyileşmesini hızlandırdığını ve arttırdığını saptamışlardır. Hidroksiapatit granüllerinin porlu yapısının içine mükemmelce uzanan yeni kemik yapımının mezenkimal kök hücre konsantrasyonun kemik yapımını provoke etme potansiyalinin bir sonucu olarak oluştuğunu kanıtladığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak hasta popülasyonunda mezenkimal kök hücre konsantrasyonu ile allogreftlerin kombine kullanımının otojen kemik ihtiyacını azaltabileceğine ve post operatif iyileşme sürecini kısaltabileceğine dikkat çekmişlerdir.⁵³

Jager ve arkadaşların yaptıkları çalışma ile çalışmamız korelasyon göstermektedir. Çalışmamızda aldığımız sonuçlara göre multipotent kök hücre konsantrasyonun tek başına uygulandığı kemik defektlerinde erken dönem ve sonrasında yeni kemik yapımı gözlenmektedir. Bunun sonucu olarak büyük defektlerde mezenkimal kök hücre konsantrasyonun uygulanması yeni kemik yapımı için gerekli olan otojen veya allojen greft materyali gereksinimini azaltabilecek bir uygulamadır. Ayrıca çalışmamızda gözlemlediğimiz mezenkimal kök hücre konsantrasyonun tek veya kombine uygulanması ile erken dönem kemikleşmenin gerçekleşmesi de yukarıda bahsedilen çalışma ile paralellik göstermektedir.

Hendrich ve arkadaşlar yapıları çalışmada mezenkimal kök hücre konsantrasyonu uygulamasının güvenilirliğini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında femur başı nekrozu, başka kemik bölgelerinde avasküler nekroz / kemik iliği ödemi, kemik kırıkları ve diğer defekleri bulunan toplam 101 hastayı incelemişlerdir. Mezenkimal kök hücre konsantrasyonu uygulanan hastalar ortalama 14 ay sonra klinik, radyografik ve sözlü olarak kontrol edilmiştir. İki hastanın ileri cerrahiye gereksinim duyduklarını ve sözlü olarak 84 hastanın operasyon sonucunda memnun veya çok memnun, 7 tanesinin ise orta derece memnun olduklarını ve total kalça protezi gerektiren ve yapılan bir hastanın ise hiç memnun olmadığını bildirmişlerdir. İntra-operatif olarak mezenkimal progenitör hücre uygulamasının hastalar için düşük risk oluşturduğunun değerlendirdikleri çalışmalarında, hiç bir hastada kök hücre transplantasyonun metoduna özgü komplikasyon oluşmadığını bildirmişlerdir. Özellikle kemik iliği elde edilmesinden sonra iliak krestte yeni kemik yapımı, enfeksiyon, tümör oluşumu, veya morbidite açısından hiç bir komplikasyonla karşılaşılmadığı belirtilmiştir.⁴⁶

Hendrich ve arkadaşlarının çalışmasında da saptandığı gibi bizim çalışmamızda da verici ve alıcı bölgede mezenkimal kök hücre konsantrasyonun elde edilmesi ve uygulanmasına özgü hiç bir komplikasyon görülmemiştir. Mezenkimal kök hücre konsantrasyonu tıbbi açıdan bizim çalışmamızca da her hangi bir risk faktörünü işaret etmemektedir.

Marcel Betsch ve arkadaşlarının 14 mini pig üzerinde yaptıkları çalışmada deney hayvanlarının femoral kondillerine 10×6 mm genişliğinde kritik büyüklükte defekler oluşturmuşlardır. Bu defektlere bifazik biyomateryal, PRP ile bifazik biyomateryal karışımı, multipotent kök hücre konsantrasyonu ile bifazik biyomateryal karışımı ve PRP, multipotent kök hücre konsantrasyonu ile bifazik biyomateryal karışımı rastgele olacak şekilde uygulanmıştır. 26 hafta sonra deney hayvanları kurban edilmiş ve hazırlanan preparatlar histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda PRP uygulanan defektlerde kanda bulunan sayılarına kıyasla trombosit sayısının ve büyüme faktörlerinin anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır. Terapi gruplarında kondrojenik dokula tolidilin mavisi ile boyandığında tip 2 kollojen varlığı belirlenmiştir. Kontrol grubuna göre PRP veya multipotent kök hücre konsantrasyonun bifazik biyomateryal ile kombine kullanımının histolojik skorları

anlamalı şekilde arttırdığını fakat PRP ve multipotent kök hücre konsantrasyonun bifazik biomateriyal ile 3 lü kombine kullanımının histolojik skorları daha ileriye götürmediğini belirtmişlerdir.¹³

Betsch ve arkadaşları yaptıkları bir başka çalışmada 14 Goettinger minipig'in medial femoral kondillerine açtıkları osteokondrol defektlere bifazik biomateriyal, bifazik biomateriyal ve erythropoietin, bifazik biomateriyal ve multipotent kök hücre konsantrasyonu ve üçlü kombinasyonlarını uygulamışlardır. Deney hayvanlarını 26 hafta sonra sakrifiye etmişlerdir. O'Driscoll skorlamasına histolojik olarak elde edilen preparatlar incelenmiştir. Çalışmalarında sonuç olarak multipotent kök hücre konsantrasyonun ve erythropoietininin tek başlarına bifazik biomateriyal ile uygulanmasının kontrol grubuna göre histolojik açıdan anlamlı bir farklılık yaratmadığını fakat üçlü kombine kullanımlarının histolojik açıdan anlamlı bir iyileşme yansıttığını saptamışlardır.¹⁴

Kühl ve arkadaşları kemik iliği aspirasyonun ve mutlipotent kök hücre konsantrasyonun deprotenize sığır kemik minerali greft materyalinin stabilitesi üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında 13 hastaya çift taraflı açık sinüs lifting prosedürü uygulamışlardır. Hastaların sinüs lifting işlemlerinde biomateriyali tibiadan elde edilen kemik iliği aspirasyonu veya iliak kanattan elde etikleri kök hücre konsantrasyonu ile kombine kullanmışlardır. Kombine kullanımları ile greft materyalinin tek başına kullanımlarını operasyon sonrası ikinci hafta ve altıncı ayda bilgisayarlı tomografi analizlerine göre değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak bütün gruplarda %15 ile %21 arasında uygulanan kemik grefti hacminde azalma olduğu görülmüştür. Bütün gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde greft hacminde azalma olduğu saptanmıştır. Gruplar arasında zamana bağlı greft hacmi azalmasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. İki aşamalı sinüs lifting operasyonundan altı ay sonra kemik iliği aspirasyonun veya kök hücre konsantrasyonun greft materyali hacminde görülen azalmada olumlu bir sonuç yaratmadığı saptanmıştır.⁶⁶

Petri ve arkadaşları yaptıkları çalışmada uzun kemiklerde oluşan segmental kemik defektlerinde osteojenik biomateriyal ile multipotent kök hücre konsantrasyonun birlikte uygulandığı vakaları incelemişlerdir. Tedavi sonrası incelemelerini klinik olarak, pozitron emilsiyon tomografi (PET) ve bilgisayarlı tomografi ile yapmışlardır. Çalışmalarına mezenkimal kök hücre konsantrasyonu ile biomateriyal karışımının yeni

kemik oluşumunu indüklemesi ve segmental blok grefti uygulanan hastalara göre bu karışımının uygulandığı hastaların daha erken bütün ağırlığı taşıyabilecek direncin ve iyileşmenin gerçekleşmesi hipotezi ile başlamışlardır. Çalışmalarında uzun kemiklerde segmental defektleri bulunan beş hastayı 24 ay boyunca değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak kök hücre konsantrasyonu uygulanan hastalarda bütün ağırlığı taşımak için gerekli dirence hastaların ortalama 11.3 haftada ulaştıkları saptanmıştır. Beş hastadan dördünde radyolojik olarak defeklerin iyileştiği görülmüştür. İyileşmenin oluşmadığı hastanın defekt çapı en büyük hasta olduğu ve yerleştirilen fiksasyon implantlarının fail olmasından kaynaklı iyileşmenin gerçekleşmedi düşünülmüştür. Mezenkimal kök hücre konsantrasyonun uzun kemiklerde görülen üç cm den büyük segmental defektlerde blok kemik uygulamasına alternatif bir tedavi olabileceğini fakat yedi cm den büyük defektlerde yeterli direncin oluşmadığından blok greft uygulamasının altın standart olarak kullanılması gerektiğini belirtmişlerdir.⁹²

Kılıç ve arkadaşları sağlıklı insan kemik iliğinden ayrılarak çoğaltılan mezenkimal destek doku (stromal) hücrelerinin (MSH) fiziksel özelliklerine ve yüzey antijenlerine göre tanımlanması, osteoblastik ve kondroblast yönünde farklılaşma potansiyellerini yaptıkları çalışmada incelemişlerdir. Yaşları dört ay ile 18 yıl arasında değişen 10 kemik iliği transplantasyon vericisinden toplanan kemik iliğinin 1-3 ml'sinden gradiyent yöntemiyle mononükleer hücreleri ayırmışlardır. İçinden %10 fetal dana serumu bulunan tüplerde kültüre edilmiştir. Tabana yapışma gösteren fibroblastik görüntüde olan hücreler çoğaltılmıştır. Akım sitometri aygıtı ile hücrelerin yüzey antijenlerine göre immünofenotiplendirilmesi yapılmıştır. Tanımlanan mezenkimal stromal hücrelerin osteoblast ve kondroblast uyarıcı medyumları kullanılarak kondroblast ve osteoblasta farklılaşması incelenmiştir. Osteoblastlar Alizarin kırmızısı, kondroblastlar ise Alsiyan mavisi ile boyanarak mikrofotografaları alınmıştır. Sonuç olarak in vitro çoğaltılan MSH'lerin biçim ve yapışma özellikleri yaşa bağlı farklılık göstermedi belirtilmiştir. Destek doku kaynaklı olabilecek hücrelerde karakteristik CD105, CD44, CD166, CD29, CD90 ve CD73 antikollarına karşı %90-99 arasında pozitif sonuç, hematopoietik hücrelere özgü CD45, CD34, CD14 ve HLA-DR antikollarına karşı negatif (%0-5) sonuç göstermiştir. Hücre tipine özel besiyerlerinde çoğaltılan MSH'lerin ilerleyen alt kültürler (pasajlar) de dahil olmak üzere tüm alt kültürlerde osteoblast ve kondroblast hücreler farklılaştığı gözlenmiştir. Çalışmacılar mezenkimal destek doku hücrelerinin kemik iliği aktarımı, kalıtsal hastalıklar ve organ

hasarlarında, ortopedide kullanılması düşünülen biyomalzemelerin biyolojik etkilerinin in-vitro incelemesinde kemik ve kıkırdak dokusundaki hasarlı bölgelerin tamirinde kullanılmasının mümkün görüldüğünü belirtmişlerdir.⁶²

Yapılan çalışmada multipotent kök hücrelerin in-vitro olarak elde edilme yöntemi çalışmamda kullanılan yöntem ile farklı olmasına rağmen sonuç olarak kemik iliğinden elde edilen mezenkimal multipotent kök hücrelerin kemik hücrelerine dönüşebilme özelliğini kanıtlaması, yaptığıım tez çalışması ile kolerasyon göstermekte ve multipotent kök hücre konsantrasyonunun kemik defektlerinin tedavisinde istenen yeni kemik yapımındaki potansiyelini desteklemektedir.

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu porosedürlerinin artması ve cerrahi limitasyonların bulunması, cerrahları yeni kemik yapımında kullanılan tedavi seçeneklerini olumlu yönde etkileyebilecek hücre terapisi ve doku mühendisliği gibi yeni alternatifler arayışına itmiştir.

Mezenkimal kök hücreler kemik yapımında kritik bir rol oynamaktadır. Bu yüzden hücre terapisi olarak yüksek sayıda osteoprogenitör hücrenin kendi başına veya matrix ile kombine kullanılarak yaralanmış alana implante edilmesi otojen kemik greftine alternatif olabileceği düşünülmüştür. Otojen kemik iliği büyüme faktörleri ve kemik iliğinin mononükle hücre bölünümünde bulunan mezenkimal kök hücreler gibi osteoprogenitör maddelerden zengindir. Kemik iliği mezenkimal kök hücreleri iliac kanattan kolaylıkla aspire edilmesi ve güçlü osteojenik potansiyeli açısından kemik tamirini arttırmasına en uygun hücrelerdir. Çeşitli mezenkimal hücre tabanlı hücre terapisi protokolleri modifiye edilmiştir. Örnek olarak kültürde çoğaltılan yada kültür gerektirmeyen veya matrix ile birlikte yada matrix ihtiyacı olmadan uygulanan hücre terapi protokolleri mevcuttur.

Kemik iliğinin mezenkimal kök hücre ihtiva eden mononükle hücre bölümü, kemik iliğinden aspire edilmesi ile direk olarak yaralı bölgeye uygulanabilmektedir. Mononükle hücre sayısını ve multipotent kök hücre konsantrasyonunun artırılması, aspire edilen kemik iliğinin özel bir sentrifüj işleminden geçirilmesi ile mümkündür. İyileşme skorlarındaki artışın enjekte edilen multipotent kök hücre konsantrasyonu miktarı ile paralellik gösterdiği saptanmıştır. Yani ne kadar yüksek konsantrasyonda multipotent kök hücre yara bölgesine enjekte edilebilirse o kadar yüksek iyileşmenin gerçekleşeceği belirtilmiştir.⁴⁷

Konsantre edilmiş veya konsantre edilmemiş mononükler hücreler implantasyon öncesi sentetik veya natural osteokondüktif matriksler ile operasyon sırasında karıştırılabilmektedir. Birkaç yayınlanmış çalışmada ise konsantre edilmiş veya konsantre edilmemiş kemik iliğinin biyomateriyaller ile kombine kullanıldığı görülmüştür.^{6,47,86} CE etiketli biyomateriyallerin rutin kullanımları göz önünde bulundurulduğunda, bu method günlük kullanım için uygun olduğu ve biyomateriyallerin yetersiz kalabileceği vakalarda iyileşmeyi pozitif yönde etkileyebileceği düşünülebilir.

Mononükler hücreler in-vitro olarak kültüre edilebilmekte ve bu esnada mezenkimal kök hücre adezyon çeşitlerine göre seçilip çoğaltılabilmektedir. Bu işlem mezenkimal kök hücre sayısını milyon adete çıkartılabilmektedir. Konsantrasyonu artırılmış hücreler ise aynı kemik greftlerinin uygulandığı gibi cerrahi işlem sırasında uygun bir matriks aracılığı ile işlem bölgesinde uygulanabilmektedir. Quarto ve arkadaşları ilk olarak kemik iliğinden elde edilen mezenkimal kök hücrelerin kültüre edilmesi ile hidroksiapatit blokların kombine kullanımının büyük kemik defektlerinin (4-7cm) tedavisinde kullandıklarını bildirmişlerdir. Tibya, humerus ve ulnada defektleri bulunan üç hastaya uyguladıkları bu teknik ile başarılı tedavi sonuçları almışlardır. Altı - yedi yıl sonrasında kontrole çağırılan hastalarda tedavi sonuçları değerlendirildiğinde tedavinin gerçekleştiği görülmüştür.^{95,73} Ayrıca konsantrasyonu artırılmış kök hücrelerin, kırık yada osteotomy bölgelerine direk enjeksiyonu yapılan çalışmalar incelendiğinde ilginç sonuçların alındığı görülmüştür.^{60,61}

Doku mühendisliği kemik iliği hücrelerini veya mezenkimal kök hücreleri sentetik matriksleri ve moleküler sinyalleri (büyüme veya farklılaşma faktörlerini) hibrit yapılar oluşturabilmek için kombine etmektedir. Klasik teknik olarak kemik iliği mühendisliği hastadan elde edilen kemik iliğinden mezenkimal kök hücrelerin doku kültür plaztositeisi adezyonlarına göre izole edilip, farklılaştırılıp, kültürde çoğaltılması ve uygulanacak matriks üzerine bir kaç gün veya hafta sürecek olan ekiminin yapılmasına dayanır. Bu ekim işlemi cerrahi uygulamadan önce yerleştirilecek matriks içinde hücrelerin kolonizasyonunu ve hücre farklılaşmasına izin verecektir.⁹¹

Kemik rekonstrüksiyonu amacı ile insan mezenkimal kök hücresi osteojenik ortamda porlu kalsiyum fosfat seramikler üzerine ekilmiş ve kültüre edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonucunda bu protokolün kemik rejenerasyonuna olan pozitif etkisinin

yeterince yüksek olmadığı görülmesine karşın yapılan çalışmaların sadece erken dönem sonuçlarının alınması ve bu protokolün az sayıda hastaya uygulanması açık bir şekilde bu protokol üzerinde çalışılması ve araştırılma yapılması gerektiğini göstermektedir.^{31,59}

Klinik çalışmalarda sınırlı başarıların görülmesinin nedeni olarak kemik doku mühendisliğindeki multidisipliner alandaki, özellikle biyomateriyaller ve hücre izolasyonu aşamasındaki limitasyonlardaki dar boğaz gösterilebilir. Biyomateriyaller kemik boşluklarının doldurulmasında ekstraselüler matriks olarak kullanılmasına karşın, iyileşmenin ve yeni kemik yapımının gerçekleşebilmesi için uygulandığı alanda damarlar ve hücreler ile çevrelenmesi gerekmektedir. Günümüzde kullanılan biyomateriyallerin rejeneratif kapasitesi hala sınırlıdır. Hücre ile ilgili limitasyonlar göz önüne alındığında ise karşımıza otolog teknikte hücre seçimi için kullanılan bariyerler, hücre konsantrasyonu ve implante edilen hücrelerin ostejenik farklılaşmalarında ki değişkenlikler karşımıza çıkmaktadır. Otolog teknikte mezenkimal kök hücrelerin izolasyonu ve osteojenik farklılaşma süreci yüksek derecede tedavi prosedüründe bulunan, hastadan alınan kemik iliğinin taşıma şartlarına, elde edilme prosedürüne ve kültür esnasında ki güvenlik şartlarına bağlıdır. Kısıtlı sayıda hücrenin farklı yaşlarda ve genetik yapıda olan değişik donörlerden elde edilmesi rejeneratif tıp alanında yapılan erken sayılabilecek çalışmalarda kesin sonuçlara ulaşılmasını zorlaştırmaktadır. Biyomateriyallerin ve osteoprogenitör hücrelerin elde edilmesinde farklı firmalara göre değişik protokoller göstermesi teknik zorlukları arttırmakta ve klinik çalışmaların uygulanmasında hastaların farklı tedavilerin altında olması çalışma standardizasyonu açısından problem oluşturmaktadır.

Bahsi geçen dar boğazların üstesinden gelinmesi ve uygulama kolaylığı nedeni ile çalışmamızda kültür işlemi gerekmeden kemik iliğinden aspirasyon işlemi yapıldıktan hemen sonra uygun işlemlerden geçirilerek kök hücre konsantrasyonu elde edilebilen sistem kullanılmıştır (HarvestBMAC, Harvesttech, USA). Çalışmamızın sonucun da fibrozis değerlendirildiğinde maksilla ve mandibulada oluşturulan grupların genelinde en yüksek fibrozis oluşumunun 15. günde (erken dönemde) olduğu saptanmıştır. Maksillada gruplar arasındaki farklılık erken, orta ve geç dönem olarak değerlendirildiğinde anlamlı bir farklılık saptanmazken, mandibulada boş bırakılan defektlerde fibrozis görülmesinin her dönemde diğer gruplardan anlamlı derecede yüksek olduğu görülmüştür. Yani oluşturulan defektlere hangi biyomateriyal konulursa

konulsun fibrozisi anlamlı şekilde düşürmektedir. Biyomateryal ile doldurulan defektler ise kendi içlerinde değerlendirildiğinde, kombine veya tek başına kök hücre konsantrasyonu uygulanması halinde fibrozis seviyesinin orta dönemde (30.gün) anlamlı şekilde azaldığı, sadece greft materyalinin uygulandığı defektlerde ise fibrozisin geç dönemde (45.gün) azaldığı görülmüştür. Yani kök hücre konsantrasyonun kombine veya tek başına uygulanması fibrozis açısından greft uygulamasından özellikle orta ve erken dönemde daha etkin sonuçlar verebileceğini göstermektedir (Tablo 1b).

Kemik iyileşmesi değerlendirildiğinde ise maksilla erken dönemde (15.gün) kök hücre konsantrasyonu uygulanan defektlerde diğer çalışma gruplarına göre anlamlı şekilde kemik iyileşmesinin daha yüksek olduğu saptanırken bu anlamlılığın orta ve geç dönemde kaybolduğu görülmüştür. Mandibulada ise erken dönemde greft materyali ile kök hücre konsantrasyonun kombine kullanımı diğer gruplara göre anlamlı derecede daha pozitif kemik iyileşmesi göstermiştir. Orta dönemde kombine ve tek başına kök hücre konsantrasyonu kullanılan defektlerde tek başına greft materyali kullanılan defektten daha yüksek kemik iyileşmesi gözlenmiştir. Bu bulgular kök hücre konsantrasyonun tek başına veya kombine kullanımının kemik iyileşmesine özellikle orta ve erken dönemde olumlu katkılar sağlayabileceğine işaret etmektedir.

Rezidüel greft varlığı irdelendiğinde ise greft materyali uygulanmadığı için boş bırakılan ve sadece kök hücre konsantrasyonu uygulanan defektlerin hiç birinde rezidüel greft varlığı saptanmamıştır. Maksillada erken, orta ve geç dönemler değerlendirildiğinde Bioss'un tek başına kullanıldığı ve kök hücre konsantrasyonu ile Bioss'un kombine kullanımları arasında rezidüel greft varlığı açısından anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Fakat mandibuladaki defektler değerlendirildiğinde erken, orta ve geç dönemlerde tek başına Bioss kullanılan defektlerde diğer üç çalışma grubuna göre anlamlı şekilde daha yüksek rezidüel greft materyali bulunduğu saptanmıştır. Bu bulgular da kök hücre konsantrasyonu ile greft materyallerinin kombine kullanımda kök hücre konsantrasyonun erken, orta ve geç dönemlerde greft materyalinin kemikleşmesinde olumlu sonuçlar doğurabileceğini göstermektedir.

Bu çalışma doğrultusunda kök hücre uygulamalarının kemik rejenerasyonunda ve yapımında günümüz tekniklerinin yetersiz kaldığı yerlerde tek başına veya destekleyici bir tedavi olarak kullanılabileceğini ve greft materyali ile birlikte kombine

kullanımlarında özellikle erken dönemde yeni kemik yapımı arttıracığı ve hızlandıracağını düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

1. Agata H, Asahina I, Yamazaki Y, Uchida M, Shinohara Y, Honda MJ, Kagami H, Ueda M. Effective bone engineering with periosteum-derived cells. *Journal of dental research* 2007; 86(1): 79–83.
2. Aktaş Y, Aydoğdu S, Diker E. Kardiyovasküler Tedavide Yeni Ufuklar: Hücresel Kardiyomiyoplasti ve Kök Hücre Transplantasyonu. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2003; 3:340-7.
3. Alberius P, Dahlin C, Linde A. Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992; 50(8):829-34.
4. Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, Van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. Allogenic mesenchymal stem cells regenerate bone in critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* 2003; 85-A (10): 1927-1935.
5. Atabek A. Ototreter Aracılığı ile Elde Edilen Otojen Kemik Partiküllerinin ve İki Farklı Greft Materyalinin Yalın ve Kombine Uygulamalarının Histopatolojik İncelenmesi Sonuçları. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2003
6. Ateshrang A, Ochs BG, Ludemann M, Weise K, Albrecht D. Fibula and tibia fusion with cancellous autograft vitalised with autologous bone marrow: first results for infected tibia non-union. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009; 129:97-104.
7. Attar E. Kök Hücre Teknolojisi ve Gen Tedavisi. İ.Ü. Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.D. 2003.
8. Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30(1): 42-48.
9. Bauer TW, Muschler GF. Bone Graft Material. An Overview of the Basic Science. *Clin Orthop* 2000; 371: 10-27.
10. Baxter ME, Wynn RF, Jowitt SN, Wraith J Ed, Fairbairn LJ and Bellantuono I. Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells.* 2004; 22(5):675-82.
11. Bayar GR. Oofektomi Uygulanmış Tavşanlarda Periosteal Distraksiyon ile Elde Edilen Yeni Kemik Dokuların Değerlendirilmesi, Dishekimliği Bilimleri Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Programı GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 2004.
12. Becker W, Becker BE. Treatment of mandibular 3-wall intrabony defects by flap debridement and expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes. Long-term evaluation of 32 treated patients. *J. Periodontol.* 1993; 64 (Suppl. 11): 1138-1144.
13. Betsch M, Schnependahl J, Thuns S, Herten M, Sager M ve ark. Bone Marrow Aspiration Concentrate and Platelet Rich Plasma for Osteochondral Repair in a Porcine Osteochondral Defect Model. *PLoS ONE.* 2013; 8(8): e71602.
14. Betsch M, Thelen S, Santak L, Herten M, Jungbluth P ve ark. The Role of Erythropoietin and Bone Marrow Concentrate in the Treatment of Osteochondral Defects in Mini-Pigs. *PLoS ONE* 2014; 9(3):e92766.

15. Beumer J, Curtis TA, Firteli DA. Maxillofacial Rehabilitation. The CV Mosby Company, 1979
16. Boyne PJ. Animal studies of application of rhBMP-2 in maxillofacial reconstruction. *Bone*. 1996; 19(1 Suppl):83S-92S.
17. Brighton CT, Robert MH. Histochemical localization of calcium in the fracture callus with potassium pyroantimonate: possible role of chondrocyte mitochondrial calcium in callus calcification. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1986; 68-A (5): 703-715.
18. Brighton CT, Robert MH. Early histological and ultrastructural changes in medullary fracture callus. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1991;73-A (6): 832-847.
19. Brighton CT, Sugioka Y, Hunt RM. Cytoplasmic structures of epiphyseal plate chondrocytes; quantitative evaluation using electron micrographs of rat costochondral junctions with specific reference to the fate of hypertrophic cells. *Journal of Bone and Joint Surgery*. 1973; 55-A: 771-784.
20. Brodke D, Pedrozo HA, Kapur TA, Attawia M, Kraus KH, Holy CE, Kadiyala S, Bruder SP. Bone grafts prepared with selective cell retention technology heal canine segmental defects as effective as autograft. *J Orthop Res*. 2006; 24(5): 857-866.
21. Bruder SP, Horowitz MC, Mosca JD, Haynesworth SE. Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone*. 1997; 21(3):225-35.
22. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*. 1998; 80(7):985-96.
23. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001; 72(2):215-29.
24. Cafesse GR, Nasgleti CE. Comparison of Bioabsorbable and Non-Bioabsorbable Membranes Histologic and Histometric Study in Dogs' *J. Periodontal* 1994; 65:583-591.
25. Carranza FA, Newman MG. *Clinical Periodontology*. 8th Edition. W.B.Saunders Company. 1996; Los Angles.
26. Chung ve ark. Contr transplantation of marrow stromal cells may prevent lethal graft versus host disease in major histocompatibility complex mismatched murine hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematod*. 2004; 80: 370-376.
27. Çizmeci ŞF. Solvent Anhidrate Yumuşak Doku Graftlerinin Doku Deneysel İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Ankara. 2001.
28. Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *J Bone Joint Surg Am*. 1989; 71 (5): 684-91.
29. Cortellini P, Pini Prato G, Tonetti MS. Periodontal regeneration of human intrabony defects with titanium reinforced membranes. A controlled clinical trial. *J. Periodontol*. 1995; 66: 797-803.
30. Daştan A, Günel G, İldoğan L, Somuncu G. Kök Hücre Teknolojisi. Dokuz Eylül Üniversitesi, Buca Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi Öğretmenliği. 2009.
31. Derubeis AR, Cancedda R. Bone Marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng*. 2004; 32:160-5.
32. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Karuse D, Deans R, Keating A, Prockop DJ, Horwitz E. Minimal criteria for defining

- multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement Cytotherapy. 2006; 8:315-7.
33. Efeoğlu A. 'Periodontal Kemik Cerrahisi' İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji ABD.
 34. Erices A, Conget P, Rojas C, Minguell JJ. Gp130 activation by soluble interleukin-6 receptor/interleukin-6 enhances osteoblastic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Experimental Cell Research*. 2002; 280: 24-32
 35. Erkoçak A. Genel Histoloji. Ankara Üniversitesi Basımevi; 1975.
 36. Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Starnaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 1998; 279: 1528-1530.
 37. Fleisher N, Waal HD, Bloom A. Regeneration of lost attachment apparatus in the dog using Vicryl absorbable mesh (Polyglactin 910). *Int. J. Periodont. Rest. Dent*. 1988; 8: 44-55.
 38. Fleming JE Jr, Cornell CN, Muschler GF. Bone Cells and Matrices in Orthopedic Tissue Engineering. *Orthop Clin North Am* 2000, 31 (3): 357-74.
 39. Fonseca JR. Oral and Maksillofacial Surgery. 3.Baskı, W.B. Saunders Company. Philadelphia, 2000.
 40. Fridenstein AJ, Gorskaja JF ve Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976; 267-74.
 41. Garg AK. Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants: Quintessence Publishing Co, Inc; 2004.
 42. Görmez U. Dental İmplant Çevresinde Cerrahi Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde Sığır Kaynaklı Laktoferrinin Kemik Rejenerasyonuna Etkisi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Ens. Ağız Diş ve Çene Hastalıkları Cerrahisi ABD 2008.
 43. Güven O, Keskin A. Preprotetik Cerrahi. Çağdas; 2001.
 44. Hermann A, Kim JB, Srimasorn S, Zaehres H, Reinhardt P, Schöler HR, Storch A. Factor-Reduced Human Induced Pluripotent Stem Cells Efficiently Differentiate into Neurons Independent of the Number of Reprogramming Factors. *Stem Cells Int*. 2016; Article ID 4736159.
 45. Hardwick R, Hayes BK, Flynn C. Devices for dentoalveolar regeneration: an up-to-date literature review. *J Periodontol*. 1995; 66(6):495-505.
 46. Hendrich C, Engelmaier F, Waertel G, Krebs R ve Jager M. Safety of autologous bone marrow aspiration concentrate transplantation: initial experiences in 101 patients. *Licensee PAGEPress, Italy Orthopedic Reviews* 2009; 1:e32.
 47. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am* 2005; 87:1430-7.
 48. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WW, Pyeritz RE, Brenner MK. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cell in children with osteogenesis imperfecta. *Nature Med*. 1999; 5: 309-13.
 49. Hutmacher D, Hürzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int. J. Oral Max. Imp*. 1996;11: 667-678.

50. Hyder PR, Dowell P, Singh G, Dolby AE. Freeze-dried, cross-linked bovine type I collagen: Analysis of properties. *J. Periodontol.* 1992; 63: 182-186.
51. İçten O. Trikalsiyumfosfatın Yeni Kemik Yapımına Etkisinin Deneysel İncelenmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.1987
52. Izuta Y, Ochi M, Adachi N, Deie M, Yamasaki T, Shinomiya R. Meniscal repair using bone marrow-derived mesenchymal stem cells; experimental study using green fluorescent protein transgenic rats. *Knee* 2005; 12(3):217-23.
53. Jager M, Hertzen M, Fochtmann U, et al. Bridging the Gap: Bone Marrow Aspiration Concentrate Reduces Autologous Bone Grafting in Osseous Defects. Orthopaedic Research Society Wiley Periodicals Inc. *J. Orthop. Res.* 2011; 29:173-180.
54. Jungueira LC, Carneriro J, Kelley RO. Basic Histology. 6. Baskı, A Lange Medical Book, 1989.
55. Kahnberg KE, Rasmusson L, Zellin G. Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants. Blackwell Pub. Co., Danimarka, 2005.
56. Kalfas IH. Principles of Bone Healing. *Neurosurg Focus* 2001;10(4):1-4.
57. Karring T., Lindhe J., Cortellini P. Regenerative periodontal therapy. Ed: Lindhe J, Karring T, Lang NP, *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th Edition, 2003; p. 652-683.
58. Keller E, Triplet WW. Iliac Bone Grafting: Review of 160 Consecutive Cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1987; 45: 114.
59. Khan Y, Yaszemski MJ, Mikos AG, Laurencin CT. Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90(Suppl. 1):36-42.
60. Kim SJ, Shin YW, Yang KH, Kim SB, Yoo MJ, Han SK et al. A multi-center, randomized clinical study to compare the effect and safety of autologous cultured osteoblast (Ossron) injection to treat fractures. *BMC Musculoskelet Disord* 2009; 10:20.
61. Kitoh H, Kawasumi M, Kaneko H, Ishiguro N. Differential effects of culture – expanded bone marrow cells on the regeneration of bone between the femoral and the tibial lengthenings. *J Pediatr Orthop* 2009; 29:643-9.
62. Kılıç E, Ceyhan T. ve Çetinkaya D. İnsan kemik iliği kaynaklı mezenkimal stromal hücrelerin kırıldak ve kemik hücrelerine farklılaşma potansiyelinin değerlendirilmesi. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2007; 41(4): 295-301.
63. Klinge B, Alberius P, Isaksson S, Jönsson J. Osseous response to implanted natural bone mineral and synthetic hydroxylapatite ceramic in the repair of experimental skull bone defects. *J Oral Maxillofac Surg*, 1992; 50(3): 241-249.
64. Kraus KH, Kadiyala S, Wotton H, Kurth A, Shea M, Hannan M, Hayes WC, Kirker-Head CA, Bruder S. Critically sized osteo-periosteal femoral defects: a dog model. *J Invertebr Surg.* 1999; 12(2):115-124.
65. Krause DS. Plasticity of marrow-derived stem cells. *Gene Ther.* 2002; 9: 754-758.
66. Köhl S, Payer M, Kirmeier R, Wildburger A, Wegscheider W, Jakse N. The influence of bone marrow aspirates and concentrates on the early volume stability of maxillary sinus graft with deproteinized bovine bone mineral – first results of RCT. *Clin Oral Impl. Res.* 2013; 1-5.
67. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringden O. Treatment of severe acute graft versus host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet* 2004; 363 (1): 1439-41.

68. Lee TJ, Jang J, Kang S, Jin M, Shin H, Kim DW, Kim BS. Enhancement of osteogenic and chondrogenic differentiation of human embryonic stem cells by mesodermal lineage induction with BMP-4 and FGF2 treatment. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2013; 430 (2): 793–797.
69. Leslie PG, James LH. *Color textbook of Histology*. Second Edition, W.B Saunder company 2001, pg:129-155.
70. Li Z, Li L, Understanding hematopetic stem-cell microenviroments. *Trends Biochem Sci*. 2006; 31(10):589-595.
71. Locci P, Calvitti M, Belcastro S. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J. Periodontol*. 1997; 68: 857-863.
72. Logeart-Avramoglou D, Anagnostou F, Bizios R, Petite H. Engineering bone: Challenges and obstacles, *J. Cell Mol. Med*. 2005; 9(1), 72-84.
73. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R et al. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7- year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng* 2007; 13:947-55.
74. Marcacci M, Kon E, Zaffagnini S, Giardino R, Rocca M, Corsi A, Benvenuti A, Bianco P, Quarto R, Martin I, Muraglia A, Cancedda R: Reconstruction of extensive long-bone defects in sheep using porous hydroxyapatite sponges. *Calcif Tissue Int*. 1999; 64 (1):83-90.
75. Marx RE, Carlson ER. Tissue Banking Safety: Caveats and Precautions for the Oral and Maxillofacial Surgen. *J Oral Maxillofac Surg* 1993; 51 : 1372-1379.
76. Meliha Yıldız. Kemik İyileşmesinde Trombositten Zengin Plazmanın (Platelet Rich Plasma–Prp) Etkisinin Deneysel Olarak Değerlendirilmesi. Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş Çene Hastalıkları Ve Cerrahisi Anabilim Dalı, 2006.
77. Mellonig JT. Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. *Dent. Clin. North Am*.1991; 35: 505.
78. Meyer U, Wiesmann HP. *Bone and Cartilage Engineering*: Springer; 2006.
79. Mitalipov S, Wolf D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*. 2009; 114: 185–99.
80. Mocan A, Kişnişçi R. Non-rezorbe Hidroksilapatitler ve Klinik Uygulaması. *G. Ü. Diş Hek. Fak. Derg*. 1990; 7: 203 – 214.
81. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; 71 (6): 354-61.
82. Mundell RD, Mooney MP, Siegel MI, Losken A. Osseous guided tissue regeneration using a collagen barrier membrane. *J Oral Maxillofac Surg*. 1993; 51(9):1004-12.
83. Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontology* 2000; 19, 74-86.
84. Netter FH, Dingle RV, Mankin HJ. *Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders*. Summit, New Jersey: Ciba-Geigy Corporation. 1990; p. 170.
85. Nevins M, Giannobile WV, McGuire MK, Kao RT, Mellonig JT, Hinrichs, JE, Mcallister BS, Murphy KS, McClain PK, Nevins ML, Paquette DW, Han TJ, Reddy MS, Lavin PT, Genco RJ, Lynch SE. Platelet-derived growth factor stimulates bone fill and rate of attachment level gain: results of a large multicenter randomized controlled trial. *J Periodontol*. 2005; 76(12), 2205-15.

86. Ochs BG, Schmid U, Rieth J, Ateschrang A, Weise K, Ochs U. Acetabular bone reconstruction in revision arthroplasty: a comparison of freeze-dried, irradiated and chemically-treated allograft vitalised with autologous bone marrow versus frozen nonirradiated allograft. *J Bone Joint Surg (Br)* 2008; 90:1164-71.
87. Parikh SN. Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of Postgraduate Medicine*. 2002; 48, 142-148.
88. Peter FFJR. Ana Hatlarıyla Periodontoloji. (çeviren: Fisun Ünlü, Nurcan Gürses) Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir. 1997.
89. Peterson LJ, Tucker MR. Contemporary of Maxillofacial Surgery. The CV Mosby Company, 1988.
90. Peterson LJ. Principles Of Oral And Maxillofacial Surgery: Lippincott-Raven Publishers; 1997.
91. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M et al. Tissue engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000; 18:959-63.
92. Petri M, Namazian A, Wilke F, Ettinger M, Stübiger T, Brand S, Bengel F, Krettek C, Berding G, Jagodzinski. Repair of Segmental Long-bone defects by stem cell concentrate augmented scaffolds: a clinical and positron emission tomography-computed tomography analysis. *International Orthopaedics (SICOT)* 2013; 37:2231-2237.
93. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Azar-Avidan O, Noff M. Collagen membranes prevent the apical migration of epithelium during periodontal wound healing. *J. Periodont. Res.* 1987; 22: 331-333.
94. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284:143-147.
95. 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. *N Eng J Med* 2001; 344:385-6.
96. Quiñones CR, Caffesse RG. Current status of guided periodontal tissue regeneration. *Periodontol.* 1995; 9: 55-68.
97. Ringe J, Leinhardt I, Stich S, Loch A, Neumann K, Haisch A, Häupl T, Manz R, et al. Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 2008; 2 (2-3): 136-46.
98. Ripamonti U. The Induction of Bone in Osteogenic Composites of Bone Matrix and Porous HA Replicas. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 1991; 49: 817 - 30.
99. Rosenberg E, Rose LF. Biologic and Clinical Considerations for Autografts and Allografts in Periodontal Regeneration Therapy. *Advances in Periodontics, Part II. Dental Clinics of North America*. 1998; 42(3), 467-490.
100. Ross J, Li L. Recent advances in understanding extrinsic control of hematopoietic stem cell fate. *Curr Opin Hematol.* 2006; 13 (4): 237-242
101. Salama R, Burwell R, Dikson IR. Recombined grafts of bone and marrow. The beneficial effect upon osteogenesis of impregnating xenograft (heterograft) bone with autologous red marrow. *J Bone Surg Br.* 1973; 55 (2): 402-17.
102. Salentijn, L. Biology of Mineralized Tissues: Cartilage and Bone, Columbia University College of Dental Medicine post-graduate dental lecture series, 2007.
103. Sanrı M. Cerrahi Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde Sığır Kaynaklı Anorganik Kemik Grefti ve Kanama Durdurucu Bitki Ekstresinin Kombine Kullanımının Kemik Rejenerasyonuna Etkisi. Çukurova Üni. Sağlık Bilimleri Ens., Adana 2013.

104. Schepers EJG, Ducheyne P, Barbier L, Schepers S. Bioactive glass particles of narrow size range: A new material for the repair of bone defects . *Implant Dent.* 1993; 2:151-156.
105. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide). *Biomaterials.* 1997; 18: 535-8.
106. Sculean A, Berakdar M, Chiantella GC, Donos N, Arweiler NB, Brecx M. Healing of intrabony defects following treatment with a bovine-derived xenograft and collagen membrane. A controlled clinical study. *J. Clin. Periodontol.* 2003; 30: 73-80.
107. Shigeyama YA, D'errico J, Stone R, Somerman MJ. Commercially-prepared allograft material has biological activity in vitro. *J. Periodontol.* 1995; 66: 478-487.
108. Skowronski PP, An YH. Bone graft materials in orthopaedics. *Musc Orthopaed.* 2003; J 6:58-66.
109. Soydan N. Genel Histoloji. İstanbul; 1992.
110. Szule P, Garnero P, Marchand F, Duboeuf F, Delmas PD. Biochemical markers of bone formation reflect endosteal bone loss in elderly men--MINOS study. *Bone.* 2005; 36 (1): 13–21.
111. Şimsek A. Distraksiyon Osteogenezisi. GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1998.
112. Tate ML, Adamson JR, Tami AE, Bauer TW. Cells in Focus, The osteocyte. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology.* 2004; (36), 1-8.
113. Tekelioglu M. Genel Tıp Histolojisi: Beta Basım Yayım A.S.;1989.
114. Terai S et al. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after otologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem Cells* 2006; 24:2292-2298.
115. Tuskan C. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateriyaller. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları İstanbul. 2002; 100.
116. Ulloa-Montoya F, Verfaillie CM, Hu WS. Culture systems for pluripotent stem cells. *J Biosci Bioeng.* 2005; 100 (1): 12–27.
117. Urist MR. Bone. Formation by autoinduction. *Science.* 1965; 150: 893-899.
118. Von Arx T, Hardt N, Wallkamm B. The TIME technique: a new method for localized alveolar ridge augmentation prior to placement of dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996; 11(3):387-94.
119. Wang HL, MacNeil RL. Guided Tissue Regeneration: Absorbable Barriers. *Dent. Clin. North Am.* 1998; 42: 505-522.
120. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science.* 2000; 287: 1442-1446.
121. Wu DC, Boyd AS, Wood KJ. Embryonic stem cell transplantation: potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine. *Front Biosci* 2007; 12 (8–12).
122. Yazar TT. Sürekli Kemik Defektlerinde Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonunun Osteogenesis Üzerine Etkilerinin Histopatolojik Olarak Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 1998.

HAM VERİLER

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
1	Maksilla	İlt.	Nekroz	Fibrozis	Kemik Y	Kemik iyi.	Res.greft	Y. Cisim		Mandibula	İlt.	Nekroz	Fibrozis	Kemik Y	Kemik iyi.	Res.greft	Y. Cisim
2	Boş 15 g	0	0	3	1	0	0	0		Boş 15 g	0	0	3	2	2	0	0
3	Boş 15 g	0	0	3	1	0	0	0		Boş 15 g	0	0	3	2	2	0	0
4																	
5	Boş 30	0	0	3	2	3	0	0		Boş 30	0	0	3	3	3	0	0
6	Boş 30	0	0	2	3	3	0	0		Boş 30	0	0	3	3	3	0	0
7																	
8	Boş 45	0	0	2	3	4	0	0		Boş 45	0	0	3	3	5	0	0
9	Boş 45	0	0	2	3	4	0	0		Boş 45	0	0	3	3	5	0	0
10																	
11	Bios 15	0	0	2	1	0	1	0		Bios 15	0	0	2	3	3	1	0
12	Bios 15	0	0	2	1	0	1	0		Bios 15	0	0	3	2	2	1	0
13																	
14	Bios 30	0	0	2	3	4	1	0		Bios 30	0	0	2	3	4	1	0
15	Bios 30	0	0	2	3	4	1	0		Bios 30	0	0	2	3	4	1	0
16																	
17	Bios 45	0	0	2	3	5	1	0		Bios 45	0	0	1	3	5	1	0
18	Bios 45	0	0	2	3	5	1	0		Bios 45	0	0	1	3	5	1	0
19																	
20	Kök h 15	0	0	3	2	2	0	0		Kök h 15	0	0	2	2	2	0	0
21	Kök h 15	0	0	3	2	2	0	0		Kök h 15	0	0	2	2	2	0	0
22																	
23	Kök h 30	0	0	2	3	4	0	0		Kök h 30	0	0	2	3	5	0	0
24	Kök h 30	0	0	2	3	5	0	0		Kök h 30	0	0	2	3	5	0	0
25																	
26	Kök h 45	0	0	2	3	5	0	0		Kök h 45	0	0	1	3	6	0	0
27	Kök h 45	0	0	2	3	5	0	0		Kök h 45	0	0	1	3	5	0	0
28																	
29	Bio-kök 15	0	0	3	2	1	1	0		Bio-kök 15	0	0	2	2	3	0	0
30	Bio-kök 15	0	0	3	1	1	1	0		Bio-kök 15	0	0	2	2	3	0	0
31																	
32	Bio-kök 30	0	0	2	3	4	1	0		Bio-kök 30	0	0	1	3	5	0	0
33	Bio-kök 30	0	0	2	3	4	1	0		Bio-kök 30	0	0	1	3	5	0	0
34																	
35	Bio-kök 45	0	0	2	3	5	1	0		Bio-kök 45	0	0	1	3	5	1	0
36	Bio-kök 45	0	0	2	3	5	1	0		Bio-kök 45	0	0	0	3	6	0	0

Alllen' in kırık iyileşme metoduna göre incelenen preperatların kayıt altına alındığı ham veri şeması

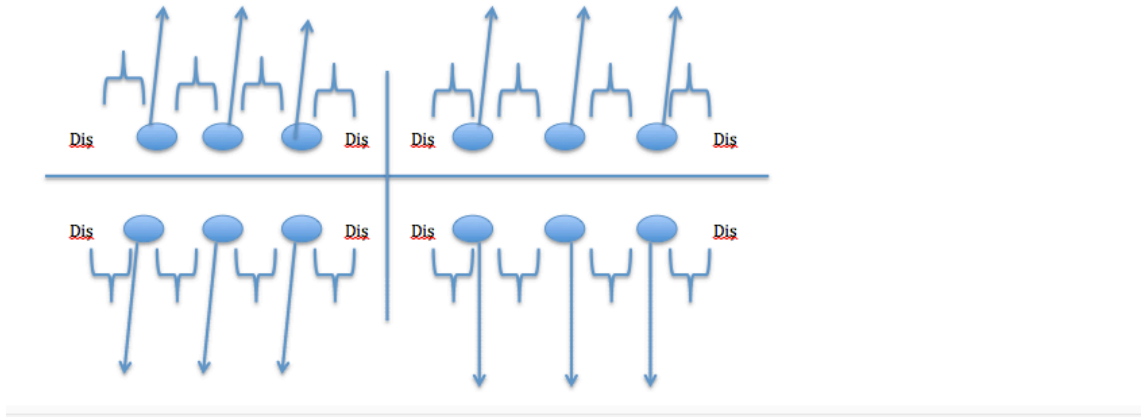
FORMLAR

KEMİK İLİĞİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRENİN KEMİK İÇİ DEFİKTLERİN İYİLEŞMESİNE ETKİSİ: DENEYSEL ÇALIŞMA

Hayvan #:

Operasyon Tarihi:

Defekt Yerleşimi ve Defekt Mesafe Ölçümleri:



Deneysel çalışma sırasında deneklerin hangi defektlerine hangi materyalin uygulandığının kayıt altına alındığı form örneği

ETİK KURUL KARARI



T.C
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2012/ 89

27/06/ 2012

Sn: Prof. Dr. Hakkı TANYERİ
İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Karar No : 2012/ 89
Başvuru : 18.06.2012

Sorumluluğunu üstlendiğiniz, aşağıda çalışma materyali belirtilen Dok.Öğr.İsmail ONDUR'a ait "Kemik İliği Kaynaklı Kök Hücrenin Kemik İçi Defektlerin İyileşmesine Etkisi: Deneysel Çalışma" isimli projeniz Kurulumuz tarafından incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Çalışılacak Hayvanın	Türü	Koyun
	Cinsiyeti	Erkek
	Sayısı	6
Proje Başlangıç/Bitiş Tarihi	Temmuz/2012-Temmuz/2014	

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ
İ.Ü.HADYEK Başkanı

Prof. Dr. Mehmet YALTIRIK
İ.Ü.HADYEK Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Pinar YAMANTÜRK ÇELİK
Üye

Doç.Dr.Ufuk ÇAKATAY
Üye

Doç.Dr.Alper OKYAR
Üye

Yard.Doç.Dr. Altan ARMUTAK
Üye

Uzm. Vet.Hek.Fatma TEKELİ
Üye

Mak.Yük.Müh. Dr.Burak OLGUN
Üye

Avukat Selma DEMİR
Üye

İstanbul Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı İ.Ü. Veteriner Fakültesi Dekanlık katı A 221 nolu Oda Avcılar -İSTANBUL TEL : (0 212) 4737070/ 17031 E mail : hadyek@istanbul.edu.tr