

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

KRANİYAL KEMİK DEFEKTLERİNDE
YAĞ ENJEKSİYONUNUN
KEMİKLEŞMEYE ETKİSİ

(DENEYSEL ÇALIŞMA)

UZMANLIK TEZİ
DR. TAHİR GÖKHAN HAYTOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. M. ZEKİ GÜZEL

İSTANBUL 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, beceri ve deneyimlerini esirgmeden bana aktaran ve mesleki gelişiminin şekillenmesinde yanımda olan değerli hocalarım Prof. Dr. M. Zeki GÜZEL, Prof. Dr. Muzaffer ALTINDAŞ, Prof. Dr. Oğuz ÇETİNKALE, Prof. Dr. O. Akın YÜCEL, Prof. Dr. Yağmur AYDIN ve Uz. Dr. Hakan ARSLAN 'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık tezimin oluşumunda emeği geçen ve her aşamasında değerli katkılarını gördüğüm tez danışmanım sayın Prof. Dr. M. Zeki GÜZEL başta olmak üzere, bu tezin bilimsel ve fiziki bir bütün halinde oluşumuna destek veren C.T.F Radyodiagnostik A.D.'ndan Prof. Dr. Sait ALBAYRAM ve Dr. Murat AŞIK, Radyoloji teknikeri Fatmanur ARSLAN, C.T.F Histoloji-Embriyoloji A.D.'ndan Dr. Gamze TANRIVERDİ, C.T.F Biyoistatistik A.D.'ndan Dr. Hayriye VEHİD, C.T.F Deney Laboratuvarı sorumlusu Tıbbi Biyolog Çetin KARACA'ya ve başta Stajyer Dr. Merve YILDIZ ile birlikte tüm Plastik Cerrahi asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca birlikte bir aile olduğumuzu hissettiren asistan arkadaşlarıma, pek çok şeyi paylaştığımız servis, poliklinik, yanık ünitesi ve ameliyathanemizin değerli hemşire ve personellerine teşekkür ederim.

Hayatım boyunca beni destekleyen ve hep yanımda olan aileme; bana sevgi ve desteğini her zaman hissettiren, hayattaki en büyük şansım sevgili eşim Nurdan Seda KUTLU HAYTOĞLU 'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Tahir Gökhan HAYTOĞLU

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ	iv
1. ÖZET	vii
2. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)	viii
3. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
4. GENEL BİLGİLER	3
5. GEREÇ ve YÖNTEM	20
5.1. Kemik Defekti Oluşturulması	20
5.2. Yağ Grefti Alınması, Hazırlanması ve Uygulanması	23
5.3. Bilgisayarlı Tomografi Ölçümleri.....	26
5.4. Makroskopik ve Histopatolojik Değerlendirme.....	28
6. SONUÇLAR.....	29
7. İRDELEME	42
8. KAYNAKLAR.....	46

TABLO VE ŞEKİL LİSTESİ

TABLO LİSİTESİ

Tablo 1. Grup-1 (6mm x 5 mm Kontrol Grubu) verileri.	29
Tablo 2. Grup-2 (8mm x 5mm Kontrol Grubu) verileri.	30
Tablo 3. Grup-3 (6mm x 5mm Deney Grubu) verileri.	30
Tablo 4. Grup-4 (8mm x 5mm Deney Grubu) verileri.	31
Tablo 5. 0.haftada kontrol ve deney gruplarında oluşturulan defekt alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).	31
Tablo 6. 6mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının defekt alanlarının haftalara göre karşılaştırılması.	32
Tablo 7. 6mm x 5mm kontrol ve deney grupları haftalar açısından varyanslar homojen olduğundan Student's t-tesi ile değerlendirildi. 4. haftadan itibaren, ölçümlerde iki grup arasında belirgin fark olduğu ortaya çıktı.	32
Tablo 8. 8mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının defekt alanlarının haftalara göre karşılaştırılması.	33
Tablo 9. 8mm x 5mm kontrol ve deney grupları haftalar açısından varyanslar homojen olduğundan Student's t-tesi ile değerlendirildi. 6. haftadan itibaren, ölçümlerde iki grup arasında belirgin fark olduğu ortaya çıktı.	33
Tablo 10. Grupların 4.ve 8. haftaların sonlarındaki defekt kapanma yüzdelerinin ortalama değerleri.	34

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Kemik hücrelerinin kökeni	5
Şekil 2. Osteosit lakünü (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 121, 2006).....	6
Şekil 3. Uzun kemiğin genel yapısı (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 118, 2006).....	10
Şekil 4. Havers sistemi veya osteon yapısı (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 119, 2006).	11
Şekil 5. İntramembranöz kemikleşme (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 131, 2006).....	13
Şekil 6. Endokondral kemikleşme:Primer kemikleşme merkezi (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 133, 2006).	14
Şekil 7. Kranium orta hatta yapılan vertikal deri insizyonu.	21
Şekil 8. Hazırlanmış olan periost flebi.....	22
Şekil 9. Oluşturulacak olan kemik defekti ölçümleri.	22
Şekil 10. Defektin tur ucu ile oluşturulması.	23
Şekil 11. Oluşturulmuş defekt alanı.....	23
Şekil 12. İnfiltrasyon solüsyonu ve kanülü.....	24
Şekil 13. Lipo-aspirasyon materyali.	24
Şekil 14. A:Yağ grefti uygulaması, B: periost sütürasyonu.	25
Şekil 15. 0.6 mm lik kesitler ile deneklerin koronal, aksiyel ve 3 boyutlu tomografileri çekildi.....	26

Şekil 16. 0.6 mm lik kesitler ile deneklerin koronal, aksiyel ve 3 boyutlu tomografileri çekildi.....	27
Şekil 17. Tomografik alan ölçümleri.	27
Şekil 18. Grupların defekt alanlarının haftalara göre değişimi.	34
Şekil 19. 6mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının haftalara göre 3 boyutlu tomografik görüntülerinin değerlendirilmesi.....	35
Şekil 20. 8mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının haftalara göre 3 boyutlu tomografik görüntülerinin değerlendirilmesi.....	36
Şekil 21. 6mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının 8. haftada sakrifikasyon sonrası, defekt alanlarının makroskopik görüntüsü. A:Kontrol grubu, B:Deney grubu.	37
Şekil 22. 8mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının 8. haftada sakrifikasyon sonrası, defekt alanlarının makroskopik görüntüsü. A:Kontrol grubu, B:Deney grubu.	37
Şekil 23. 8mm x 5mm deney grubunun 8. haftadaki sakrifikasyon esnasındaki makroskopik görüntüsü. Defekt alanının periferden santrale doğru artmış vaskülarite ile kemikleşerek küçüldüğü izlenmekte.....	38
Şekil 24. (A) Kontrol 1 grubu; Masson Trikrom x 4. (B) Kontrol 1 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, DA: Defekt alanı.	39
Şekil 25. (C) Kontrol 2 grubu; Masson Trikrom x 10. (D) Kontrol 2 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, DA: Defekt alanı.	39
Şekil 26. (E) Deney 1 grubu; Masson Trikrom x 4. (F) Deney 1 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, DA: Defekt alanı, YD: Yağ dokusu.....	40
Şekil 27. (G) Deney 2 grubu; Masson Trikrom x 4. (H) Deney 2 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, YD: Yağ Dokusu.	40

1. ÖZET

Kraniyal kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla kemik greftleri ve kemik yerini tutabilecek alloplastik materyaller sıklıkla kullanılmaktadır. Son yıllarda estetik ve rekonstrüktif amaçlarla klinik pratikte yaygın olarak kullanılan enjeksiyon ile yağ grefti uygulamasının sıçan kritik kraniyal kemik defektlerindeki etkinliği araştırıldı.

Çalışmada 32 adet Spraque-Dawley tipi dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar dört gruba ayrıldı. Grup 1'de (n=8) her bir sıçanın sağ parietal kemiğinde 6mm x 5mm boyutlarında kritik büyüklükte tam kat kemik defekti yaratıldı. Grup 2'de (n=8) kemiğinde 8mm x 5mm boyutlarında kritik büyüklükte tam kat kemik defekti yaratıldı. Grup 3'de (n=8) her bir sıçanın sağ parietal kemiğinde 6mm x 5mm boyutlarında kritik büyüklükte tam kat kemik defekti yaratıldıktan sonra sıçanların sırt dorsal yüzlerine liposakşın yöntemi uygulanarak yağ grefti elde edildi. Elde edilen yağ grefti kemik defektleri üzerine uygulandı. Grup 4'de (n=8) her bir sıçanın sağ parietal kemiğinde 8mm x 5mm boyutlarında kritik büyüklükte tam kat kemik defekti yaratıldıktan sonra sıçanların sırt dorsal yüzlerine liposakşın yöntemi uygulanarak yağ grefti elde edildi. Elde edilen yağ grefti kemik defektleri üzerine uygulandı.

Radyolojik olarak gruplar arasında 0., 2., 4., 6. ve 8. haftalarda defekt alan ölçümleri ve 0-4. ile 0-8. haftalarda kapanma yüzdeleri karşılaştırıldı. Deneklerin tamamı 8. hafta sonunda sakrifiye edildi. Sakrifikasyon sonrası gruplar arasında defektlerin makroskopik olarak karşılaştırılması ve histopatolojik olarak değerlendirilmesi yapıldı.

Değerlendirmeler sonunda yağ grefti uygulanan gruplarda kemik defekti iyileşmesinde belirgin farklar saptandı. Grup 3 ve Grup 4'ün 8. hafta sonunda defekt alanlarının belirgin şekilde azaldığı ve kapanma yüzdelerinin Grup 1 ve Grup 2'ye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde fazla olduğu saptandı. Histopatolojik incelemeler, yağ grefti uygulanan gruplarda artmış osteogenezisi destekler niteliktedir.

Sonuç olarak sıçan kraniyal kritik kemik defektinde enjeksiyon yöntemi ile yağ grefti uygulaması, radyolojik, makroskopik ve histopatolojik olarak kemik defekt alanında istatistiksel olarak anlamlı bir küçülme sağlamıştır. Bu cevabın alınmasında rol oynayan mekanizmaların net olarak anlaşılabilmesi için ilave çalışmalar gerekmektedir.

2. İNGİLİZCE ÖZET (SUMMARY)

Autologous bone grafts and a variety of alloplastic materials have been frequently used as bone substitutes in treatment of bone defects. Fat injection has been used for a long time in reconstructive and aesthetic purposes in clinical practice and within the last few years its effect on critical cranial bone defects has been studied.

In this study, 32 adult female Sprague–Dawley rats were used. Rats were divided into four groups. In Group 1(n=8) , a critical size full-thickness bone defect(6mm x 5mm) was created on the right side of the parietal bone of each rat. In Group 2(n=8), a critical size full-thickness bone defect(8mm x 5mm) was created on the right side of the parietal bone of each rat. In Group 3 (n=8), a critical size full-thickness bone defect(6mm x 5mm) was created on the right side of the parietal bone of each rat and fat graft was obtained with liposuction technique from the dorsal back of each rat. The fat grafts which was obtained from liposuction, applied to the bone defects. In Group 4 (n=8), a critical size full-thickness bone defect(8mm x 5mm) was created on the right side of the parietal bone of each rat and fat graft was obtained with liposuction technique from the dorsal back of each rat. The fat grafts which was obtained from liposuction, applied to the bone defects. For the evaluation; defect area measurements at 0. 2. 4., 6. and 8. weeks and the closure percentage measurements at 0-4. and 0-8. weeks are compared with radiologic analysis. All of the subjects were sacrificed at the end of 8 weeks. After sacrifice, macroscopic evaluation of the defects and histopathological examination were performed between groups.

After statistical assessment, fat graft applied groups showed significant differences in bone defect healing. At the end of 8 weeks, defect areas of Group 3 and Group 4 were measured to be significantly smaller and their defect closure percentages were established to be statistically significantly higher than Group1 and Group 2. Histopathological examinations supported the increase in osteogenesis in fat graft applied groups.

In conclusion, in experimental rat model, this study shows that radiologically, macroscopically and histopathologically, fat graft application to critical cranial bone defects provided statistically significant lessening on the defect area. Further studies needed to be performed to clearly understand the the precise mechanisms playing role in the establishment of this response.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Baş boyun tümör cerrahisi esnasında, travma, kemik enfeksiyonları sonucunda oluşan ve konjenital anomalilere eşlik eden kraniyal kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla kemik greftleri ve kemik yerini tutabilecek alloplastik materyaller sıklıkla kullanılmaktadır.¹ Alloplastik malzemelerin rezorbsiyon, enfeksiyon ve doku reaksiyonu gibi dezavantajları nedeniyle kullanımı plastik cerrahlar tarafından kısıtlanmıştır.² Bir defektin aynı doku ile onarımı altın standart olduğundan kemik defektlerinin kemik grefti ile onarımı ilk seçenek olmakla birlikte donör alan morbiditesi ve alınacak miktarın sınırlı olması gibi dezavantajları nedeniyle arayışlar sürmektedir. Kemik defektlerinin sekonder iyileşme ile kapanması istenilen ilk seçenek olmasına rağmen belirli büyüklüğün üzerindeki defektler kendiliginden kapanamazlar.³ Örnek olarak sıçanlarda kraniyal kemikler için bu büyüklük 6 mm çapındaki kemik defekti olarak bilinir.^{4,5} Sekonder iyileşmenin beklenmediği bu defektlerin kapanmasını sağlamak amacı ile bir çok teknik denenmişse de son yıllarda giderek artan oranda gündeme gelen mezenkimal hücre kaynaklı kök hücre uygulaması ile olan kemik iyileşmesi konusundaki araştırmalar olumlu sonuçlar bildirmektedir.^{6,7,8}

Mezenkimal kök hücreler kemik, kıkırdak, yağ, tendon, kas gibi farklı mezenkimal dokulara dönüşebilen multipotent, hematopoetik olmayan hücrelerdir.⁹ Mezenkimal kök hücreler kemik iliği, yağ, kas, deri gibi dokularda bulunurlar.¹⁰

Günümüzde yağ dokusunun bu özelliği sayesinde yağ greftleri, miyokard enfarktüsü, spinal cord yaralanmaları ve yumuşak doku onarımları gibi pek çok alanda klinik ve deneysel olarak denenmektedir. Mezenkimal kök hücrelerden elde edilen keratinositlerin veya dermal fibroblastların yara iyileşmesinde, kondrositlerin kıkırdak iyileşmesinde, miyositlerin miyokard iyileşmesinde, retinal pigment epitel hücrelerinin yaşa bağlı maküler dejenerasyonda ve 'Shwann' hücrelerinin santral sinir sisteminin demiyelinizan hastalıklarının tedavisinde kullanımı araştırılmış ve olumlu sonuç alınmıştır.^{7,11,12}

Mezenkimal kök hücrelerin kraniyal kemikler gibi yassı kemikler üzerindeki etkinliğini inceleyen çok az sayıda çalışma vardır.^{7,8,9,12,13}

Son zamanlarda yapılan çalışmalar insan vücudunun en önemli kök hücre deposunun kendi yağ dokusu olduğunu göstermiştir.¹⁴ Kök hücrelerin buldukları

doku ve organlarda hasarların giderilmesinde rol oynadığı ve diğer hücre türlerine ihtiyaç halinde dönüştükleri, apoptozisi inhibe ettikleri ve rejenerasyonu tetikleyici rol oynadıkları bilinmektedir. Günümüzde yağ dokusunun bu özelliği sayesinde yağ greftleri, miyokard enfarktüsü, spinal cord yaralanmaları ve yumuşak doku onarımları gibi pek çok alanda klinik ve deneysel olarak denenmektedir.^{15,16} Yağ dokusu, kolay ulaşılabilirliği, ayrıntılı biyokimsal işlemlerden geçirilmeden hızlı kullanılabilirliği, donör alan çeşitliliği ve kök hücre içeriğinin zenginliği gibi pek çok avantajıyla deneysel çalışmaların kliniğe dönüştürülmesine yardımcı olmaktadır.¹⁷

Estetik amaçlarla başlayan yağ grefti uygulamaları, kök hücre kavramıyla rekonstrüksiyon cerrahisini de içine alarak geniş bir perspektifte plastik cerrahların günlük uygulamalarında yer etmeye başlamıştır.

Kemik defektlerinin onarımında kemik grefti kullanımı altın standart olmasına karşın özellikle donör alan morbiditesine bağlı dezavantajları nedeni ile çok daha kabul edilebilir sınırlarda donör alan morbiditesine sahip yağ grefti uygulamalarının sonuçlarını değerlendirmek üzere bu çalışmayı planladık.

Çalışmamızdaki amaç; oluşturulmuş kraniyal kemik defektinin, multipotent otolog yağ grefti ile doldurulması sonrası, kraniyal kemik defekti onarımını bilgisayarlı tomografiler ile görüntüleme, makroskopik ölçüm ve histopatolojik değerlendirmeler ile ortaya koyarak, ileriye dönük cerrahi tedavi seçeneklerine alternatif bir tedavi yaklaşımı geliştirmektir.

4. GENEL BİLGİLER

KEMİK DOKUSU

İnsan vücudu; hareket sisteminin iskeletini oluşturan kemikler ile bu kemikler arasında hareketlerin gerçekleştirildiği eklemler, kaslar ve bunların koordinasyonunu sağlayan kan, sinir, epitel, lenfatik doku, myeloid doku (kemik iliği) ve yağdan oluşur.¹⁸

Kemik, ekstrasellüler matriksi kalsifiye olan özel bir bağ dokusudur. Vücudun en sert yapısı olmasına rağmen kendi içerisinde dışarıdan gelen kuvvetlerle şekillenebilecek kadar dinamik bir dokudur. Üzerine gelen basınç rezorbsiyona neden olurken, gerilim kuvveti yeni kemik oluşumuna yol açar.¹⁹ Kemik dokusu vücuttaki organları destekleyen ve koruyan bir yapı oluşturmanın yanında, üzerine yapışan kaslar sayesinde hareketlerin oluşturulmasında önemli bir yere sahiptir. Vücut kalsiyum depolarının % 99'unu içerisinde saklar. Aynı zamanda içerdiği kemik iliği sayesinde hematopoetik bir organ gibi davranır.²⁰

Kemik dokusu eklem içi sinovyal yüzeyleri hariç periosteum denen tabaka ile sınırlıdır.

Periosteum kendi içerisinde dışta yoğun fibröz bir bağ dokusu ve içte osteoprogenitör hücreleri içeren hücresel bir tabakadan oluşmuştur.¹⁹ Kemiklerin ortasındaki boşluk tek tabaka osteoprogenitör hücreler ve osteoblastlardan oluşan endosteum tabakası ile örtülüdür.^{21,22}

Kemik dokusu ekstrasellüler kalsifiye matriks içerisindeki hücrelerden meydana gelir.

Kalsifiye matriks esas olarak tip I kollajenden meydana gelen lifsi maddeler ve kondroitin sülfat ve keratan sülfat yan bağları içeren proteoglikanlardan zengin bir yapı içerir. Bunların yanında osteonektin, osteokalsin ve osteopontin gibi glikoproteinler ve kemik sialoproteinlerini de içerir.^{21,22}

KEMİK DOKUSUNUN MİKRO-YAPISAL BİLEŞENLERİ:

Kemiğin mikro-yapısal bileşenleri;²³

- Hücreler
- Organik matriks
- İnorganik matriks
- Çözünebilen sinyal faktörleri

Bu mikro-yapısal bileşenler iki farklı makro-yapıya dönüşür;

- Kortikal kemik
- Kansellöz kemik

Hücreler:

Kemikte herbiri ayrı fonksiyona sahip iki farklı türde hücre vardır;²⁴

- Osteojenik hücreler
- Osteoklastlar

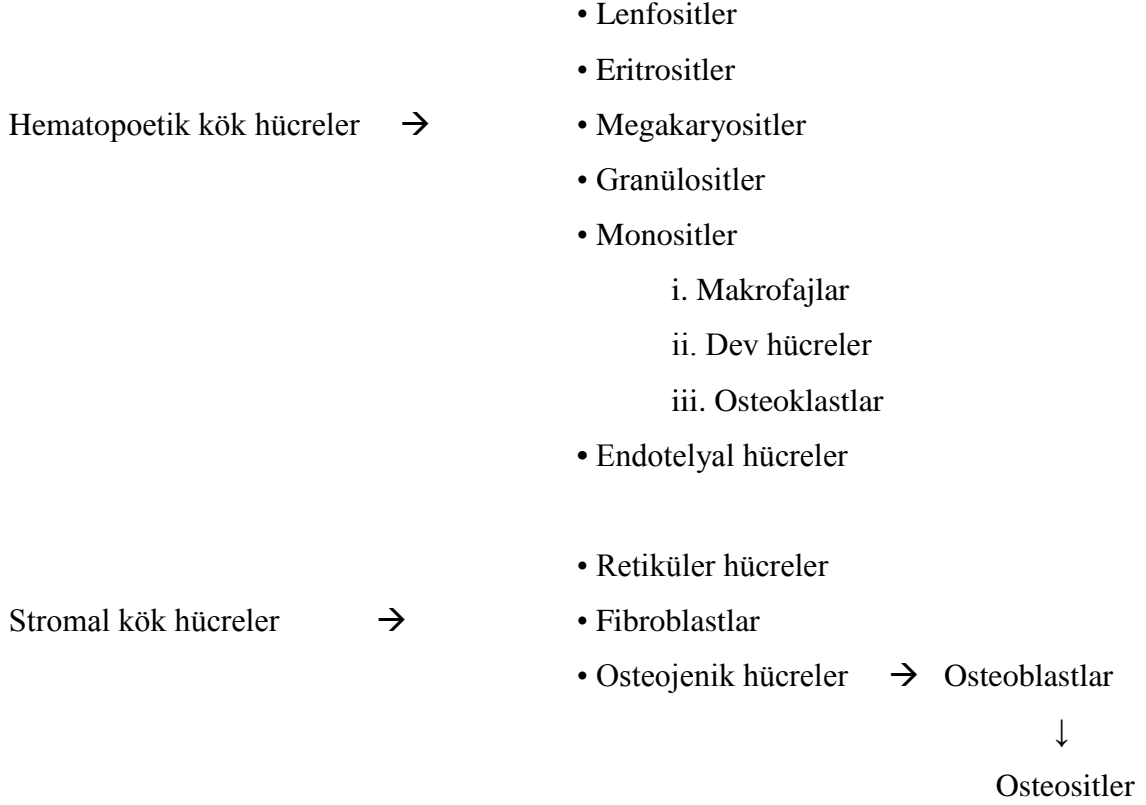
Osteojenik hücreler kemiğin oluşmasından ve devamlılığının korunmasından sorumlu olan osteoprogenitör hücreler, preosteoblastlar, osteoblastlar, osteositler ve kemik yüzeyini döşeyen hücrelerden oluşur.^{25,26}

Osteoprogenitör Hücreler:

Mezenkim kaynaklı ana hücrelerin bir alt grubudur. Mitoz yeteneğine sahip olup, olgun kemik hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptir.²⁵ Bu hücreler kemik yüzeyinde, periostun iç yüzeyinde, endosta ve kompakt kemiğin vasküler kanallarında bulunur.

Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde iki tip osteoprogenitör hücre bulunmuştur. Bunlardan ilki az gelişmiş endoplazmik retikulum ve golgi cisimciği ile tanınan pre-osteoblastlardır. Bu hücrelerden osteoblastlar gelişir. Diğerleri ise belirgin mitokondri ve serbest ribozomları ile tanınan hücrelerdir. Bu hücreler ise osteoklastlara öncülük eder.²⁷

Kemikteki iki ana hücre olan osteoklastlar ve osteoblastlar, kaynağını hematopoetik ve stromal hücre sistemi olarak adlandırılan iki farklı hücre soyundan alır (Şekil-1).^{28,29,30}



Şekil 1. Kemik hücrelerinin kökeni

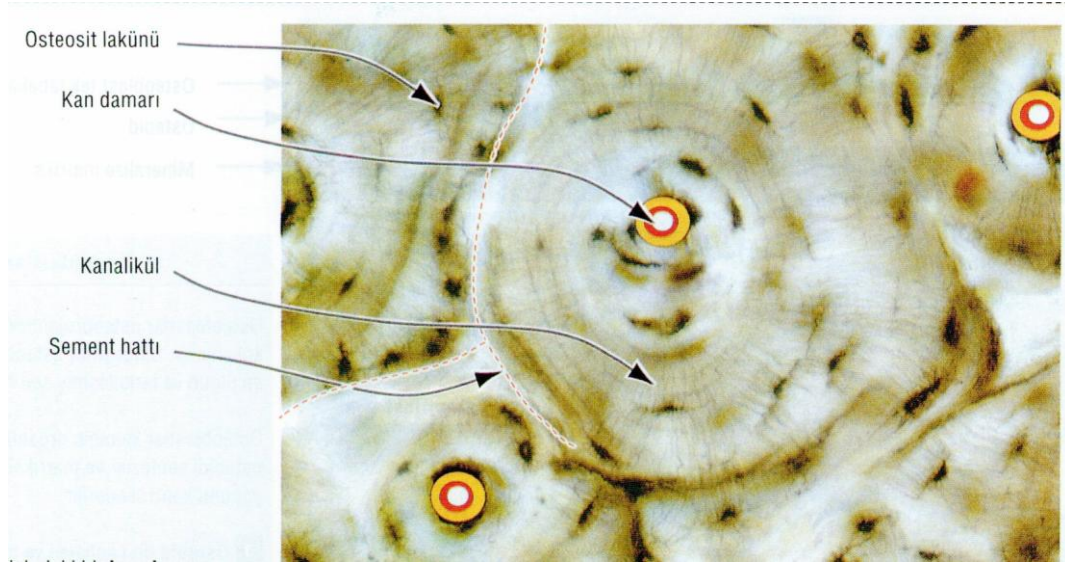
Osteoblastlar:

Osteoprogenitör hücrelerden köken alan bu hücreler tip I kollajen, glikoproteinler, proteoglikanlar ve osteokalsin, osteonektin, osteopontin, osteoprotegrin gibi organik matriks komponentlerinin sentezinden sorumludurlar. Bunların yanında, kemik rejenerasyonunda önemli rol aldıkları düşünülen, kemik morfojenik protein (KMP), transforming büyüme faktörü- β (TGF- β), insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), insülin benzeri büyüme faktörü-II (IGF-II), interlökin-I, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) gibi sinyal proteinlerini salgılar. Mikroskopik olarak bu hücreler iri çekirdeklere ve bazofilik sitoplazmalara sahiptir.^{19,22}

Osteoblastlar kısa uzantılarla komşu osteoblastlara ve uzun uzantılarla da komşu osteositlerle tutunurlar. Bu tutunmalar 'gap junction'lar aracılığı ile olur ve osteositlerle aralarındaki 'gap junction' miktarı osteoblastlarla olduğundan daha fazladır.²¹

Osteoblastın etrafı, salgıladığı ekstraselüler matriks ile çevrilince ‘laküna’ adı verilen boşlukta osteosit halini alır (Şekil-2).

Ekstraselüler matriks kalsifiye olsa da laküna etrafında ‘osteoid’ adı verilen kalsifiye olmamış doku ile kalsifiye matriksten ayrılırlar. Kemik yüzeyindeki osteoblastlar osteoprogenitör hücrelere benzese de bölünme özellikleri yoktur.¹⁹



Şekil 2. Osteosit lakünü (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 121, 2006).

Osteositler:

Osteoblastlar, kemik trabeküllerinin yüzeyinde yer alarak osteoid sentezlerler. Kemik matriksi olan osteoid kalsifikasyona uğrayarak hidroksiapatit kristallerini oluşturur. Bu süreç sırasında bazı osteoblastlar kemik içinde kalarak osteosite dönüşür.²⁹ Kemik canlılığı ve iç denge için çok kritik olan osteositler, metabolik açıdan osteoblastlara oranla inaktif hücrelerdir.

Osteosite dönüşen osteoblastların sayısı kemik oluşum hızına bağlıdır. Oluşum hızı arttıkça bölge hacmi içinde kalan osteosit sayısı da artar.^{31,32} Genel bir kural olarak embriyonik/ağsı kemik, lameller kemiğe göre daha fazla sayıda osteosit içerir. Oluşumlarının ardından osteositler yavaş yavaş matriks üretme yeteneklerini kaybederler ve boyut olarak küçülürler. Zaman içinde çevrelerindeki matriksi rezorbe ederek osteositik lakünleri oluştururlar. Osteositler matriks lamelleri arasında bulunan lakünalar içerisinde bulunur.²³ Her lakünada sadece bir osteosit vardır. Osteositler

osteoblastlarla kıyaslandığında yassı elips şeklindedir. Küçük çekirdekleri ve az sayıda mitokondrili seyrek sitoplazmaları vardır ve golgi kompleksleri ve endoplazmik retikulumları dikkati çekecek kadar küçülmüştür. Çekirdek kromatinleri daha yoğundur. Bu hücreler kemik matriksinin devamlılığında aktif rol alırlar.³³

Kemiğin canlılığı, kemik içinden geçen ve birbirleri ile ilişki halinde olan kanaliküllerin içinde meydana gelen, osteositik sitoplazmik işlemler bütünlüğü içinde sağlanır. Bu yapı, osteositlerin boşluklar sayesinde birbirleriyle ilişkili olmalarını, osteoblastlara sinyal iletimini ve osteoblastlardan da osteositlere iletimini sağlar.²⁴ Osteosit, osteoblast ve osteoklastların birbirleriyle reaksiyonları tam olarak açıklanamamıştır. Ama bu üç hücre kalsiyum regulasyonunda, kemik hemostazında, şekillenme ve yeniden yapılanma aşamalarında yönetici rol oynar.³⁴

Osteositlerin yaşam ömrü birkaç yıldır. Osteositler son üründür ve yenilenemezler. Populasyonun devamı osteoblast prekürsör hücrelerinin differansiyasyonu sonucu olur.³⁵

Osteoklastlar:

Kemik iliğinde bulunan granülosit-makrofaj prekürsörleri, dolaşıma monosit olarak katılırlar ve bazı senkronize olmayan füzyonlar sonucu osteoklast olarak bilinen 100µm'luk çapa kadar ulaşabilen ve yaklaşık 10-12 çekirdek ihtiva eden dev hücrelere dönüşürler.³⁴

Makrofajlardan farklı olarak kalsitonin reseptörleri vardır ve asit fosfataz üretirler.³⁴ İnterlökin 1,3,6 ve 11, tümör nekroze edici faktör-alfa (TNF-α) ile birlikte dönüştürücü büyüme faktörü alfa (TGF-α) osteoklast gelişiminde önemli rol oynar. Tam olarak hangisinin veya hangilerinin daha etkin olduğu bilinmemekle birlikte interlökin 11'in burada temel faktör olduğu düşünülür. Çözünebilen faktörler ile osteoblast ve osteoklast formasyonu arasında bir etkileşim olduğuna dair kanıtlar vardır. 1,25-dihidroksivitamin D3 osteoblastlara bağlanarak progenitör hücrelerine etkili osteoklast differansiyasyon faktör salınımına neden olur. Bu sebeple osteoblastik hücreler osteoklast formasyonu ve oluşumu için kofaktör yaratan bir kaynak olarak düşünülür.³⁶

Morfolojik olarak çok çekirdekli bir dev hücreyi osteoklast olarak tanımlayabilmek için kemiğe tutunmalı ve kıvrımlı bir sınır göstermelidir.³⁵

Paratiroid hormona cevap olarak osteoblastlar kemik yüzeyinden dağılınca, açığa çıkmış mineralize olan osteoid, osteoklastlara iyi bir tutunma alanı sağlar. Tutunma, yüzey adezyon molekülleri ve proteinler arasında olur. Tutunma çevresi tutunma alanı olarak adlandırılır ve bu bölgede kıvrımlı bir sınır gelişir. Bu yapı geçiş ve iletme olanak verir.³⁷

Bu kıvrımlı yapı kemik yüzeyinin enzimatik yıkımının gerçekleştiği osteoklastların rezorbe edici alanını oluşturur. Kıvrımlı sınır ve kemik yüzeyi arasında kalan bu tutunma alanı, bu alanı etraftan ayırarak karbonik anhidraz gibi ortam pH'ını düşürebilen enzimlerin etkili olmasına ve böylelikle kalsiyum ve fosfattan oluşan inorganik matriksin çözünüp proteolitik enzimlerle temasına olanak verir. Organik bileşenlerin sellüler değişimini takiben Howship lakünü olarak bilinen rezorpsiyon kaviteleri ortaya çıkar.³⁴

Bu rezorpsiyon aktivitesi tam olarak açıklanamamış mekanizmalarla kontrol edilmektedir. Ama sellüler aktivasyon, sellüler cevaplar, faktör ekspresyonu, aktivitenin durması ve apoptozisin, osteoblastlar ve osteoklastlar arasındaki dinamik iletişim sayesinde olduğuna dair kanıtlar mevcuttur.³⁸

In vitro olarak paratiroid hormon(PTH) ve 1,25-dihidroksivitamin D3 bulunan kültürlerde bu hücrelerin tek başına kemik rezorpsiyonu yapmadıkları ancak ortama ilave edilen osteoblast sonrasında rezorpsiyona neden oldukları bildirilmiştir (coupling mekanizması).²⁴

Organik Matriks:

Kemiğin kuru ağırlığının % 30 unu oluşturur. Tip I kollajen ve temel maddeden oluşur. Temel madde proteoglikan toplulukları ve bazı özel yapısal glikoproteinlerden yapılır. Bu glikoproteinlerin kalsifikasyonu başlattığı tahmin edilmektedir. Kollajen lifler aynı lamella içinde birbirine paralel ve Havers in kanalına göre de spiral olarak yerleşirler.²⁰

Hidroksiapatit kristalleri üst üste ve yan yana muntazam olarak dizilerek kollajen lifler arasına yerleşirler. Bir sonraki lamellanın lifleri komşu lamelladakine oblik açı yaparlar. Böylece kuvvetler farklı yönlerde dağılarak kemiğin daha az kırılğan olmasını sağlar.²²

İnorganik Matriks:

Kemiğin kuru ağırlığının %70 ini oluşturur. Çoğunluğu kalsiyum ve fosfordan oluşur. Daha az oranlarda bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum da bulunur. Kalsiyum ve fosfor birleşerek hidroksiapatit kristallerini meydana getirir. Kristallerin yüzeyi iyonları içeren su tabakası ile örtülüdür. Bu kabuk hidratasyon kabuğudur ve iyonların hidroksiapatit kristalleri ile vücut sıvıları arasındaki değişimine imkan verir.²⁰

Periost ve Endost:

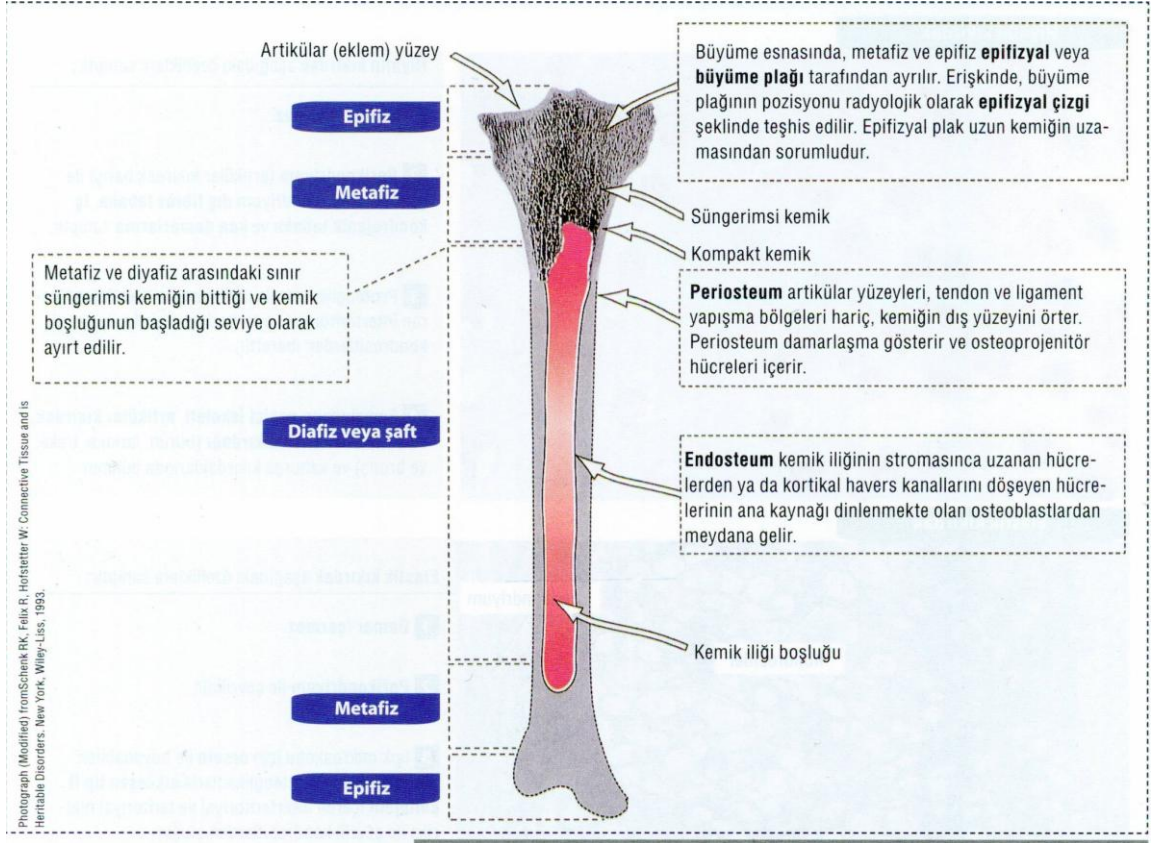
Periost ve endostun temel işlevleri; kemik dokusunun beslenebilmesi, büyüebilmesi ve onarımı için gerekli olan yeni osteoblastları aralıksız olarak sağlamaktır.²²

Kafatası düz kemiklerinin iç ve dış yüzeyleri kalın kompakt kemik plakalarından yapılmıştır. Bu iki plan arasında, yer yer değişen kalınlıkta süngerimsi kemik vardır (diploe). Kafatasını dıştan örten periost perikranyum olarak, iç kısmını örten bölüm ise dura mater olarak adlandırılır. Her iki örtünün de osteojenik yeteneği vardır.²³

KEMİK DOKUSUNUN MAKRO-YAPISAL BİLEŞENLERİ:

Uzun kemiğin shaftına diyafiz adı verilir. Eklem yüzeylerine ise epifiz denir. Büyüme esnasında, metafiz ve epifiz büyüme plağı (epifizyal plak) tarafından ayrılır. Epifizyal plak ile diyafiz arasındaki geçiş yeri metafizdir. Epifizyal plak uzamadan sorumludur. Metafiz bölgesinde süngerimsi kemik kolumnaları bulunur. Diyafiz bölgesi, kasların ve tendonların yapışma bölgesi hariç periosteum ile sarılıdır (Şekil-3).

22



Şekil 3. Uzun kemiğin genel yapısı (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 118, 2006).

Primer Kemik Dokusu(Woven Kemik)

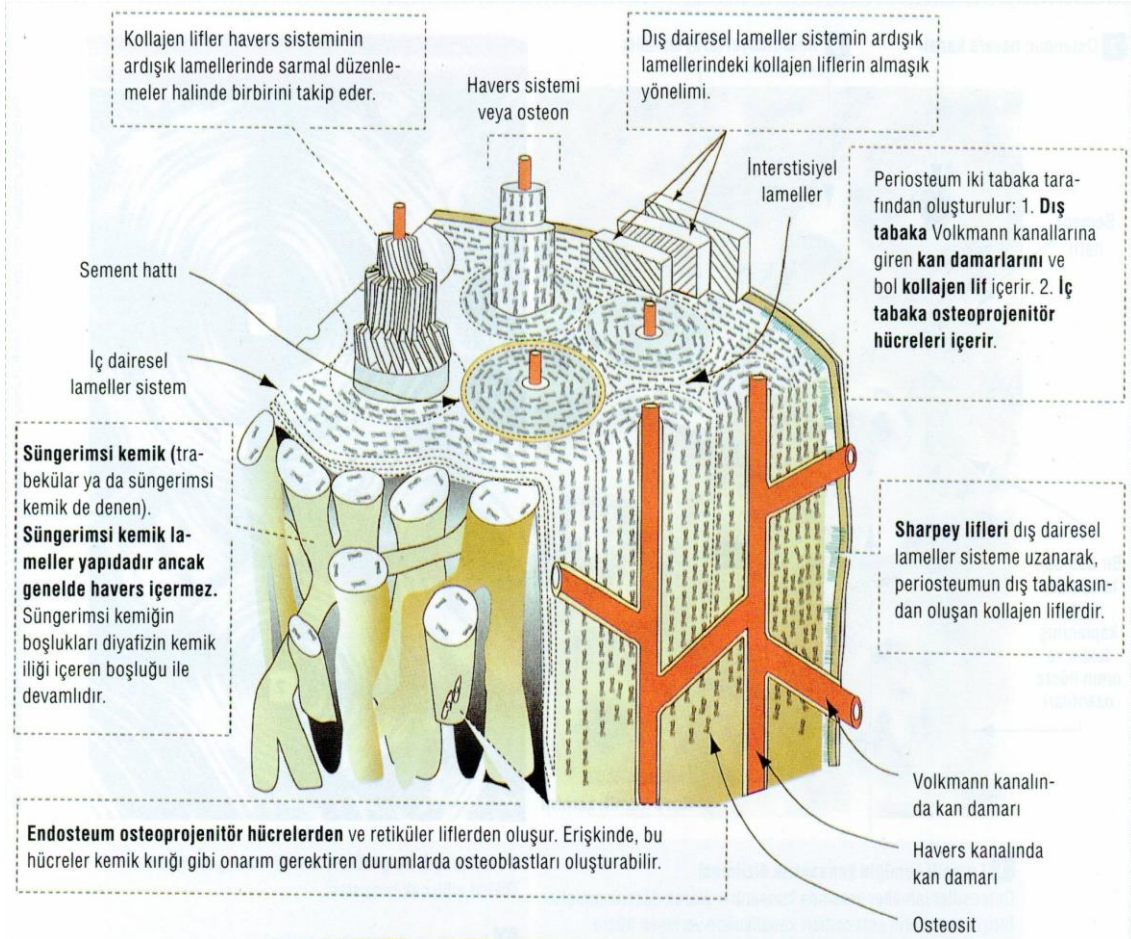
Primer kemik, embriyolojik gelişim sürecinde kırık ve diğer nedenlerle ilişkili onarım işlemlerinde ilk ortaya çıkan kemik türüdür. Embriyonik iskeleti oluşturur ve çoğunlukla 4 yaşından sonra normal kemikte görülmez. Geçicidir ve yetişkinlerde, kafadaki yassı kemik eklemleri, diş alveolleri ve tendonların kemiğe tutunduğu yerler gibi birkaç yer dışında yerini sekonder kemiğe bırakır.³²

Sekonder Kemik Dokusu

Sekonder kemik dokusu genellikle yetişkinlerde bulunur.

Kan damarlarını, sinirleri ve gevşek bağ dokusunu içeren bir kanal etrafını saran, dairesel lamellerin meydana getirdiği bütünlüğe Havers sistemi ya da osteon denir (Şekil-4). Osteositleri içeren lakünalar, lamellerin arasında ve seyrek olarak da içinde

bulunur. Her lamelde kollajen lifler birbirlerine paraleldir. Her Havers sisteminin etrafı birkaç kollajen lif ve mineralize amorf matriksten oluşan yapıştırıcı madde ile çevrelenir.³⁹ Lameller kemik yetişkin kemiğinde kortikal (kompakt) kemik ve kansellöz (spongiöz ya da trabeküler) kemik olarak iki farklı yapıdadır.



Şekil 4. Havers sistemi veya osteon yapısı (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 119, 2006).

Kansellöz Kemik:

Çok ince kemik iğciklerinin (trabeküla) oluşturduğu labirent ağın içindeki küçük boşluklar ile süngerimsi görünüm kazanır. Bu boşluklara kemik iliği yerleşir. Kemiğin uç kısımları (epifiz) süngerimsi kemikten oluşmuştur. Süngerimsi kemiğin içindeki boşluklar diaforindeki büyük kemik iliği boşluğu ile irtibattadır. Böylece kemik iliği dokusunun devamlılığı sağlanır.

Kortikal Kemik:

İskelet sisteminin %80'inini oluşturur; kemiklerin dış ve iç tabakalarını meydana getirir. Kortikal kemikteki haversian sisteminin (osteon) fonksiyonu biyofonksiyonel kuvvetlere cevap vermek için düzenlenmiştir. Her havers sistemi uzun, sıkça dallanan ve diyafizin uzun eksenine paralel olan bir silindir şeklindedir. Bir haversian sistemi yaklaşık 4 ila 20 çevereleyen halkadan meydana gelir ve santral kanalı 22 ila 110 µm'lik çaplarda lameller çevreler. Havers sistemleri, dış dairesel lameller, iç dairesel lameller ve interstisyel lamellerden ibaret tipik bir düzenlenim gösterir. Endost ile örtülü her kanal içinde kan damarları, sinirler ve gevşek bağ dokusu bulunur. Havers kanalları, yatay ya da oblik seyreden Volkman kanalları aracılığı ile kemik iliği boşlukları, periosteum ve kendi aralarında iletişim kurmaktadır. Volkman kanallarının dairesel lamelleri yoktur, lamelleri delerek geçerler.²³

KEMİK OLUŞUMU

Kemikler embriyonik gelişimde iki farklı yolla oluşurlar.

- İntramembranöz kemikleşme
- Endokondral kemikleşme

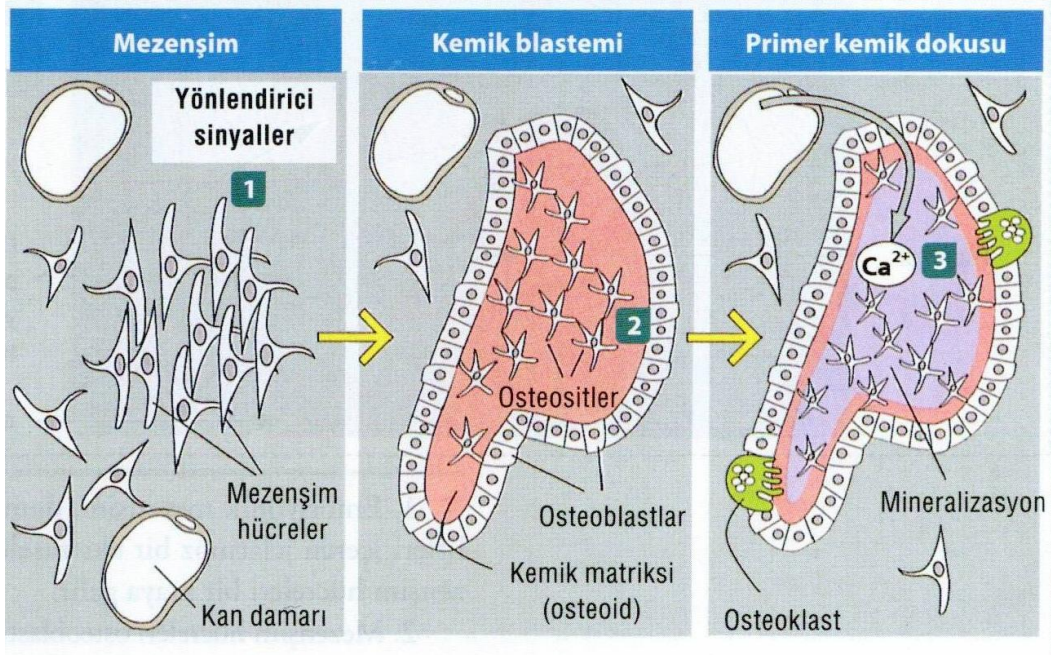
İntramembranöz Kemik Oluşumu

Yassı kemiklerin ve karmaşık yapılı kemiklerin yassı kısımları bu yol ile gelişir. Organizmada kafatası, sternum, pelvis gibi yassı kemiklerde, yüz kemiklerinde, mandibulanın 'processus coronoideus ve simfizisi' dışındaki bölgelerinde, kısa ve uzun kemiklerin kompakt kısımlarında görülür. Kemiğin gelişeceği yerdeki mezenkimde zengin damarlanma ile yoğunlaşma başlar. Burası primer kemikleşme merkezidir. Mezenkimal hücreler osteoblastlara farklılaşarak kemik matriksi oluştururlar. Trabeküllerin kollajen yapıları birbirine paralel yapıda değildir. Kalsifikasyon ve osteoid oluşumunu takiben osteoblastlar osteosit haline gelir.²²

Primer kemik açığa çıkmaya başlamıştır. Kısa bir süre sonra ışımsal olarak büyümeye başlayan primer kemikleşme merkezine kemik iliği temel hücreleri ve monositler taşınır. Monositler birleşerek osteoklastları meydana getirirler ve henüz

gelişen matriksin yıkımı ile yeniden modellenmeyi başlatırlar. Açılan boşluklar kan damarları, kemik iliği ve farklılaşmamış hücreler ile dolar (Şekil-5).

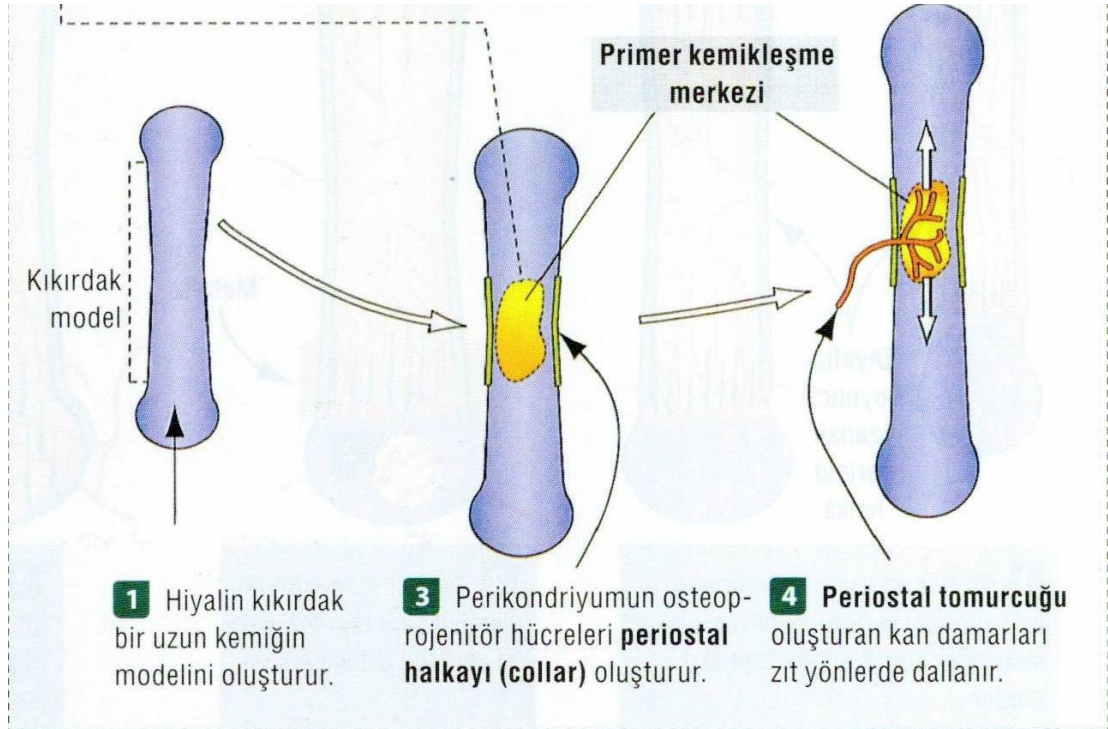
Meydana getirilecek kemik aynı anda birkaç yerinde primer kemikleşme merkezinin faaliyeti ile oluşan adacıkların ışınsal büyümeleri ve birbirleri ile kaynaşması sonucu ortaya çıkar. Adacıklar ışınsal olarak genişledikçe süngerimsi kemik ortaya çıkar.¹⁹



Şekil 5. İntramembranöz kemikleşme (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 131, 2006).

Endokondral Kemik Oluşumu

Uzun kemikler, sfenoid kemiğin yassı olmayan kısımları, temporal kemiğin petrosusu, oksipital, inkus, stapes, malleus, vertebralar, pelvis, kol ve bacak kemikleri gibi uzun kemikler endokondral kemikleşme ile meydana gelir. Önceden oluşacak kemiğe benzeyen küçük bir model hyalin kıkırdaktan yapılıdır. Kemikleşme bu kıkırdak modelin içinde gerçekleşir (Şekil-6).²³



Şekil 6. Endokondral kemikleşme:Primer kemikleşme merkezi (Kierszenbaum A.L. Histoloji ve Hücre biyolojisi: Patolojiye giriş, Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir, sayfa 133, 2006).

Mezenkimal hücreler vaskülarisazyondan yoksun uzuv merkezlerinde kondrojeniktirler. Embriyogenez sırasında kondrojenik yapıdaki hücreler primer olarak tip II kollajen içeren kıkırdak bir yapı üretir. Çok az miktarda Tip I kollajen (özellikle kemik ile ilgilidir), Tip IV kollajen (özellikle endotelial bazal lamina) ve Tip X kollajen de (hipertrofik kondrositler ve kalsifiye kıkırdak) ortamda bulunur.³⁹ Embriyolojik gelişimin uygun zamanında kıkırdak yapı kondrolizi takiben kalsifikasyonun habercisi olarak damarlanır. Kıkırdak alanlarda bulunan antianjiyojenik faktörler damarlanmayı engelledikleri için kıkırdak hücrelerinin ve matriksin kondroliz esnasında ortadan kaldırılması, FGF'lerin pre-osteojenik bölgelerde yarattığı damarlanmaya meyilli bölge ortamının bir benzerini yaratır. İnterlökin gibi sinyal moleküller sonucu osteoklastik differansiyasyon ve bunu takiben rezorpsiyon başlar.

Mineralize kıkırdağın rezorpsiyonunu takiben hematopoetik kemik iliği gelişir ve bu kaviteyi de daha sonra kemik formasyonu çevreler.³⁹

KEMİK İYİLEŞMESİ

Kafatası kemikleri ve yüz kemiklerinin çoğu membranöz kemik kaynaklıdır. Mandibula ve kafa tabanının bazı kemikleri membranöz ve enkondral kemiklerin kombinasyonudur.

Membranöz kaynaklı kemik (yüz ve kafatası kemiklerinin nerede ise tamamı) kırıklarında şiddetli ağrı olmaz. Enkondral kaynaklı (uzun iskelet kemikleri) kemiklerin kırıkları ağrı şokuna neden olabilecek şiddette ağrı oluştururlar. Membranöz kaynaklı kemikler fibröz iyileşme gösterirler, kallus oluşmaz.⁶⁴

Enkondral kaynaklı kemiklerdeki iyileşme çok sayıda araştırmaya dayanarak iyi bilinmesine karşın membranöz kaynaklı kemiklerdeki iyileşme süreci hakkında henüz derin bilgilere sahip değiliz. Kemik çevresel etkilere çok yönlü adaptasyon kabiliyetine sahip kompleks bir yapıya sahiptir. Modeling iskeletsel büyüme esnasındaki değişikliklere, remodeling yeni kemik matriksinin osteoklastik rezorpsiyon ve osteoblastik sentezinin kombinasyonu ile erişkin hayatı boyunca meydana gelen sürekli kemik değişikliklerine, Coupling ise matür kemiklerdeki kemik resorpsiyonun miktarı kadar kemik oluşumunu tanımlayan hayat boyu homeostatik süreçte verilen addır. Kemik oluşumu hormonlar tarafından osteoprogenitör hücreler veya osteoblastları oluşturmak üzere lokal büyüme faktörlerinin uyarılması sonucunda olur. Osteoblastlar endosteal, periosteal veya uyarılmış kaynaklardan meydana gelir. Osteoblastlar matriks (osteoid) içinde yer alırlar ve matür matriks tarafından sarıldıklarında (minerilizasyon) osteositlere dönerler. Osteoprogenitor hücreler, endosteal örtü hücreleri, osteoblastlar ve osteositler muhtemelen ilkel mezankimal hücrelerin bir kısmından (dizisinden) meydana gelirlerken, osteoklastlar ise ekstriskeletsel (iskelet-kemik dışı) kan üreten prekürsörlerden meydana gelirler. Osteoblastların protein mediatörleri vasıtası ile osteoklastları uyardıklarına inanılır. Mezankimal prekürsörler (osteoprogenitör hücreler) yeniden kemik oluşma bölgesinde preosteoblastlar ve daha sonra osteoblastlar olmak üzere uyarılırlar ve matrix salgılamaya başlarlar. Hücreler matriks tarafından tamamen sarıldıkları zaman kemiğin kanaliküler süreci vasıtası ile diğer biri ile bağlantı kuran matür osteositler haline gelirler. Osteoklastlar stem (kök) hücrelerinin ayrı bir kısmından (dizisinden) meydana gelirler. Kemik büyük bölümü hidroksiapatitten oluşan kalsiyum tuzlarından meydana gelen inorganik matriks ve deri ile skleranın bağ dokusu komponentlerine benzeyen kollajen, glikoproteinler ve

proteoglikanlardan meydana gelen organik matriksten oluşur. Kemik matriksi mineralize olurken diğer doku matrikslerinin niçin mineralize olmadığı bilinmemektedir. Muhtemeldir ki kemik hücreleri matriksi kalsifikasyona ve üç boyutlu yapıya dönmeye eğilimli matriks yapan spesifik büyüme faktörleri üretme kabiliyetine sahiptir.⁶⁴

Kemik kırıldığında kemik matriksi hasara uğrar. Kırık yerindeki damarlardan kanama başlar, yaralanma yerinde kan pıhtısı oluşur. Kırık sınırındaki kemik hücreleri ölür. Belirli bir süre sonra kan akımı durur ve hasarlı bölgeden geriye, anastamoz damarlarına doğru yeni bir kan akımı başlar. Bunun sonucu hasar her iki tarafta genişler. Lakünalar içindeki osteositler lizise uğrar. Kırık bölgesindeki kan pıhtısı içine çevre dokudaki küçük kılcal damarlar girerek granülasyon dokusunu oluştururlar. Aynı işlem kemik iliğindeki kan pıhtısında da olurken endosteum ve kemik iliğindeki osteoprogenitör hücreler çoğalarak 1 hafta içinde iç kallusu yaparlar.²²

Yaralanmadan 48 saat sonra periosteum altındaki ve endosteumdaki osteoprogenitör hücrelerin mitotik aktivitesi artar. Periosteum altında çoğalan osteoprogenitör hücrelerin kemiğe en yakın kısımları osteoblastlara dönüşerek kemik manşet yapmaya başlarlar. Kılcal damarların büyümesi osteoprogenitör hücre çoğalmasından daha yavaş olduğu için ortada kalan prolifer olmuş osteoprogenitör hücreler azalmış oksijen konsantrasyonunda kondrojenik hücreler ve kondroblastlara dönüşerek kemik mantonun dış tabakasında kıkırdak yaparlar. Çoğalmış osteoprogenitör hücrelerin periosteuma yakın kısımlarındaki hücreler komşuluğundaki fibröz periosteumdaki kılcal damarlar sayesinde osteoprogenitör hücrelere dönüşürler.^{22,35}

Her iki uçtaki bu manto tabakası birleşerek dış kallusu oluşturur. Ortadaki kıkırdak enkondral kemikleşme yolu ile bunun etrafındaki tabakalar ise intramembranöz kemikleşme yoluyla kemikleşerek dış kemik manto büyür. Kırık uçları kansellöz kemik ile birleştikten sonra, primer kemik yapısının sekonder kemik yapısı ile yer değiştirmesiyle yeniden şekillendirilme sağlanır. Bölge üzerine etki eden kuvvetler kallusun yeniden modellenmesine yardımcı olur. Diğer bağ dokularının iyileşmesi sonunda oluşan nedbe dokusu kırık iyileşmesinde görülmez.^{22,35}

KRİTİK BÜYÜKLÜKTE KEMİK DEFEKTİ

Kranium (kalvariya) canlılarda vücudun önemli bir parçasını teşkil etmektedir.⁴⁰ Çok çeşitli ve genellikle çift ve simetrik olan kemiklerden oluşur. Kalvariya kemiklerinin çok farklı özellikler taşıdığı bilinmektedir.

Herşeyden önce, diğer kemiklere göre biyolojik olarak daha inertlik gösterirler. Bu özellik zayıf bir kanlanma ve az miktarda olan kemik iliğiyle bağlantılıdır.⁴¹

Kanlanması da özel bir yapı gösterir. Deney hayvanlarındaki kranial defektlerin rejeneratif kapasiteleri insanlarındakinden daha iyi olduğu bilinmektedir. Kalvariya, morfolojik ve embriyolojik açıdan bir membran prosesünden gelişim gösterir ve bu nedenle de yüz bölgesinde yer alan membranöz yolla gelişmiş diğer kemiklerle benzerlik gösterir. Anatomik olarak kalvariya iki kortikal tabaka içerir ve bu açıdan da mandibulaya benzerlik gösterir. Fizyolojik olarak da kalvariya kortikal kemik atrofik bir mandibulaya benzerlik gösterir.⁴¹

Freeman ve Turnbull, ratlarda kritik boyutlu defekt anlamındaki defektlerde çalışmış ilk araştırmacılarıdır. Çalışmalarında Wistar albino ratların parietal kemiklerine açtıkları 2 mm çapındaki deneysel defektleri iyileşme yönünden araştırmalarıdır. 12 hafta sonunda belirgin bir iyileşme olmadığı gözlemlenmiştir.^{42,43}

Benzer olarak Mulliken ve Glowacki; Charles River ratlarında 2 mm lik parietal kemik defektlerini incelemişlerdir. Bunlarda kontrol defektlerinde 6. ayın sonunda bir kemik dolumu bulamazlarken, demineralize kemik pudrası uyguladıkları deney grubunda kemik yapımına rastladıklarını rapor etmişlerdir.^{44,45}

1982'de Takagi ve Urist, 6 aylık Sprague Dawley ratlarında bu defa 8 mm'lik defektler açıp, sonuçları histolojik yönden değerlendirmişlerdir. Defektlerin kemik iyileşmeyle, çaplarının 5 mm ye düştüğü gözlenmiştir. Bu iyileşmenin daha çok kemik marjiniinden başlayarak defektin merkezine doğru uzandığı ifade edilmiştir. Defektlerin merkezi ise fibröz dokuyla iyileşme göstermiştir. Halbu ki kemik morfogenetik protein uygulanmış deney defektlerinde neredeyse tamama yakın bir iyileşme gözlemlendiğini belirtmişlerdir.⁴⁶

Konuyla ilgili çok sayıda çalışma birbirini izlemiştir. Bu ilerleme süreci esnasında farklı olarak elde edilmiş sonuçlar, defekt modelinin nasıl olması konusunda spekülasyonları beraberinde taşımıştır. Parietal bölgeye açılan defektlerin tabanında

dura mater, üzerinde ise periost bulunmaktadır. Her iki doku da, kemik oluşumuna öncülük edecek osteoprogenitör hücreleri içermektedir. Ancak, bu iki dokunun rolleri henüz tam olarak netlik kazanmamıştır.⁴⁷

Bou-Abboud Naaman ve ark. ratlarda 8 mmlik kranial defektler açarak doğal mercan uygulamışlardır. Aynı zamanda doğal mesh de ilave etmişlerdir. Çalışma sonucunda uygulanan bu bariyerin kemik oluşumuna ilave bir katkıda bulunduğu gösterilmiştir.⁴⁸

Buna karşın Schmitz ve ark. ise, 3, 4, 5 ve 8 mm lik defektlerde çalışma yapmışlar ve 8 mm lik defektin ideal bir defekt olduğunu savunmuşlardır. Buna göre kritik büyüklükteki kemik defekti ‘organizmanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki kemik içi defekt’ olarak tanımlanmıştır.⁴⁹

Dupoirieux ve ark. ratlarda 6 mm’lik parietal defektlerde membran ve pentosan polisulfat kullanarak yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tekniği ile çalışmışlar ve sonuçta bir örnek dışında tam bir iyileşme olmadığını bildirmişlerdir.⁵⁰

YAĞ DOKUSU

Yağ dokusu insan vücudunun en büyük statik enerji deposu olarak bilinmektedir. Bununla birlikte yağ dokusu; steroid üretiminde, termoregülasyon, sıvı ve elektrolit dengesinde metabolik olarak etkin rol alırken, yapısal destek ve hayati organların korunmasında da önem arz eder. Son yüzyılda elde edilen bu teorik bilgiler, güncel çalışmalar ışığında son dönemde, yağ kaynaklı kök hücre (ADSC’s) kavramının ortaya çıkması ile yeni bir bilimsel boyut kazanmıştır.¹⁴

Yağ dokusu embriyonik mezodermden gelişmiştir. Heterojen stromal hücre popülasyonuna sahip bir dokudur. Bu özelliği ile yağ dokusu, kök hücreden zengin olduğunu bilinen kemik iliği dokusu ile benzeşmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, yağ dokusunun adipositler dışında, preadiposit, endotelial hücreler, düz kas hücreleri, fibroblastlar ve multipotent yağ kaynaklı kök hücre (ADSC’s) gibi hücreleri ihtiva ettiğini ortaya çıkarmıştır. Kök hücreler bilindiği üzere, diğer hücrelerden farklı olarak, kendi ve farklı türdeki hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip hücrelerdir. ADSC’s lipoaspirat materyalinin stromal - vasküler fraksiyonunda bulunmaktadır. Bu mezenkimal kök hücrelerin kemik, kas, kıkırdak, sinir, kan damarları, v.s gibi birçok mezodermal kaynaklı dokuya dönüşebildiği in vivo ve in vitro deneyler sonucunda

kanıtlanmıştır. Bunun yanında yağ dokusundaki mezenkimal kök hücre miktarının sayısal olarak kemik iliğindeki kök hücre miktarının yaklaşık 500 katı olduğu ortaya konmuştur. Yapılan çalışmalar yağ dokusu içerisindeki bu hücrelerin, anjiyojenik ve antiapoptotik salgılarında olduğunu göstermektedir.¹⁴ Tüm bu bilgiler toplandığında, kök hücre potansiyeli olan yağ dokusunun kullanılarak, verildiği dokularda yeni damar oluşumunu sağlayıp kan damarlanmasını arttırabileceği, hasarlanmış dokuları tamir edip, eksikliklerin giderilebileceği fikri ortaya atılmıştır.^{15,16}

Plastik cerrahi tarihinde ilk yağ dokusu transferi, 1893 yılında Gustav Neuber tarafından uygulanmıştır. Neuber, hastasında osteomyelitte sekonder gelişen, orbita alt sınırındaki nedbe dokusunun altına, koldan aldığı yağ parçalarını yerleştirilerek başarılı bir estetik sonuç elde ettiğini bildirmiştir. Takiben 1895 yılında Vincenz Czerny, kalçadan eksize ettiği lipom kitlesini, fibrokistik mastit nedeniyle gland eksizyonu yaptığı hastasının memesine yerleştirmiştir.

Yağ dokusunu enjeksiyonla verme fikri ise ilk olarak 1911'de Eugene Hollander tarafından ortaya atılmıştır.

Takiben 1919 yılında ise Erich Lexer tarafından klinik uygulaması tariflenmiştir. 1950 yılında inanışların aksine, Lyndon A. Peer yaptığı çalışmayla, yağ grefti sonrası verilen yağ miktarının %45'inin yaşadığını göstermiştir.

1980 yılında Pierre Fournier ve Yves-Gerard Illouz tarafından liposakşın yönteminin tanımlanmasıyla, plastik cerrahlar arasında otolog yağ grefti kullanımı artarak popülerlik kazanmaya başlamıştır.

1990 yılında Sydney R. Coleman'ın tecrübeleri ışığında yağ grefti alımı, hazırlanması ve enjeksiyonuna getirdiği açılımlarla, yağ enjeksiyonu günümüze kadar plastik ve estetik cerrahide vazgeçilmez bir girişim olarak ilk sıralarda yerini almıştır.^{16,17}

5. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı'nın 26/05/2011 tarih ve 2011/69 sayılı izni ile, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvar'ında gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen, 32 adet Spraque-Dawley tip dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar uygun kafeslerde, $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta ve 12 saat karanlık - 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Deneklerin beslenme ihtiyaçları %18-20 protein içeren pellet sıçan yemi ve içme suyu verilerek düzenli olarak karşılandı.

Denekler 4 gruba ayrıldı;

GRUP 1 (Kontrol 1 Grubu – 8 adet):

Oluşturulan 6 mm x 5 mm dikdörtgen, tam kat kemik defektlerine ek bir işlem yapılmadı. İşlem sonunda periost, oluşturulan defekt üzerine örtülerek 6/0 eriyebilen örgülü dikiş ile dikildi. Deri insizyonu 5/0 eriyebilen monofilaman dikiş ile kapatıldı.

GRUP 2 (Kontrol 2 Grubu – 8 adet):

Oluşturulan 8 mm x 5 mm dikdörtgen, tam kat kemik defektlerine ek bir işlem yapılmadı. İşlem sonunda periost, oluşturulan defekt üzerine örtülerek 6/0 eriyebilen örgülü dikiş ile dikildi. Deri insizyonu 5/0 eriyebilen monofilaman dikiş ile kapatıldı.

GRUP 3 (Deney 1 Grubu – 8 adet):

Oluşturulan 6 mm x 5 mm tam kat kemik defektleri 1 cc yağ grefti ile dolduruldu. İşlem sonunda periost, yağ grefti üzerine örtülerek 6/0 eriyebilen örgülü dikiş ile dikildi. Deri insizyonu 5/0 eriyebilen monofilaman dikiş ile kapatıldı.

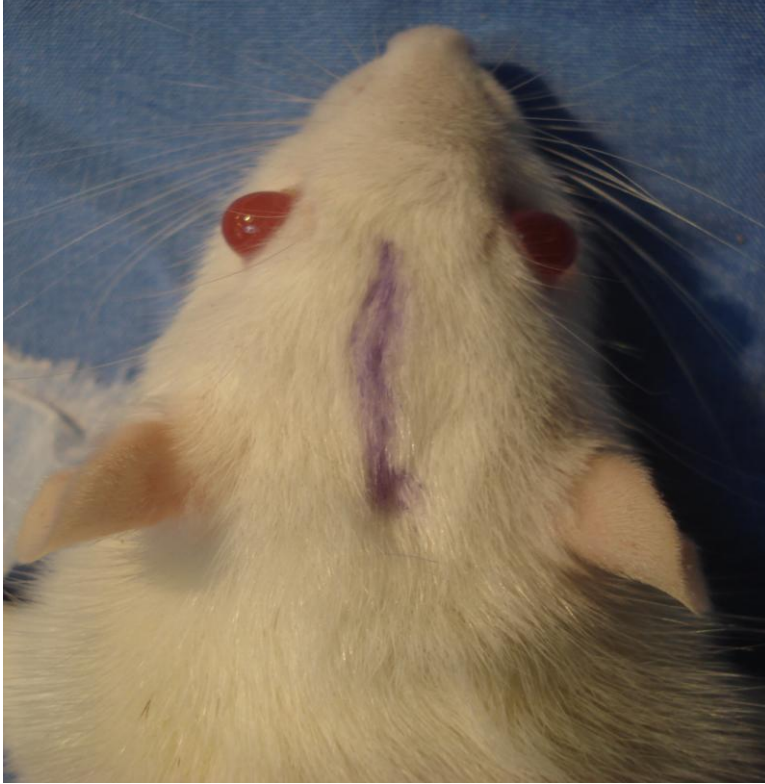
GRUP 4 (Deney 2 Grubu – 8 adet):

Oluşturulan 8 mm x 5 mm tam kat kemik defektleri 1 cc yağ grefti ile dolduruldu. İşlem sonunda periost, yağ grefti üzerine örtülerek 6/0 eriyebilen örgülü dikiş ile dikildi. Deri insizyonu 5/0 eriyebilen monofilaman dikiş ile kapatıldı.

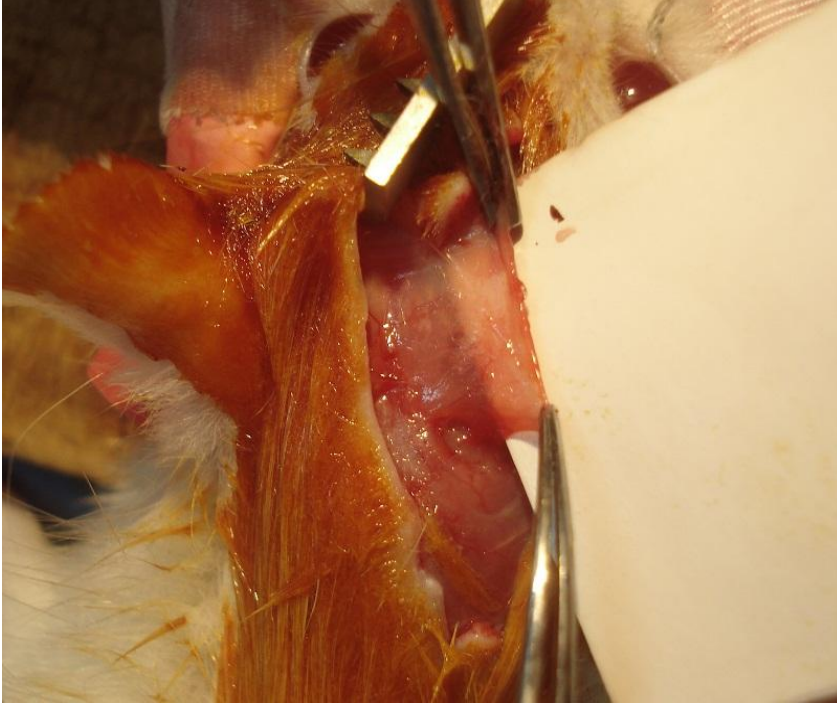
5.1. Kemik Defekti Oluşturulması

Deneklere intraperitoneal (i.p) yoldan Ketamin-HCl (Ketalar®) (50 mg/kg) + Xylasine (Rompun®) (5 mg/kg) anestezisi uygulandı. Deneklerde kafa derisi enseden

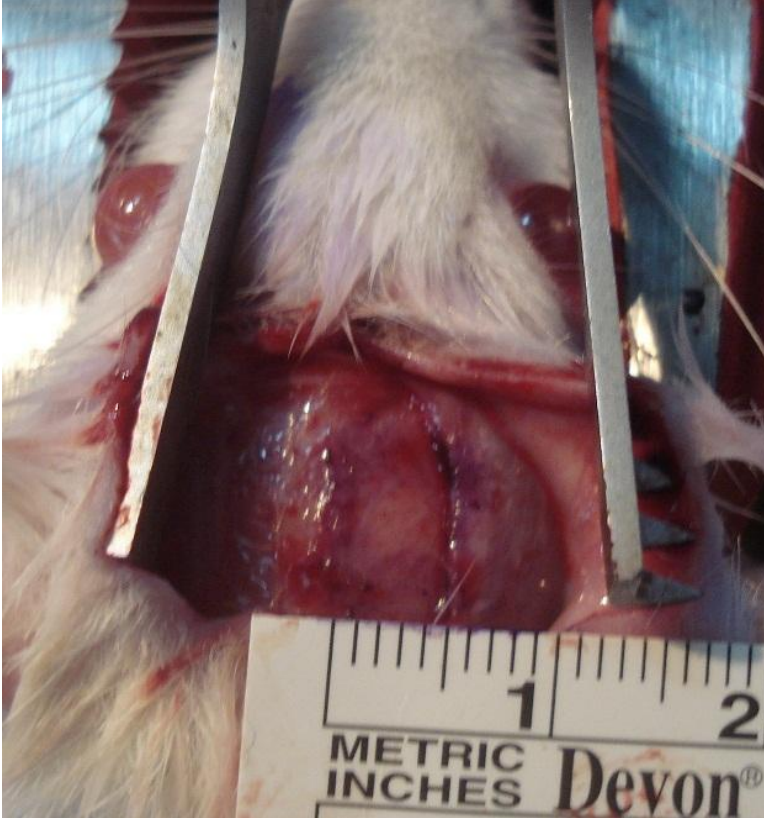
alına kadar tıraş edilerek %10'luk 'povidon iodine' solusyonu ile antisepsi sonrası orta hat vertikal deri insizyonu yapılarak fronto-parietal kemikler ortaya çıkartıldı (Şekil-7). 15 no lu bistüri ile periost flebi insize edildi. İnce periost elevatörü ile periost flepleri kaldırıldı (Şekil-8). 220 V,50 Hz, 125 W ve 15000 d/dak özellikli Universal BM21A tur motoru kullanılarak 5000 devir/dak yı aşmayacak şekilde sağ parietal kemikler üzerinde Kontrol 1 ve Deney 1 gruplarında 6 mm x 5mm lik, Kontrol 2 ve Deney 2 gruplarında 8mm x 5 mm lik dikdörtgen, tam kat kemik defektleri oluşturuldu (Şekil-9,10). İşlem sırasında dura intakt bırakıldı (Şekil-11). İşlem sonunda Kontrol 1 ve Kontrol 2 gruplarında periost, oluşturulan defekt üzerine tekrar örtülerek 6/0 eriyebilen örgülü dikiş ile dikildi.



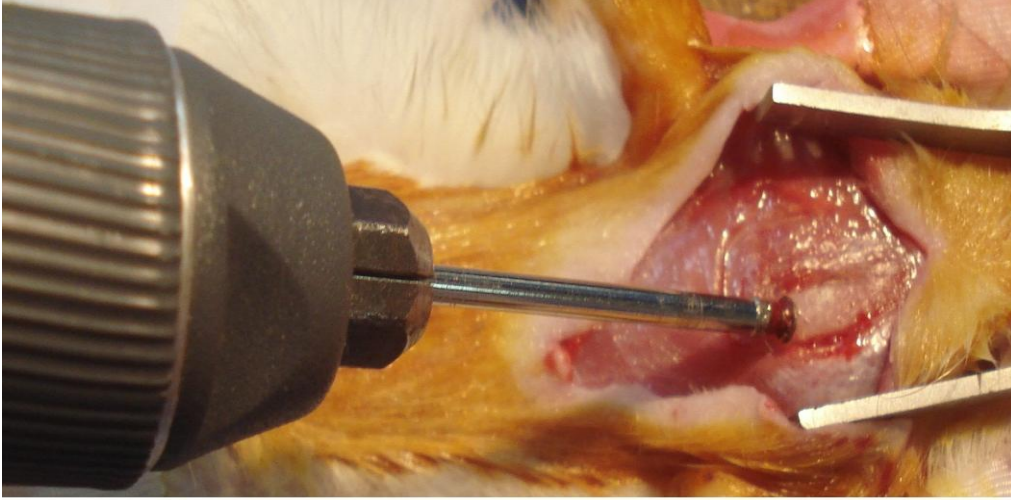
Şekil 7. Kranium orta hatta yapılan vertikal deri insizyonu.



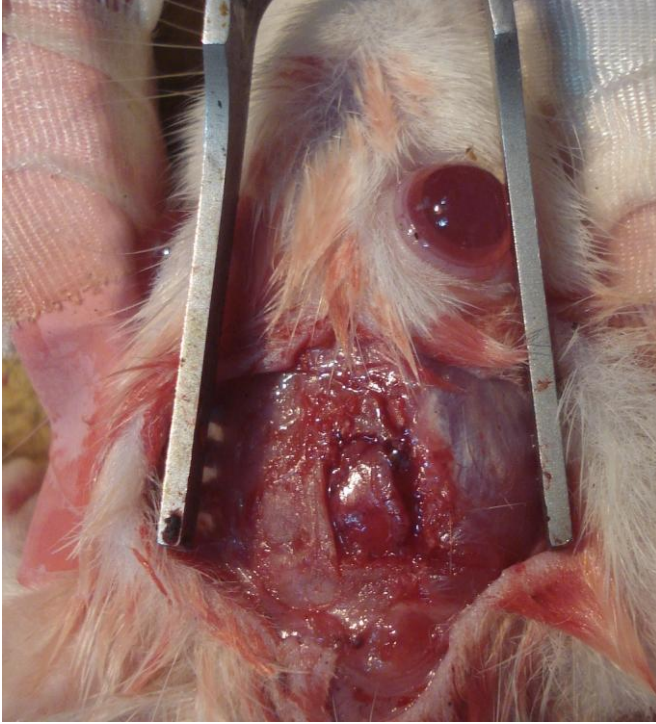
Şekil 8. Hazırlanmış olan periost flebi.



Şekil 9. Oluşturulacak olan kemik defekti ölçümleri.



Şekil 10. Defektin tur ucu ile oluşturulması.



Şekil 11. Oluşturulmuş defekt alanı.

5.2. Yağ Grefti Alınması, Hazırlanması ve Uygulanması

Deney 1 ve Deney 2 gruplarındaki toplam 16 adet sıçan intraperitoneal (i.p) yoldan 75 mg / kg Ketamin (Ketalar®) ve 10 mg / kg Xylazine (Rompun®) enjekte edilerek uyutuldu. Deneklerin kranial kemik defekti oluşturmak için açılmış olan mevcut insizyonlarından girilerek aynı seansta 5 cc infiltrasyon solusyonu (Oda sıcaklığındaki 1 litre Ringer Laktat solüsyonunda 30cc %1 lidokain, 1cc 1/1000'lik

adrenalin olacak şekilde) subkutan olarak gövde dorsal alana verildi. İnfiltrasyon işlemi için 2mm çaplı, künt uçlu 25cm uzunluğunda, çok delikli, 10cc şırınga sistemine takılmış infiltrasyon kanülü kullanıldı (Şekil-12).



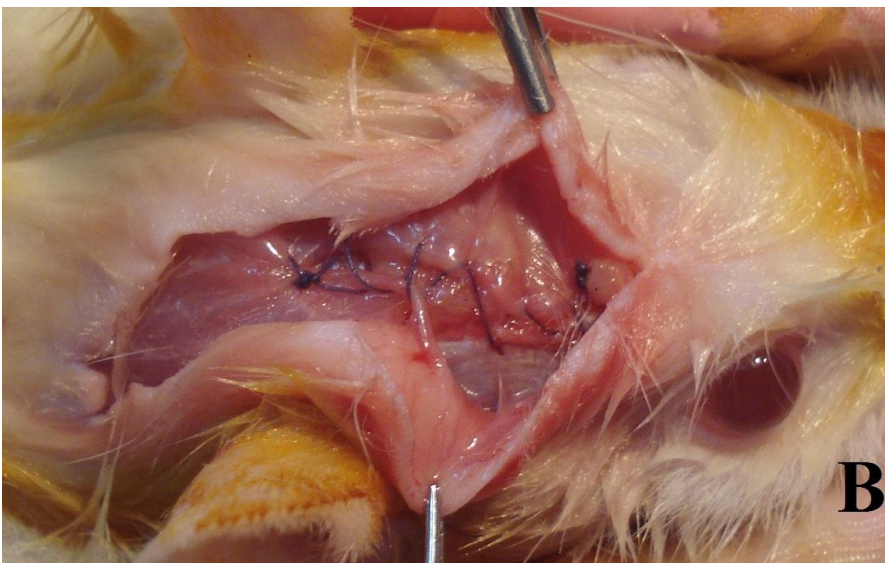
Şekil 12. İnfiltrasyon solüsyonu ve kanülü.

Liposakşın işlemine, her denekte infiltrasyon sonrası 10 dakika beklendikten sonra başlandı. İşlem ortalama her denekte 30 dakika sürdü. Mevcut insizyondan girilerek, liposakşın işlemi infiltrasyon yapılan alan sınırlarında tamamlandı. İşlem sırasında 2mm çaplı, künt uçlu 25cm uzunluğunda, vakum oluşturularak 10cc 'lik şırınga sistemine takılmış aspirasyon kanülü kullanıldı. Deneklerden ortalama 5cc lipo-aspirasyon materyali elde edildi (Şekil-13).



Şekil 13. Lipo-aspirasyon materyali.

Elde edilen lipoaspirat, aynı seansta steril gazlı bez üzerinde serum fizyolojik ile yıkanıp süzülerek kan ve debrisden temizlendi. Takiben hazırlanan yağ greftleri oluşturulmuş olan kemik defektlerini doldurmak üzere, her bir sıçana 1 cc olacak şekilde dura üzerine uygulandı. İşlem sonrası yağ grefti üzerine periost flebi suture edildi. Açılmış insizyonlar 5/0 eriyeabilen monofilaman dikişlerle kapatıldı (Şekil-14).



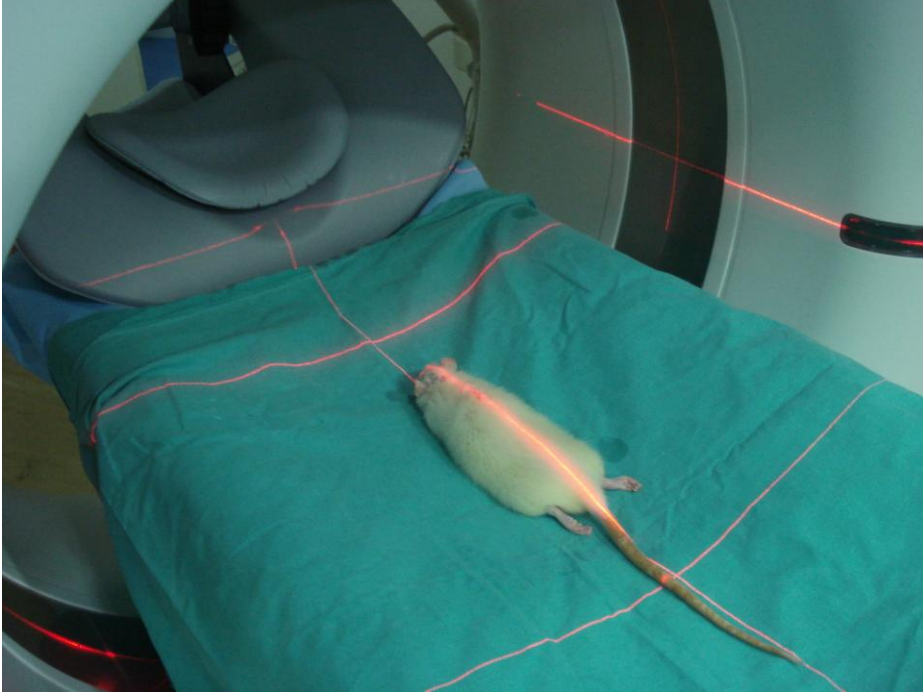
Şekil 14. A:Yağ grefti uygulaması, B: periost sütürasyonu.

5.3. Bilgisayarlı Tomografi Ölçümleri

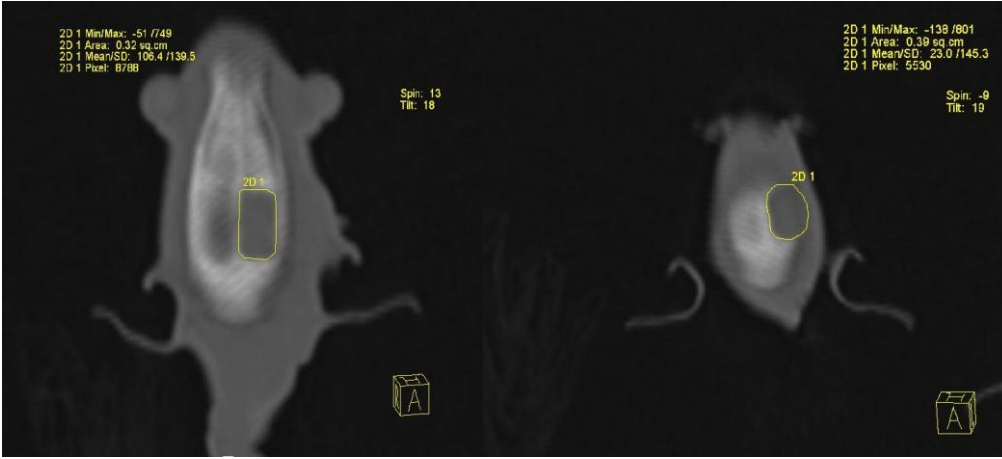
Ameliyat bitiminden sonraki 0., 2., 4., 6. ve 8. haftalarda tüm deneklerin kranial kemik defektlerinin alanları 0.6 mm'lik kesit kalınlıklı bilgisayarlı tomografi (SIEMENS Somatom Definition AS, Germany) incelemeleriyle koronal, aksiyel planda ve üç boyutlu rekonstrüksiyon ile elde edilen görüntülerle ölçüldü (Şekil-15,16). Alan ölçümleri aynı cihazda; mm² cinsinden sonuç elde edilecek şekilde, grup hakkında bilgilendirilmeyen deneyimli bir radyoloji uzmanı tarafından yapıldı. Oluşturulan kranial kemik defektlerin zaman içinde alan ortalamaları açısından grup içinde ve gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olup olmadığına bakıldı (Şekil-17).



Şekil 15. 0.6 mm lik kesitler ile deneklerin koronal, aksiyel ve 3 boyutlu tomografileri çekildi.



Şekil 16. 0.6 mm lik kesitler ile deneklerin koronal, aksiyel ve 3 boyutlu tomografileri çekildi.



Şekil 17. Tomografik alan ölçümleri.

5.4. Makroskopik ve Histopatolojik Değerlendirme

8.hafta sonunda tüm deneklere yüksek doz barbiturat (150 mg/kg pentobarbital-intraperitoneal) enjeksiyonu ile otanazi uygulandı. Rastlantısal olarak tüm gruplardan 3'er adet denek seğildi. Deneklerin kraniumlarındaki defektler ortaya konarak makroskopik olmlerle incelendi. Deneklerin kraniumlarından alınan ornekler % 10'luk nötral formalin ile fikse edildikten sonra De Castro solüsyonunda 5-10 gün bekletilerek dekalsifiye edildi. Yükselen derecelerde alkol serisinden geğirilerek dehidrate edilen orneklerden parafin bloklar hazırlandı. Kızaklı mikrotom (Leica, Almanya) ile 5 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kemik defekti iyileşmesini değerlendirmek için kesitler Masson Trikrom ile boyandı. Kesitler, defekt bölgelerindeki doku cevabı ve yeni doku oluşumu açısından, gruplardan bağımsız iki histolog tarafından Olympus BX61 model mikroskop kullanılarak histolojik olarak değerlendirildi ve DP72 dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

6. SONUÇLAR

Elde edilen veriler SPSS 10.0 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, IL) istatistik programına aktarılarak deneyimli bir istatistikçi tarafından analiz edildi. Her bir grup için 0., 2., 4., 6., ve 8. hafta defekt alanlarının aritmetik ortalamaları ve defekt alanı kapanma yüzdeleri ortalama \pm SD cinsinden belirlendi. Her bir grubun kendi içerisinde 0., 2., 4., 6. ve 8.haftalarda defekt alanlarının karşılaştırılmasında, ‘tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi’ ve gruplar arasındaki farkın değerlendirilmesinde ‘tekrarlayan ölçümlerde iki yönlü varyans analizi’ kullanıldı. 0., 2., 4., 6. ve 8. haftalarda, gruplar arasında defekt alanı ortalamalarında ve defekt alanı kapanma yüzdesi ortalamalarında fark saptanan durumda varyansları homojen olduğu için gruplara Student’s t-test uygulandı. P değerinin 0,05’den küçük olması ($p < 0,05$) ‘istatistiksel olarak anlamlı’ şeklinde değerlendirildi.

Tüm deneklerin kranial kemik defektlerinin alanları tomografik incelemelerle 0., 2., 4., 6., ve 8. haftalarda ölçüldü ve kaydedildi. Tüm deneklerin kranial kemik defektlerinin 0-4.ve 0-8. haftalardaki kapanma yüzdeleri hesaplandı (Tablo 1,2,3,4).

Tablo 1. Grup-1 (6mm x 5 mm Kontrol Grubu) verileri.

Kontrol Grubu 6mmx5mm	0.Hafta Defekt Alanı mm²	2.Hafta Defekt Alanı mm²	4.Hafta Defekt Alanı mm²	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	6.Hafta Defekt Alanı mm²	8.Hafta Defekt Alanı mm²	0-8.Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
1	30	29	31	-%3,3	28	29	%6,6
2	31	33	29	%6,4	30	28	%9,6
3	29	29	27	%6,8	30	26	%10,3
4	28	27	25	%10,7	26	21	%25
5	30	28	27	%10	29	26	%13,3
6	26	28	27	-%3,8	25	27	-%3,8
7	33	29	30	%9	31	29	%12,1
8	31	36	30	%3,2	33	29	%9,6

Tablo 2. Grup-2 (8mm x 5mm Kontrol Grubu) verileri.

Kontrol Grubu 8mmx5mm	0.Hafta Defekt Alanı mm²	2.Hafta Defekt Alanı mm²	4.Hafta Defekt Alanı mm²	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	6.Hafta Defekt Alanı mm²	8.Hafta Defekt Alanı mm²	0-8.Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
1	39	35	36	%7,6	33	35	%10,2
2	39	34	32	%17	35	36	%7,6
3	41	38	38	%7,3	36	37	%9,7
4	40	39	36	%10	38	35	%12,5
5	35	34	35	%0	30	33	%5,7
6	38	39	36	%5,2	35	35	%7,8
7	31	33	28	%9,6	26	27	%12,9
8	37	33	35	%5,4	33	32	%13,5

Tablo 3. Grup-3 (6mm x 5mm Deney Grubu) verileri.

Deney Grubu 6mmx5mm	0.Hafta Defekt Alanı mm²	2.Hafta Defekt Alanı mm²	4.Hafta Defekt Alanı mm²	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	6.Hafta Defekt Alanı mm²	8.Hafta Defekt Alanı mm²	0-8.Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
1	31	30	25	%19,3	24	23	%25,8
2	27	25	23	%14,8	24	23	%14,8
3	27	15	21	%22,2	21	20	%35
4	30	29	25	%16,6	27	25	%16,6
5	32	30	29	%9,3	33	25	%21,8
6	29	28	25	%13,7	21	21	%27,5
7	29	30	26	%10,3	24	25	%17,2
8	25	27	21	%16	21	20	%20

Tablo 4. Grup-4 (8mm x 5mm Deney Grubu) verileri.

Deney Grubu 8mmx5mm	0.Hafta Defekt Alanı mm2	2.Hafta Defekt Alanı mm2	4.Hafta Defekt Alanı mm2	0-4. Hafta Kapanma Yüzdesi (%)	6.Hafta Defekt Alanı mm2	8.Hafta Defekt Alanı mm2	0-8.Hafta Kapanma Yüzdesi (%)
1	39	38	32	%17,9	31	29	%25,6
2	34	32	28	%17,6	24	27	%20,5
3	37	33	32	%13,5	31	27	%16,2
4	33	32	27	%18,1	15	21	%36,3
5	38	39	36	%5,2	31	29	%18,4
6	41	38	38	%7,3	32	28	%31,7
7	38	38	33	%13,1	25	21	%44,7
8	40	37	39	%2,5	33	31	%17,5

Gruplar arasında cerrahi ile oluşturulan kemik defekti alanları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$) (Tablo 5).

General Linear Model-Repeated Measures ANOVA

Tablo 5. 0.haftada kontrol ve deney gruplarında oluşturulan defekt alanları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0,05$).

Multivariate Tests^b						
Effect		Value	F	Hypothesis df	Error df	Sig.
HAFTA	Pillai's Trace	,790	25,401 ^a	4,000	27,000	,000
	Wilks' Lambda	,210	25,401 ^a	4,000	27,000	,000
	Hotelling's Trace	3,763	25,401 ^a	4,000	27,000	,000
	Roy's Largest Root	3,763	25,401 ^a	4,000	27,000	,000
HAFTA * GRUP	Pillai's Trace	,316	3,120 ^a	4,000	27,000	,031
	Wilks' Lambda	,684	3,120 ^a	4,000	27,000	,031
	Hotelling's Trace	,462	3,120 ^a	4,000	27,000	,031
	Roy's Largest Root	,462	3,120 ^a	4,000	27,000	,031

a. Exact statistic

b.

Design: Intercept+GRUP

Within Subjects Design: HAFTA

Kontrol ve deney gruplarının 0., 2., 4., 6. ve 8. hafta defekt alanları ortalamaları incelendiğinde, zaman içerisindeki defekt alanı azalması açısından Student's t testi sonuçlarına göre istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0,05$). Elde edilen verilere

göre 6mm x 5mm defektli kontrol ve deney grupları arasında yapılan karşılaştırmada kemik defektindeki anlamlı küçülmenin 4. haftada başladığı; 8mm x 5mm defektli kontrol ve deney grupları arasında ise anlamlı küçülmenin 6. haftada ortaya çıktığı görüldü (Tablo-6,7,8,9).

Tablo 6. 6mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının defekt alanlarının haftalara göre karşılaştırılması.

	GENISLIK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
HAFTA0	1	8	29,75	2,12	,75
	2	8	28,75	2,31	,82
HAFTA2	1	8	29,88	3,04	1,08
	2	8	26,75	5,06	1,79
HAFTA4	1	8	28,25	2,05	,73
	2	8	24,38	2,67	,94
HAFTA6	1	8	29,00	2,62	,93
	2	8	24,38	4,07	1,44
HAFTA8	1	8	26,88	2,70	,95
	2	8	22,75	2,19	,77

Tablo 7. 6mm x 5mm kontrol ve deney grupları haftalar açısından varyanslar homojen olduğundan Student's t-tesisi ile değerlendirildi. 4. haftadan itibaren, ölçümlerde iki grup arasında belirgin fark olduğu ortaya çıktı.

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
		F	Sig.	t	Sig. (2-tailed)	95% Confidence Interval of the Difference	
						Lower	Upper
HAFTA0	Equal variances assumed	,151	,703	,901	,383	-1,38	3,38
	Equal variances not assumed			,901	,383	-1,38	3,38
HAFTA2	Equal variances assumed	,572	,462	1,496	,157	-1,36	7,61
	Equal variances not assumed			1,496	,162	-1,45	7,70
HAFTA4	Equal variances assumed	,203	,660	3,255	,006	1,32	6,43
	Equal variances not assumed			3,255	,006	1,31	6,44
HAFTA6	Equal variances assumed	,539	,475	2,704	,017	,96	8,29
	Equal variances not assumed			2,704	,019	,90	8,35
HAFTA8	Equal variances assumed	,017	,898	3,361	,005	1,49	6,76
	Equal variances not assumed			3,361	,005	1,48	6,77

Tablo 8. 8mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının defekt alanlarının haftalara göre karşılaştırılması.

Group Statistics

	GENISLIK	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
HAFTA0	3	8	37,50	3,21	1,13
	4	8	37,50	2,78	,98
HAFTA2	3	8	35,63	2,62	,92
	4	8	35,88	3,00	1,06
HAFTA4	3	8	34,50	3,12	1,10
	4	8	33,13	4,36	1,54
HAFTA6	3	8	33,25	3,77	1,33
	4	8	27,75	6,11	2,16
HAFTA8	3	8	33,75	3,15	1,11
	4	8	26,63	3,70	1,31

Tablo 9. 8mm x 5mm kontrol ve deney grupları haftalar açısından varyanslar homojen olduğundan Student's t-tesisi ile değerlendirildi. 6. haftadan itibaren, ölçümlerde iki grup arasında belirgin fark olduğu ortaya çıktı.

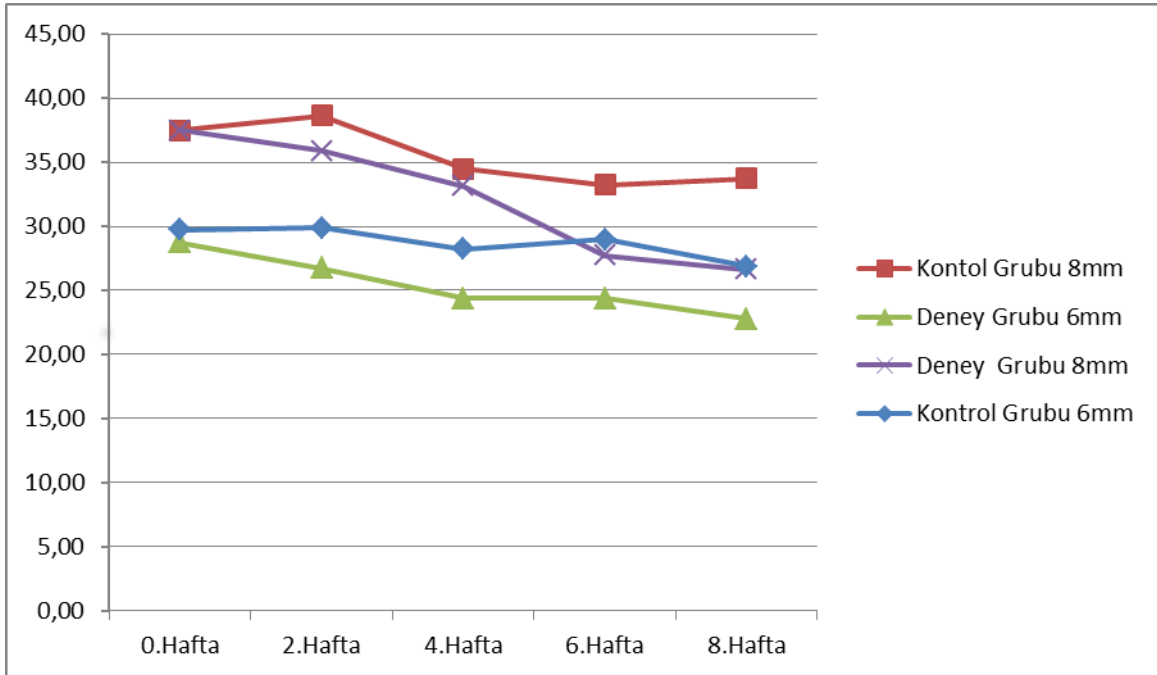
Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
		F	Sig.	t	Sig. (2-tailed)	95% Confidence Interval of the Difference	
						Lower	Upper
HAFTA0	Equal variances assumed	,078	,784	,000	1,000	-3,22	3,22
	Equal variances not assumed			,000	1,000	-3,22	3,22
HAFTA2	Equal variances assumed	,621	,444	-,178	,861	-3,27	2,77
	Equal variances not assumed			-,178	,861	-3,27	2,77
HAFTA4	Equal variances assumed	1,108	,310	,726	,480	-2,69	5,44
	Equal variances not assumed			,726	,481	-2,73	5,48
HAFTA6	Equal variances assumed	2,068	,172	2,166	,048	5,44E-02	10,95
	Equal variances not assumed			2,166	,052	-5,03E-02	11,05
HAFTA8	Equal variances assumed	,236	,635	4,146	,001	3,44	10,81
	Equal variances not assumed			4,146	,001	3,43	10,82

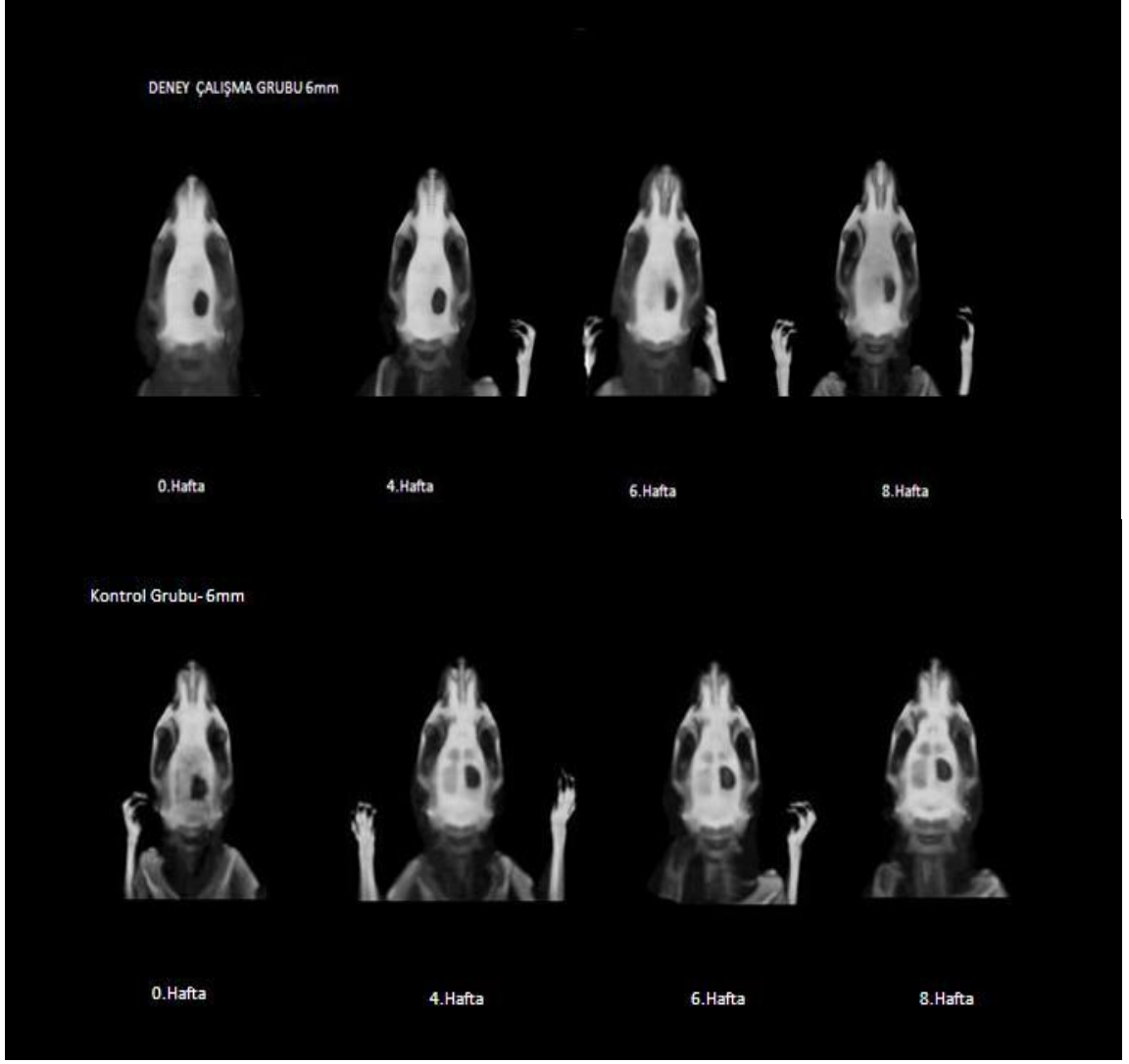
Grupların 8. hafta sonundaki defekt alanlarının kapanma yüzdeleri sırasıyla Grup 1 de % 10.33, Grup 2 de % 9.98, Grup 3 de %22.33 ve Grup 4 de % 26.36 olarak bulunmuştur (Tablo-10).

Tablo 10. Grupların 4.ve 8. haftaların sonlarındaki defekt kapanma yüzdelerinin ortalama değerleri.

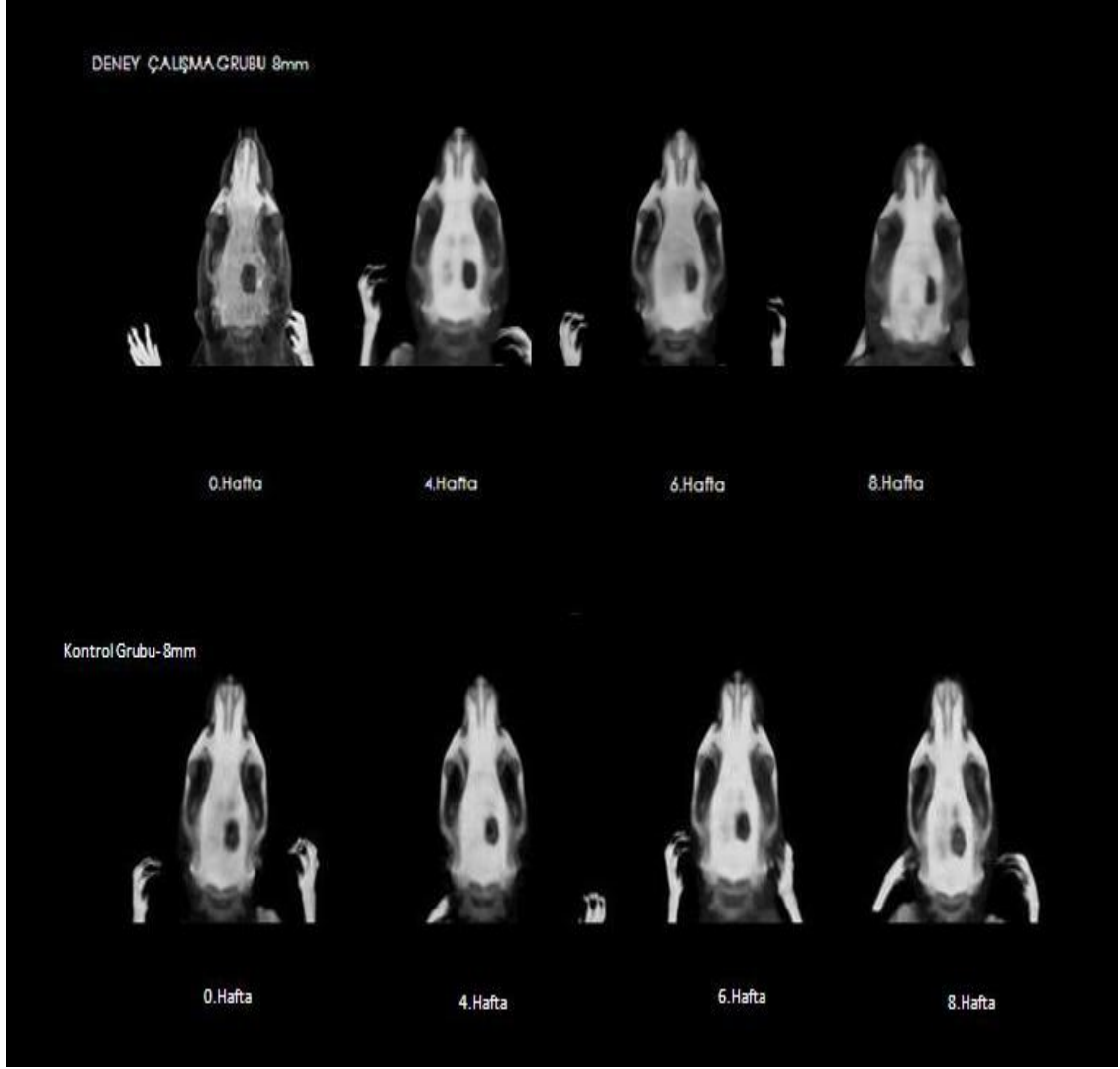
Kapanma Yüzdesi(%)	0-4.Hafta	0-8.Hafta
Grup 1 (Kontrol 6 mm x 5mm Grubu)	4,87	10,33
Grup 2 (Kontrol 8 mm x 5mm Grubu)	7,76	9,98
Grup 3 (Deney 6 mm x 5mm Grubu)	15,27	22,33
Grup 4 (Deney 8 mm x 5mm Grubu)	11,9	26,36



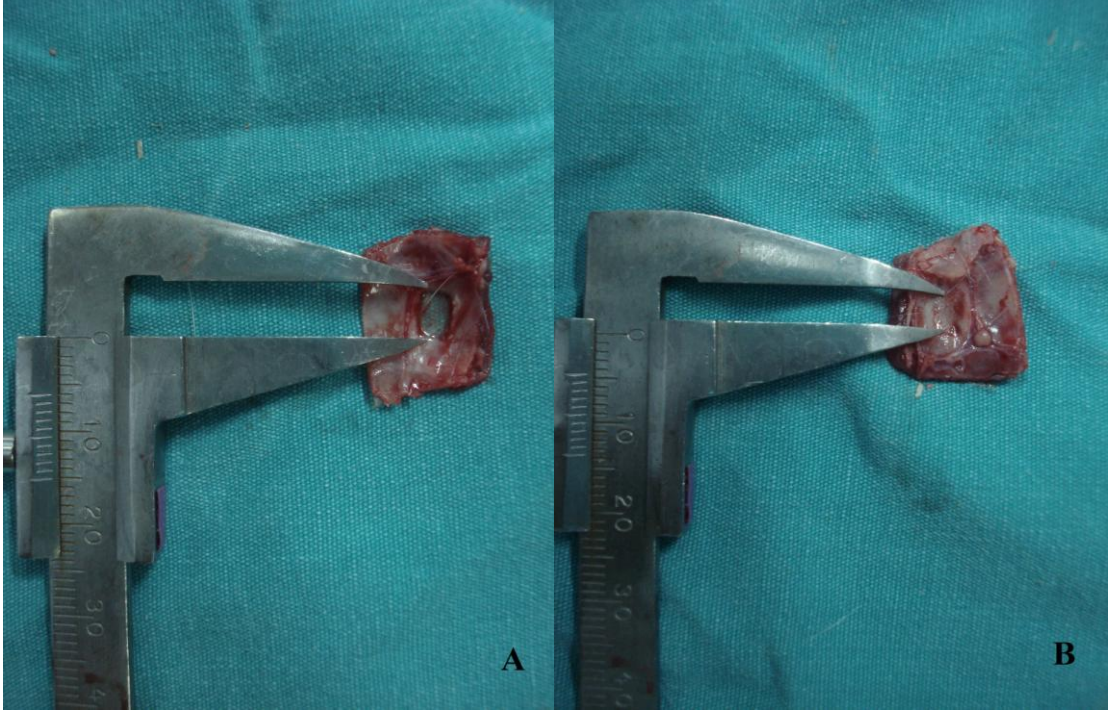
Şekil 18. Grupların defekt alanlarının haftalara göre değişimi.



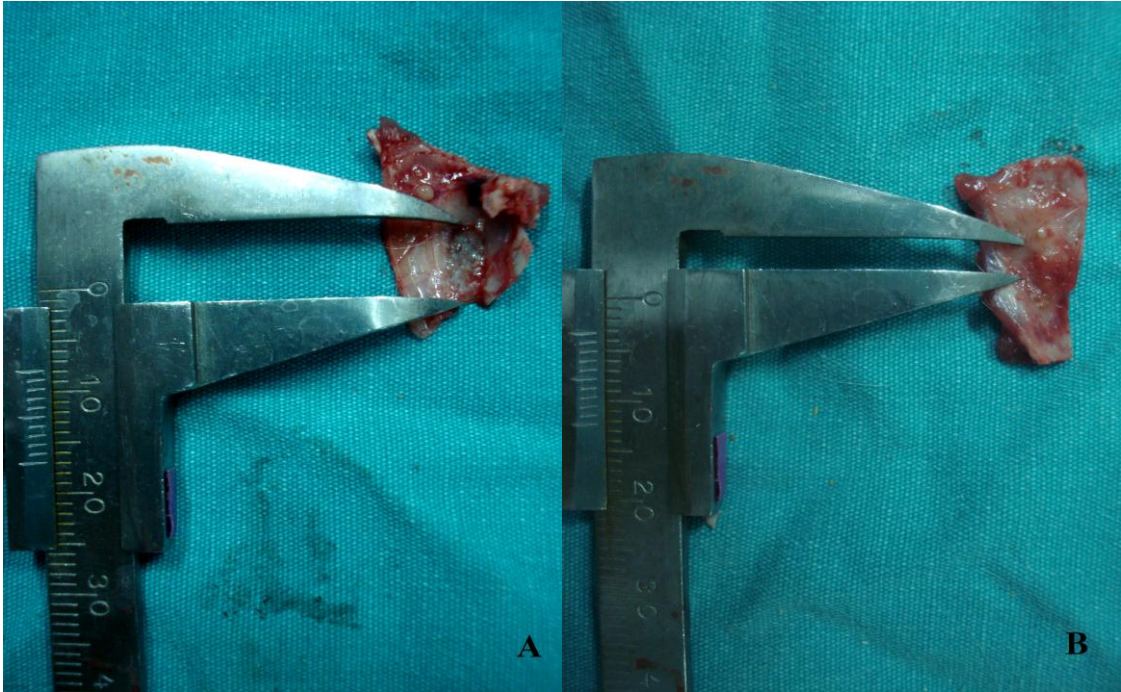
Şekil 19. 6mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının haftalara göre 3 boyutlu tomografik görüntülerinin değerlendirilmesi.



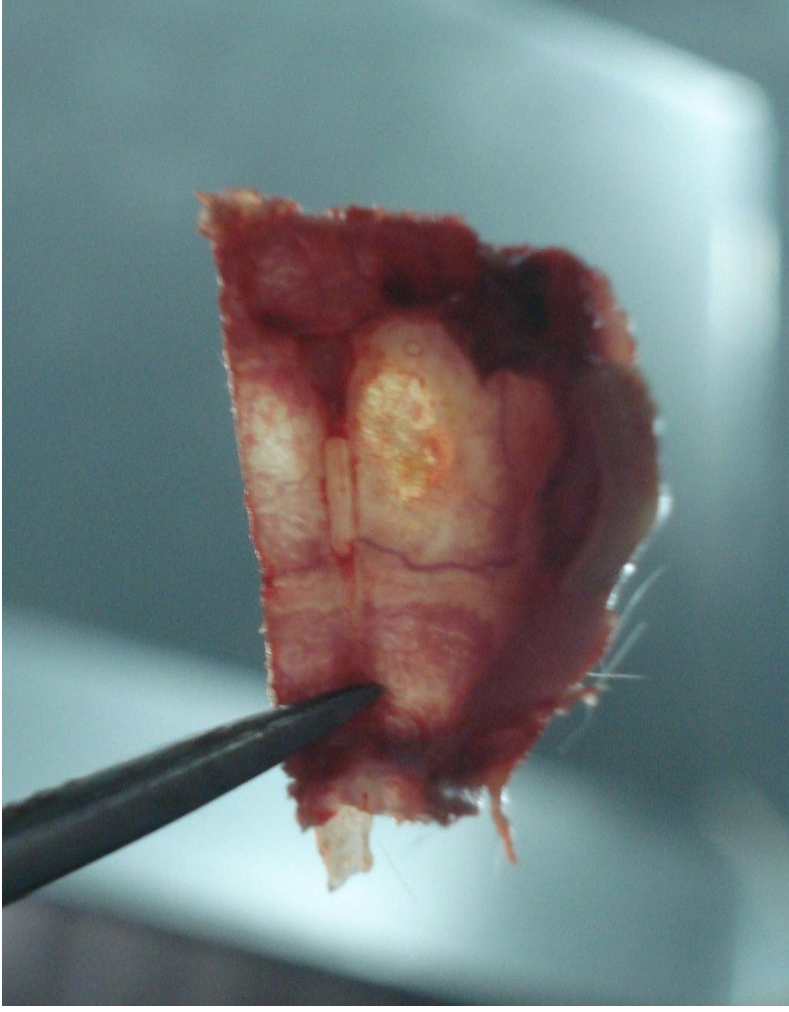
Şekil 20. 8mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının haftalara göre 3 boyutlu tomografik görüntülerinin değerlendirilmesi.



Şekil 21. 6mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının 8. haftada sakrifikasyon sonrası, defekt alanlarının makroskopik görüntüsü. A:Kontrol grubu, B:Deney grubu.



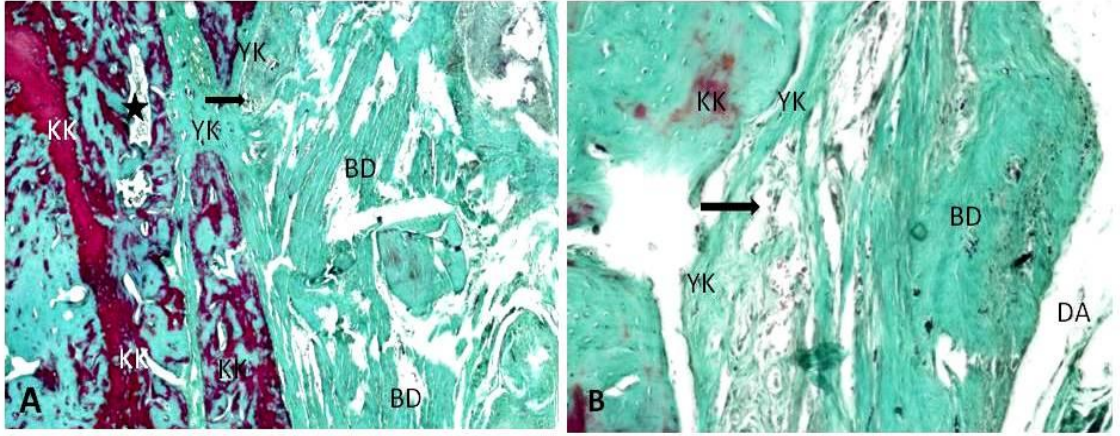
Şekil 22. 8mm x 5mm kontrol ve deney gruplarının 8. haftada sakrifikasyon sonrası, defekt alanlarının makroskopik görüntüsü. A:Kontrol grubu, B:Deney grubu.



Şekil 23. 8mm x 5mm deney grubunun 8. haftadaki sakrifikasyon esnasındaki makroskopik görüntüsü. Defekt alanının periferden santrale doğru artmış vaskülarite ile kemikleşerek küçüldüğü izlenmekte.

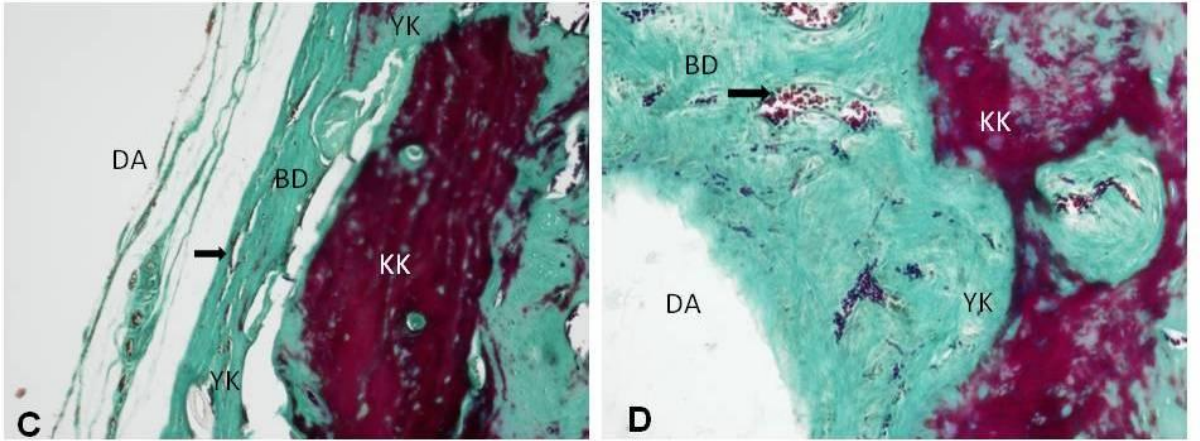
Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde kraniyal defektlerde 8. haftada tüm gruplarda doku oluşumunun başladığı görüldü ve intramembranöz kemikleşme alanları gözlemlendi.

Grup 1 (Kontrol 1 grubu) de, defekt alanının oldukça yoğun fibröz bağ doku ile dolu olduğu görüldü. Kortikal kemiğe komşu alanlarda içi eritrosit ile dolu kan damarları belirgindi. Yeni oluşmuş osteoblastlar kendi ürettikleri yeni kemik matriksi içinde gözlemlendi (Şekil-24).



Şekil 24. (A) Kontrol 1 grubu; Masson Trikrom x 4. (B) Kontrol 1 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, DA: Defekt alanı.

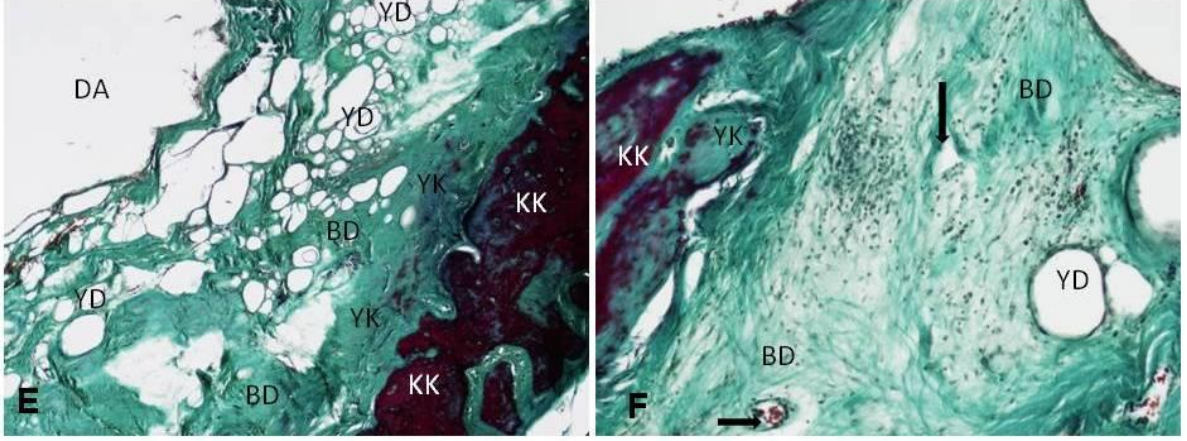
Grup 2 (Kontrol 2 grubu) de, oluşturulan 8 mm x 5 mm'lik defekt alanının kontrol 1 grubundaki 6 mm x 5 mm'lik defekt alanına kıyasla daha az fibröz bağ dokusu ile dolu olduğu görüldü ve bu grupta kemikleşme skorları kontrol 1 grubundaki defekte kıyasla daha zayıftı (Şekil-25).



Şekil 25. (C) Kontrol 2 grubu; Masson Trikrom x 10. (D) Kontrol 2 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, DA: Defekt alanı.

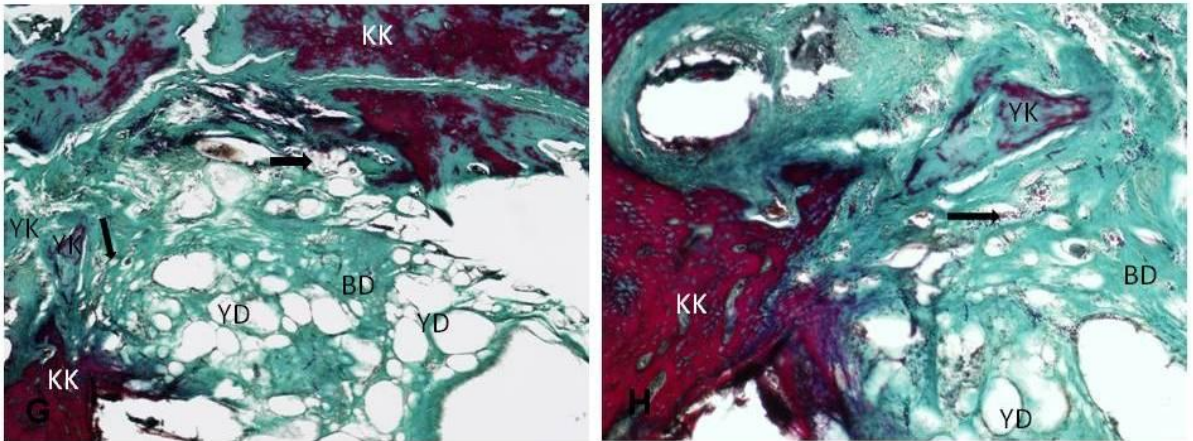
Grup 3 (Deney 1 grubu) de, defekt alanındaki yağ greftinin iç kısımlarına doğru uzanan fibröz bağ dokusu belirgindi. Rutin histolojik takip yöntemlerine maruz bırakılan greftteki yağ hücrelerinin içerisinde depolanan lipid muhteviyatı görülemedi.

Kortikal kemik kenarlarında yeni kemik, oluşum sürecinde izlendi. Kemikleşen doku içerisinde bolca kan damarına rastlandı. Kemikleşme sürecinin kortikal kemiğin kenarlarından başlayıp greftin içine doğru gerçekleştiği saptandı (Şekil-26).



Şekil 26. (E) Deney 1 grubu; Masson Trikrom x 4. (F) Deney 1 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, DA: Defekt alanı, YD: Yağ dokusu.

Grup 4 (Deney 2 grubu) de, yine yağ greftinin içerisine doğru bağ dokusunun geliştiği görüldü. Defektin kortikal kemiğe yakın kısmında, damardan zengin bağ dokusunun içerisinde, kemik matrisi sentezleyen aktif osteoblastların bulunduğu yeni kemik belirlendi (Şekil-27).



Şekil 27. (G) Deney 2 grubu; Masson Trikrom x 4. (H) Deney 2 grubu; Masson Trikrom x 20. KK: Kortikal kemik, YK: Yeni oluşan kemik, ok: kapiller, BD: Bağ doku, YD: Yağ Dokusu.

Kemik defektinin iyileşmesi açısından, 6 mm x 5 mm'lik kemik defekti içerisinde yağ grefti bulunan grupta kontrol 1 grubuna kıyasla belirgin bir fark gözlenmezken, 8 mm x 5 mm'lik kritik kemik defektinin iyileşmesinde yağ grefti bulunan grupta, bulunmayan kontrol 2 grubuna göre hafif bir artış saptandı.

Tüm gruplarda başlıca mononükleer fagositik hücreler, makrofajlar, lenfositler ve fibroblastlar ile karakterize olan hafif bir inflamasyon belirlendi. Doku yanıtı açısından gruplar arasında fark saptanmadı. Örneklerin hiçbirinde nekroz ya da yabancı cisim reaksiyonuna rastlanmadı.

Çalışma esnasında; 0. haftada tomografik ölçümler sırasında Grup 1'den 1 adet ve Grup 4'den 2 adet denek anestezi komplikasyonu nedeniyle kaybedildi. Kaybedilen sıçanların yerine yeni hayvanlar katılarak deney tam sayı ile tamamlandı.

7. İRDELEME

Tümör cerrahisi, travma, konjenital anomaliler ve enfeksiyonlar kraniumda defekte yol açan sebepler arasında sayılabilir.⁴⁰

Oluşan bu defektlerin onarımında, 19. yüzyıldan itibaren otolog greftler ve alloplastik materyallerin yanında birçok değişik özellikte maddeler kullanılmıştır. Günümüzde ise yeni maddeler teknolojik ilerlemeler ışığında denenmeye ve araştırılmaya devam edilmektedir.

Lewandrowski ve ark. 2000 yılında yaptıkları bir çalışmada başta travma cerrahisi ve tümör rezeksiyonları olmak üzere, dünyada, yılda yaklaşık 2.2 milyon cerrahi girişimde, farklı tipte kemik greftleri kullanıldığını ve en çok otojen kemik greftlerinin tercih edildiğini bildirmişlerdir.⁵¹

Vaccaro ve ark. ise otojen kemik greftlerinin osteojenik potansiyellerinin yüksek olmasına rağmen elde edilen miktarlarının yetersiz olması, greft alınan bölgenin morbiditesi gibi klinik sorunlar nedeniyle yapay greft materyallerine gereksinim duyulduğunu belirtmişlerdir.⁵²

Allogreftler ve ksenogreftler, immunolojik red, enfeksiyöz hastalıkların transmisyonu ve erken rezorpsiyona uğramaları nedeni ile sınırlı olarak kullanılmıştır. Peptidlerle desteklenmiş greftler (kemik morfojenik proteinler, BMP), demineralize kemik tozları ise miktar olarak çoğu zaman yeterli olmamıştır. Biouyumlu kemik materyallerinin ise enfeksiyona yatkınlıkları ve osteoindüktif etkilerinin yetersizliği neticesinde tedavinin başarısını olumsuz yönde etkiledikleri bildirilmiştir.⁵³

Geniş kemik defektlerinin tedavisinde altın standart olarak tanımlanan, verici bölgeden alınıp defekt bölgesine yerleştirilen otojen greft materyalleri kullanılmıştır. Verici bölgenin morbiditesi ve alınan materyalin sınırlı miktarda olması araştırmacıları bu tedavinin alternatifini bulmaya yönlendirmiştir.⁵⁴

Kraniyumda periost ve özellikle duranın kemikleşmenin oluşumunda önemli yerleri vardır. Güzel ve ark.'ı ratlarda infant dura greftlerinin farklı alıcı yataklardaki osteojenik potansiyelini araştırmışlardır. İnfant dural greftlerin yetişkin dural greftlerden farklı olarak kemikleşme potansiyeli olduğunu göstermişlerdir.⁶³

Yeni oluşan kemik çevreden merkeze doğru (sentripedal) oluşmaktadır. Etraftaki kemik doku dura ve periost olmaksızın yetersiz yeni damarlanma ve kemikleşme gösterir.⁵⁵ Dura ile periostun karşılıklı etkileşiminin kemikleşmede önemli olduğu bildirilmiştir.⁵⁶

Bizim çalışmamızda yetişkin ratlarda kemik defekti oluşturulurken dura ve defekt komşuluğundaki sagittal sinüs korunmuş ve kesilen periost, flep şeklinde defekt üzerine getirilerek onarılmıştır.

Sıçanlarda kritik büyüklükteki kemik defektinin boyutu konusunda net bir fikir birliği bulunmamaktadır. Yayınların çoğu 6 mm'yi kabul ederken bir kısmı da 8 mm ve hatta 4 mm'yi kritik kraniyal kemik defekti olarak kabul etmiştir.^{4,5,13}

Bizim çalışmamızda 6mm x 5mm'lik ve 8mm x 5 mm'lik dikdörtgen şeklinde tam kat kemik defektları yaratılarak kritik büyüklükteki kraniyal kemik defektları oluşturuldu.

Son on yıl içerisinde yapılmış çalışmalardan elde edilen bilgiler, yağ dokusu kaynaklı kök hücrelerinin diğer hücrelerden farklı olarak kendi ve farklı türdeki hücrelere dönüşebilme kapasitesine sahip olduğunu açıkça ortaya koymuştur. Bu özellik, yağ hücresi kaynaklı kök hücrelerinin, deneysel ve klinik olarak çalışmalarda popülerite kazanmasını açıklar niteliktedir. Serebral iskemi için 2003 yılında Kang ve ark.⁵⁷, kronik miyokard enfarktüsü için 2007 yılında Mazo ve ark.'ı⁵⁸, akut miyokard enfarktüsünde Li ve ark.'ı⁵⁹, spinal füzyon için ise 2008 yılında ise Hsu ve ark.'ı⁶⁰ çalışmalarında aynı düşünceyle yağ kaynaklı kök hücrelerini kullanmıştır. Bunlarla birlikte pek çok hastalıkta da bu tedavinin denendiği bilinmektedir. Genel olarak da elde edilen sonuçlar kıyaslandığında yağ hücresi kaynaklı kök hücrelerinin olumlu sonuçlar verdiği gözden kaçmamaktadır. Tüm bu bilgiler ışığında yağ kaynaklı kök hücrelerinin kemik defekti tedavisinde kullanılabilirliğinin araştırılması çalışmamızdaki esas amacı oluşturmaktadır.

Gonzales ve ark.'ı çalışmalarında yağ doku içeriğindeki canlı hücre sayısının ve yaşayabilirliğinin, saflaştırma ve kültür işlemlerinden daha çok yağ greftinin alım tekniğiyle ilgili olduğunu belirtmiştir.⁶¹

Çalışmamızda alınan yağ greftleri santrifüj edilmemiş, kültüre edilmemiş, sadece yıkama ve süzme işlemlerine tabi tutulmuştur. Saflaştırılmış yağ kaynaklı kök hücre

kullanımının daha spesifik sonuçlar verebileceği aşıkardır fakat çalışmamızda klinik pratikte kullanılabilir bir yöntemin sonuçlarının araştırılması göz önünde bulundurulmuştur.

Literatürde yer alan çalışmalarda yağ dokusunun anjiyogenezis için önemli sinyal faktörlerin salınımını arttırdığı gösterilmiştir. Böylece mikrodamarların artışına ve sonuçta bozulan dolaşımın yenilenmesine dönük bir ilerlemeye sebep olmaktadır. Mezankimal dokuların oluşumu ya da tamiri esasına dayanan bu olaylar hasarlı alana kök hücrelerin ulaşması, anjiyojenik faktörlerin salınımı, yeni damar oluşumu ve sonuçta artmış oksijenizasyon gibi ardışık olayları kapsamaktadır.¹⁴

Çalışmamızda elde edilen sonuçlardan; 8. haftada sakrifikasyon sonrası deney gruplarındaki defektlerin makroskopik incelenmesi esnasında defekt çevresindeki damarlanmanın artmış olduğu görülmüştür (Şekil-23). Histopatolojik olarak da artmış damarlanma ile birlikte kemik oluşumunda artış saptanmıştır (Şekil-26,27). Ayrıca çalışmamızda dikkatlerden kaçmayan bir diğer bulgu da özellikle 3 boyutlu tomografik incelemeler esnasında kemikleşmenin daha çok, defekt komşuluğunda kalan sagittal sinüs etrafında oluştuğudur (Şekil 19,20). Defekt alanlarındaki anlamlı küçülmenin yağ kaynaklı kök hücrelerinin anjiyojenik faktör salınımının arttırılması sonucu yeni damar oluşumunu tetiklediğini ve oksijenizasyonu arttırarak kemikleşmeye katkıda bulunduğunu düşünmekteyiz.

Kraniyal kemik defektlerindeki iyileşme bilgisayarlı tomografiler ile yapılan seri çekimler esnasında defekt alanı ölçümleri ile değerlendirilmiştir. Bu değerlendirme kriterleri kullanılarak yapılan daha önceki çalışmalarda düz radyogramlar ve bilgisayarlı tomografiler kullanılmıştır.⁵

Özçelik ve ark.'ı sıçan zigomatik arkının ortasında yapılan kemik defektinin takibinde üç boyutlu bilgisayarlı tomografi ve düz radyogramları karşılaştırmıştır. Postoperatif 10. haftada yapılan ölçümlerde düz radyogramların kırık hattındaki fibröz kallusu yakalama ihtimalinin üç boyutlu bilgisayarlı tomografi'ye göre istatistiksel olarak daha iyi olduğunu göstermişlerdir. Fakat 20. haftada yapılan ölçümlerde, üç boyutlu bilgisayarlı tomografi ile yapılan ölçümün defektin gerçek boyutunu düz radyogramlardan daha iyi tespit ettiği ancak istatistiksel olarak anlamlı şekilde defekti olduğundan daha küçük gösterdiği tespit edilmiştir.⁶² Bizim çalışmamızda ise tersi olacak şekilde 8. hafta sonunda tomografik boyutlar ile makroskopik boyutlar

karşılaştırıldığında; tomografik sonuçların defektleri gerçekte olduğundan daha büyük gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil-21,22).

Çalışmamızda cerrahi ile oluşturulan defekt alanı ortalamaları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p>0.05$) (Tablo-5). Ancak kontrol ve deney gruplarının 0., 2., 4., 6. ve 8. hafta defekt alanları ortalamaları incelendiğinde, zaman içerisindeki defekt alanı azalması açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Elde edilen verilere göre 6mm x 5mm defektli kontrol ve deney grupları arasında yapılan karşılaştırmada kemik defektindeki anlamlı küçülmenin 4. haftada başladığı; 8mm x 5mm defektli kontrol ve deney grupları arasında ise anlamlı küçülmenin 6. haftada ortaya çıktığı görüldü (Tablo-7,9). Bu gecikme; kök hücrelerin ortama göçü, anjiyojenik faktörlerin salınması, hücrelerin farklılaşması için gereken zaman olarak yorumlanabilir ve ayrıca büyük defekt için daha çok substrat hazırlanması gerekliliği ise iki grup arasındaki korele gecikmenin sebebi olarak ilişkilendirilebilir. Ancak ileri çalışmalar ile bu nokta daha ayrıntılı olarak araştırılmalıdır.

Grupların 8. hafta sonundaki defekt alanlarının kapanma yüzdeleri sırasıyla Grup 1 de % 10.33, Grup 2 de % 9.98, Grup 3 de %22.33 ve Grup 4 de % 26.36 olarak bulunmuştur (Tablo-10). Bu veriler ışığında kontrol ve deney grupları arasındaki defekt alanları kapanma yüzdelerinin karşılaştırılmasında anlamlı bir fark ortaya çıktığını söyleyebiliriz. Defekt alanı daha büyük olduğu halde, iyileşmenin en fazla Grup 4 de meydana geldiği dikkat çekmektedir. Bu bulgunun artmış stres cevabına sekonder, daha geç ve daha fazla substrat sentezlenmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak sıçan kraniyal kritik kemik defektinde enjeksiyon yöntemi ile yağ grefti uygulaması, radyolojik açıdan kemik defekt alanında istatistiksel olarak anlamlı bir küçülme sağlamış, makroskopik ve histopatolojik olarak da bu veriler desteklenmiştir. Bu cevabın alınmasında rol oynayan mekanizmaların net olarak anlaşılabilmesi için ilave çalışmalar gerekmektedir. Klinikte yaygın olarak kullanıma girmiş bir yöntem olan enjeksiyon ile yağ grefti uygulamasının kemikleşmeye etkisi umut vaat etmektedir. Çalışmamızın bu yönde ileride yapılacak klinik ve deneysel araştırmalar için yardımcı olacağını düşünmekteyiz.

8. KAYNAKLAR

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

10. Campagnoli C, Roberts IAG, Kumar S, et al: Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood*. 2001; 98: 2396-2402.
11. Caplan AI: Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; 9(5):641-650.
12. Yoo JU, Barthel TS, Nishimura K, Solchaga L, Caplan AI, Goldberg VM, Johnstone B: The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am*. 1998; 80(12):1745-1757.
13. Akita S, Fukui M, Nakagawa H, Fujii T, Akino K: Cranial bone defect healing is accelerated by mesenchymal stem cells induced by coadministration of bone morphogenetic protein-2 and basic fibroblast growth factor. *Wound Repair Regen*. 2004; 12(2):252-259.
14. Rehman J, Traktuev D, Li J, Merfeld-Clauss S, Temm-Grove CJ, Bovenkerk JE, Pell CL, Johnstone BH, Conside RV, March KL. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004; 109:1292–1298.
15. Mojallal A, Foyatier JL. Historical review of use of adipose tissue transfer in plastic and reconstructive surgery. *Ann Chir Plast. Esthet* 2004; 49: 419–425.
16. Mazzola RF. The Evolution of Fat Grafting: From Soft Tissue Augmentation to Regenerative Medicine. Ed: Sydney C, Mazzola RF. Fat injection from filling to regeneration. St. Louis: Quality medical publishing, 2009, pp. XIX-XXXVIII.
17. Marra KG, Rubin JP. Adipose-derived stem cells, preadipocytes, and tissue engineering to Regenerative Medicine. Ed: Sydney C, Mazzola RF. Fat injection from filling to regeneration. St. Louis: Quality medical publishing, 2009, pp. 3–14.
18. Baron, R. Anatomy and ultrastructure of bone, in *Primer on the Metabolic Bone Disease and Disorder of Mineral Metabolism*. 4.ed. Favus, M.1., Ed. Lippincottwilliams & Wilkins, 1999, chap.1.

19. Leslie P. Gartner, James L. Hiatt: Color textbook of Histology. 2th edition, W.B Saunders company 2001, page:129-155.
20. Jungueira LC., Carneiro J: Basic Histology 10th ed. Lange 2003, s:141-154.
21. Bancroft JD, Stevens A: Theory and Practice of Histological Techniques. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork 1996, Chapter 15, page: 309-339.
22. Kierszenbaum A.L: Histoloji ve hücre biyolojisi: Patolojiye giris. Mosby Inc., St. Louis, Palme yayıncılık 2006, çeviri editörü: Prof. Dr. Ramazan Demir
23. Hollinger J.O., Buck C.D., Bruder P.S. Biology of Bone Healing: Its Impact on Clinical Therapy. In "Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics". Lynch S.E., Genco R.J., Marx, R.E. 1st edition Quintessence Publishing, 1999, chap 1.
24. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering. Science. 1993; 260: 920-926.
25. Garant, P. R. Oral Cells And Tissues. Quintessence Publishing Co. Inc. Illinois: 2003 Chapter 7-8.
26. Hussar P., Piirsoo A., Martson A., et al. Bone healing models in rat tibia after different injuries. Ann Chir Gynaecol 2001; 90; 271-279 .
27. Rubin E, Farber J.L. Pathology. Philadelphia: JB Lippincott,1988.
28. Bruder S.P., Fink D.J., Caplan A.I. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. J Cell Biochem. 1994; 56: 283.
29. Buckwalter J.A., Glimcher M.J., Cooper R.R., Recker R. Bone biology. Part 1. Structure, blood supply, cells, matrix and mineralization. J Bone Joint Surg Am. 1995; 77A: 1256.
30. Caplan A,I. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res 1991; 9: 641.
31. Bernard G.W. Healing and repair of osseous defects. Dent Clin North Am. 1991; 35: 469-477.
32. Sandy C. Marks, J.R. and Steven N. Popoff: Bone cell biology: The regulation of development, structure and function in the skeleton. The American Journal Of Anatomy 1988; 1 83: 1-44.

33. Marie P.J. Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation. *Histol. Histopathol*,1999; 14, 525.
34. Puzas, F. J. and Lewis, G. D., Biology of osteoclasts and osteoblasts, in *Orthopaedics. Principles of Basic and Clinical Science*, Bronner, F., and Worrell, R. V., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1999, chap. 3.
35. Junguiera, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O. *Temel Histoloji*. 8.Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi Ltd. Sti. 1998; 132-151.
36. Gorski, J. P. Is all bone the same? Distinctive distributions and properties of noncollagenous matrix proteins in lamellar and woven bone imply the existence of different underlying osteogenic mechanisms. *Crit Rev. Oral Biol*, 1998; 9, 201.
37. Jee, W~ S. S., Structure and function of bone tissue, in *Orthopaedics, Principles of Basic and Clinical Science*, Bronner, F. and Worrell, R. V., Eds., CRC Press, Boca Raton, FL, 1999, chap. 1.
38. Kılıçoğlu SS. Mikroskopi düzeyinde kırık iyileşmesi. *Ankara Üniv. Tıp Fakültesi Mecmuası* 2002; 55: 143-150.
39. Cowin, S. C. *Bone Mechanics Handbook*. 2nd edn. Boca, Raton, London, New York, Washington: CRC Press. 2001; Ch 1: 1-68,Ch 2: 1-24.
40. Paff G.H.: *Anatomy of the head and neck*. Philadelphia WB. Saunders. 1973; p.77.
41. Prolo DJ., Gutierrez RV., DeVine JS., Oklund SA.:Clinical utility of allogeneic skull discs. in human craniotomy. *Neurosurgery* 1984; 14:183.
42. Freeman E., Turnbull R.S.: The role of osseous coagulum as a graft material. *J.Periodont. Res.* 1973; 8: 229.
43. Turnbull RS., Freeman E.: Use of wounds in the parietal bone of the rat for evaluating bone marrow for grafting into periodontal defects *J.Periodont. Res.* 1974; 9: 39.

44. Mulliken JB., Glowacki J.: Induced osteogenesis for repair and and construction in the craniofacial region. *Plast. Reconstr. Surg.* 1980; 65: 553.
45. Glowacki. J.Altobelli D Mulliken JB: Fate of mineralized and demineralized osseous implants in cranial defects. *Calsif. Tissue Int.* 1981; 33: 71.
46. Takagi K., Urist MR.: The reaction of the dura the bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Ann. Surg.* 1982; 196.: 100.
47. Greenwald JA Mehrara BJ Spector JA Fagenholz PJ Saadeh PB Steinbrech DS Gittes GK, Longaker MT: Immature versus mature dura mater: II. Differential expression of genes important to calvarial reossification. *Plast Reconstr Surg*, 2000; Sep 106(3); 630-638.
48. Bou-Abboud Naaman N, Ouhayoun JP: Naaman NBA, Ouhayoun JP: Bone formation with discs or particles of natural coral skeleton plus polyglactin 910 mesh: Histologic evaluation in rat calvaria. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1998; 13; 115-20.
49. Schmitz JP., Schwartz Z., Hollinger JO., Boyan BD. Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anat (Basel)* 1990; 138(3):185-92.
50. Dupoirieux L, Pourquier D Picot MC Neves M: The effect of pentosan polysulphate on bone healing of rat cranial defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 1999; Oct;27(5):314-20.
51. Lewandrowski K.U.,Gresser J.D., Wise D.L., Trantol D.J. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: A histological evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. *B.omaterials* 2000; 21: 757-64.
52. Vaccaro A.R. The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedics* 2002; 25: 757-64.
53. Stevenson S., Emery S.E., Goldberg V.M. Factors affecting bone graft incorporation. *Clin Orthop Relat Res.* 1996; 324: 66-74.
54. Veth R., Schreuder B., Beem H., Pruscynski M., Rooy J. Cryosurgery in aggressive, benign, and low-grade malignant bone tumours. *Lancet Oncol.* 2005; 6:25-34.

55. Ozerdem OR, Anlatici R, Bahar T, Kayaselcuk F, Barutcu O, Tuncer I, Sen O: Roles of periosteum, dura, and adjacent bone on healing of cranial osteonecrosis. *J Craniofac Surg.* 2003; 14(3):371-9; discussion 380-382.
56. Hobar PC, Schreiber JS, McCarthy JG, Thomas PA: The role of the dura in cranial bone regeneration in the immature animal. *Plast Reconstr Surg.* 1993; 92(3):405-410.
57. Kang SK, Lee DH, Bae YC, Kim HK, Baik SY, Jung JS. Improvement of neurological deficits by intracerebral transplantation of human adipose tissue-derived stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Experimental Neurology* 2003; 183: 355–366.
58. Mazo M, Planat-Benard V, Abizanda G, Pelacho B, Leobon B, Gavira JJ, Penuelas I, Cemborain A, Penicaud L, Laharraque P, Joffre C, Boisson M, Ecay M, Collantes M, Barba J, Casteilla L, Prosoer F. Transplantation of adipose derived stromal cells is associated with functional improvement in a rat model of chronic myocardial infarction. *European Journal of Heart Failure* 2008; 10: 454–462.
59. Li B, Zeng Q, Wang H, Shao S, Mao X, Zhang F, Li S, Guo Z. Adipose tissue stromal cells transplantation in rats of acute myocardial infarction. *Coronary Artery Disease* 2007; 18: 221–227.
60. Hsu WK, Wang JC, Liu NQ, Krenek L, Zuk PA, Hedrick MH, Benhaim P, Lieberman JR. Stem cells from human fat as cellular delivery vehicles in an athymic rat posterolateral spine fusion model. *J Bone Joint Surg Am* 2008; 90: 1043–1052.
61. Gonzales AM, Loboeki C, Kelly CP, Jackson IT. An alternative method for harvest and processing fat grafts: An in vitro study of cell viability and survival. *Plast. Reconstr. Surg.* 2007; 120: 285.
62. Ozcelik D, Huthut I, Kuran I, Bankaoglu M, Orhan Z, Mayda AS: Comparison of accuracy of three-dimensional spiral computed tomography, standard radiography, and direct measurements in evaluating facial fracture healing in a rat model. *Ann Plast Surg.* 2004; 53(5): 473-480.

63. Güzel MZ, Yildirim AM, Yücel A, Seradjmir M, Dervisoglu S. Osteogenic potential of infant dural grafts in different recipient beds.
J Craniofac Surg. 1995; Nov;6(6): 489-93.
64. John Flood, Selected Readings in Plastic Surgery Implantation: Bone, Cartilage and Alloplasts, 2000; Volume 9, Number 8, pp 1-21.