

Tavşan Kalvaryumunda Mezenşimal Kök Hücre Transplantasyonu ile Yönlendirilmiş Kemik Yükseltilmesinde Elde Edilen Yeni Kemiğin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi

Histologic Evaluation of the New Bone Obtained from Directed Bone Enhancement with Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Rabbit Calvarium

Uz.Dt. Gökçe ULUKARADAĞ,^a
 Prof.Dr. Yavuz Sinan AYDINTUĞ,^b
 Prof.Dr. Ömer GÜNHAN,^c
 Uz.Dt. Aykut ÖZYİĞİT,^d
 Uz.Dt. Gürkan Raşit BAYAR,^b
 Uz.Dt. Aydın GÜLSES,^b
 Prof.Dr. Ali UĞUR URAL,^e
 Doç.Dr. Ferit AVCU^e

^aDiş Servisi,
 Adana Askeri Hastanesi, Adana,
^bAğız, Diş, ve Çene Cerrahisi AD,
^cPatoloji AD,
^dHematoloji AD, GATA, Ankara,
^eDiş Servisi,
 İskenderun Asker Hastanesi,
 İskenderun

Geliş Tarihi/Received: 10.05.2011
 Kabul Tarihi/Accepted: 08.12.2011

Yazışma Adresi/Correspondence:
 Uz.Dt. Aydın GÜLSES
 GATA,
 Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD,
 Ankara,
 TÜRKİYE/TURKEY
 aydinguls@gmail.com

ÖZET Amaç: Çene yüz bölgesinde oluşan kemik yetersizliklerinin yeniden yapılanmasında birçok tedavi yöntemi mevcuttur. Bu yöntemlerin birçok avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. Günümüzde çene kemiğinin yeniden yapılandırılmasına yönelik çalışmalar kök hücre üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada, mezenşimal kök hücre (MKH) uygulamasının yönlendirilmiş kemik yükseltilmesinde yeni kemik oluşumu üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçladık. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışma 7 adet Yeni Zelanda tavşanı üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çalışma grubunun dışındaki bir tavşanın tibia kemik iliğinden ayrıştırılan MKH'ler, in vitro olarak çoğaltıldıktan sonra, deneyde kullanılan tavşanların kalvaryumlarına kollajen taşıyıcı ile nakledilmiştir. MKH'nin dokuda dağılmaması ve kemik dışındaki dokulardan ayrıştırılabilmesi için titanyum kapsüller kullanılmıştır. Çalışma dört deney grubu içerecek şekilde planlanmış, her tavşana dörder adet titanyum kapsül uygulanmıştır. A ve B gruplarında kemik yüzeyine dekortikasyon yapılmış, A ve C gruplarında MKH uygulanmıştır. D grubunda ise ne dekortikasyon ne de MKH uygulaması yapılmıştır. Oluşan yeni kemik miktarı altı skor derecesiyle ve histopatolojik olarak değerlendirilmiştir. **Bulgular:** İstatistiksel olarak, gruplar arasında kemik oluşumu açısından anlamlı bir farklılık elde edilmemiş, ancak grup A'da grup D'ye göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla yeni kemik dokusu oluşumu saptanmıştır. **Sonuç:** MKH uygulamaları, yeni kemik dokusu oluşumunu başarılı bir şekilde indüklemekte ve defekte göre üretilecek yönlendirilmiş doku rejenerasyonu kafesleri ile gereksinim duyulan hacim ve şekilde yeni kemik dokusu elde edilmesi mümkün olabilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Mezenşimal kök hücreler; alveolar sırtın büyütülmesi; tavşanlar

ABSTRACT Objective: Many treatment methods are available for the reconstruction of bone defects of the mandible with a number of advantages and disadvantages. Current studies in mandible reconstructions are focused on stem cells. In this study, we aimed to investigate the effect of mesenchymal stem cell (MSC) procedure on new bone formation in directed bone enhancement. **Material and Methods:** The study was carried out with 7 New Zealand rabbits. Mesenchymal stem cells isolated from the tibial bone of a rabbit not included in the study, were transferred after in vitro proliferation to the calvariums of rabbits included in the experiment using a collagen carrier. Titanium capsules were used in order to prevent dispersion of MSCs in the tissue and to isolate them from tissues other than bones. The study was planned to include four test groups and each rabbit was implanted four titanium capsules. While Groups A and B underwent decortication, MSC were transplanted to Groups A and C. Neither decortication nor MSC was used in Group D. The amount of new bone formation was evaluated with six score grades and histopathologically. **Results:** A statistically significant difference was found between groups in terms of bone formation and the amount of new bone formation was significantly higher in Group A compared to Group D. **Conclusion:** MSCs successfully induce new bone formation and directed tissue regeneration cages that are produced according to the defect enable deriving new bone tissue with the required volume and shape.

Key Words: Mesenchymal stem cells; alveolar ridge augmentation; rabbits

doi: 10.5336/medsci.2011-24673

Copyright © 2012 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2012;32(3):659-69

Kök hücreler, çoğalma yeteneği olan, uygun büyüme ortamına yerleşebilen, çok sayıda farklılaşmış devamı niteliğindeki türler üretebilen, kendini yenileyebilen veya kendi popülasyonunun devamlılığını sağlayabilen ve zedelenmeyi izleyerek işlevsel dokuyu rejenere edebilen hücrelerdir.^{1,2} Kök hücreler embriyodan, fetustan, göbek kordonundan ve yetişkinlerden elde edilebilmektedir.

Birçok doku ve organda bulunan kök hücrelerin hücre biyolojisi günümüzde çok daha iyi anlaşılmaktadır. İn vitro kültür çalışmalarındaki gelişmeler, önceleri imkânsız olarak görülen değişik hücre tiplerinin çoğaltılmasını uygulanabilir kılmıştır.³ İzole edilmesinin kolay oluşu ve geniş başkalaşım potansiyeli ile mezenşimal kök hücrelerinin (MKH), klinik kullanım açısından diğer kök hücrelere oranla daha avantajlı olduğu öne sürülmüştür. MKH'lerin çok yönlü potansiyelinin yanında, allojenik transfer sonrası immün reaksiyonun çok az olması, MKH'yi hücreselel terapi uygulamalarındaki doku tamir ve rejenerasyonlarında kullanılan ideal hücre tipi olarak tanımlanmasını sağlamıştır.

Kemik iliği stromal dokusu, retiküler hücreler, adipoz hücreleri, non-osteojenik hücreler, düz kas hücreleri, endotel hücreleri ve makrofajlar gibi heterojen hücre popülasyonlarından oluşmuştur.⁴ Herhangi bir yaralanma durumunda, stromal dokuda bulunan kök hücrelerin katılımıyla tamir meydana gelmektedir. Son yıllarda, kemik iliği stroma hücrelerinin osteoblast, kondrosit, adipozit, miyoblast, hepatosit, kardiyomyozit ve nöral hücrelere dönüşebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.⁵ MKH'ler, kemik iliği, periost, trabeküler kemik, adipoz doku, sinoviyum, iskelet kasları, diş pulpası ve periodonsiyumdan ayrıştırılabilir.⁶ Ancak, MKH'lerin elde edilmesi için kemik iliği stroması, öncelikli olarak tercih edilen bölgedir. Bu bilgiye paralel olarak literatürde kemik iliğinin osteojenik potansiyeli ile ilgili ilk bilgiler 1800'lü yıllarda yayımlanmıştır ve yirminci yüzyılın başlarında osteojenik rejenerasyonda kemik iliğinin rolünden bahsedilmeye başlanmıştır.⁷ Yetişkin kemik iliğinde güçlü osteojenik potansiyeli olan hücre popülasyonunu ilk

olarak 1976'da Friedensteyn tanımlamış ve görünümü fibroblast hücrelerine benzeyen ve aktif olarak çoğalan hücrelerin oluştuğunu gözlemlemiştir.⁸⁻¹⁰ MKH'lerin in vivo ve in vitro olarak osteoblastlara dönüşebildiği birçok çalışmada gösterilmiş ve literatürde MKH'ler içinde nadir de olsa sadece mezodermal değil, aynı zamanda endodermal dokulara dönüşebilen pluripotent hücrelerin de bulunduğu rapor edilmiştir.^{10,11} Bunun yanında MKH'ler, kan-kemik iliği bariyerinden geçerek dolaşıma da katılırlar ve ilgili organa giderek tamir olayına etki ederler.¹²

İN vivo ortamda yetişkinlerden MKH'ler, 10⁴-10⁶ gibi sınırlı sayıda elde edilebildiği için, MKH'ler uygulama öncesinde otolog serum desteğinde in vitro olarak çoğaltılırlar.¹³

Ateşli silah yaralanmaları, yüksek enerji düzeyli travma, ablatif tümör ya da kist cerrahisi, kronik osteomyelit ya da osteradyonekroz tedavisine yönelik tekrarlanan cerrahi debridmanlar gibi lokal nedenlerle ya da kemik metabolizmasının etkilendiği sistemik rahatsızlıklar sonucunda ortaya çıkabilen kraniyo-maksillofasyal bölgenin kemik kayıplarının giderilmesinde en uygun tedavi seçeneğinin belirlenmesine yönelik çalışmalar, hâlâ güncelliğini korumaktadır. Kemik kayıplarının tedavisinde, otojen greft uygulamaları, günümüzde altın standart olarak kabul edilmektedir.¹⁴⁻¹⁶ Ancak, elde edilebilecek greft miktarının sınırlı olması, donör saha morbiditesi ve greftin anatomik olarak defekt sahasına uyumlandırılması ile ilgili sorunlar, sıklıkla bildirilmektedir.¹⁷⁻¹⁹ Allojenik kemik nakli ya da kemik eşdeğerlerinin kullanımı, otojen greftleme uygulamalarına alternatif teşkil etmektedir. Ancak allojenik kemik nakli, hastalık bulaşma riski ve doku uyumluluğu gibi ciddi sorunları beraberinde getirirken, kemik eşdeğeri materyallerin kullanımı ile ilgili olarak sıklıkla karşılaşılan sorunlar, entegrasyonun gerçekleşmemesi ya da alıcı sahada sağkalım sürelerinin kısa olmasıdır.^{14,20} Bunun yanında, otojen ya da allojen greftlemelerin maliyeti, sadece ABD'de yıllık 2,5 milyar \$ olarak rapor edilmiştir.¹⁴ Tüm bu etmenler göz önüne alındığında, kemik rejenerasyonuna yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesine gereksinim olduğu ortadadır.

Bu çalışmanın amacı, kök hücre nakli yardımı ile yönlendirilmiş doku rejenerasyonu uygulayarak, oluşturulan yeni kemik dokusunun histolojik olarak incelenmesidir.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Araştırma, Gülhane Askeri Tıp Akademisi (GATA) Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı, Araştırma ve Geliştirme Merkezi ve Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Deneylere başlamadan önce GATA Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun öngördüğü hususlar yerine getirilmiş ve 13.10.2006 gün ve 06/102 numaralı kararı ile gerekli izin alınmıştır. Çalışmanın her aşamasında, tüm araştırmacılar tarafından hayvan haklarının korunmasına yönelik ilkelere bağlı kalmıştır. Ayrıca, çalışmanın protokolü GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Başkanlığı'na 21.06.2006 gün 06 numaralı toplantısında AR-2006/18 proje numarasıyla onaylanmış, tavşanların preoperatif ve postoperatif bakımları Araştırma ve Geliştirme Merkezi Başkanlığı veteriner hekimlerince yürütülmüştür.

Çalışma, GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Deney Hayvanları Bölümü'nde, ortalama ağırlıkları $5 \pm 0,5$ kg olan 7 yetişkin Yeni Zelanda deney tavşanı (*Oryctolagus Cuniculus*) üzerinde gerçekleştirilmiştir. Araştırma üç deney grubu ve bir kontrol grubu içerecek şekilde planlanmıştır. Mümkün olabilecek en az sayıda hayvan kullanmak amacıyla deney grupları her bir hayvanın kafatasında oluşturulmuştur. Miyamoto ve ark. tarafından tanımlanan yonteme benzer şekilde kafatasında dekortikasyon yapılan ve MKH uygulanan alan Grup A; kafatasında dekortikasyon yapılan ancak MKH uygulanmayan alan Grup B; kafatasında dekortikasyon yapılmayan ancak MKH uygulanan alan Grup C; kontrol grubu olarak planlanan, kafatasında dekortikasyon ve MKH uygulaması yapılmayan alan Grup D olarak adlandırılmıştır (Tablo 1).²¹

TİTANYUM BARIYER KAPSÜL VE KOLLAJEN HÜCRE TAŞIYICI

Bariyer kapsüllerin yapımında 0,6 mm kalınlığında titanyum kullanıldı. Bu kapsüller iç çapı 7 mm ve iç

TABLO 1: Çalışmada deney gruplarına yapılan uygulamalar.

Gruplar	Mezenşimal Kök Hücre (MKH)	
	Dekortikasyon	Uygulaması
A	+	+
B	+	-
C	-	+
D	-	-

yüksekliği 3,5 mm olacak şekilde "kubbe" şeklinde üretildi. Elde edilen kapsüller, üzerlerindeki yağ ve metal çapaklarından arındırmak için fırça ile temizlendi ve %80 etil alkol içinde bekletildi. Daha sonra steril serum fizyolojik ile yıkandı. Titanyum kapsüller tek tek paketlenildi ve 130°C'de 1 saat süreyle steril edildi.

Kollajen taşıyıcı olarak ise bir hemostatik sünger olan ve kolaylıkla temin edilebilen "Spongostan" (Ferrosan Medical Devices, Denmark) kullanıldı. Bu materyal, steril, kısa sürede absorbe olabilen, suda çözünmeyen, kolaylıkla şekillendirilebilen kollajen yapıda bir jelatin süngerdir.

MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERİN ELDE EDİLMESİ

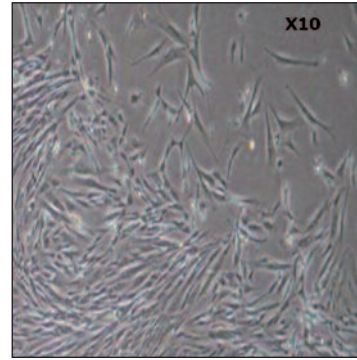
Araştırmamızda kullanılan 7 deney hayvanının haricinde, aynı standartta bir tavşana ksilazin ve oksitetrasiklin HCl ile genel anestezi uygulandıktan sonra, tibia proksimalinden 15 Ga. kemik iliği aspirasyon iğnesi kullanılarak heparinize edilmiş enjektör içinde 5 cc kemik iliği toplandı.

Elde edilen kemik iliği, MKH elde edilmek üzere GATA Araştırma Geliştirme Merkezi Tıbbi ve Kanser Araştırma Kısmı'na gönderildi. Burada kemik iliğinden mononükleer hücreleri ayırmak için kullanılan bir yöntem olan "Fikoll" separasyonu yapılarak toplanan kemik iliği, 2 mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin G, 100 mcg/mL streptomisin ve %15 fetal sığır serumu (Fetal Calf Serum-FCS, Gibco, USA) içeren 10 cc. "Modified Eagle's Medium" (MEM-Alfa, Gibco, USA) içinde kültüre edildi. Yetmiş iki saat sonra yüzen tüm hücreler atılarak, flasksın zeminine yapışmış hücrelere yeni besiyeri ilave edildi. Yedinci günde ilk kez görülmeye başlanan fibroblast benzeri kolonilerin besiyeri,

hücreler fosfatlı tamponlanmış tuzlu su (Phosphate Buffered Saline-PBS, Gibco, USA) ile yıkanarak, 14. güne kadar üç günde bir yenilendi. On dördüncü günde flask tabanı %70-80 oranında koloniler ile kaplandığında, tripsinizasyon ile koloniler yerlerinden kaldırılarak ilk pasaj gerçekleştirildi. Üçüncü veya dördüncü pasaj sonunda flask tabanına yapışmış fibroblastoid görünüşlü koloni yapan hücre süspansiyonuna ulaşıldı (Resim 1). Bu aşamaya yaklaşık 40. günde gelindi. Bu hücrelerin mezenşimal kökenli kök hücre olup olmadığı, ISCT'nin (The International Society for Cellular Therapy) mezenşimal kök hücre tanımlaması için belirlediği minimal kriterlere göre değerlendirildi.²² Bu kriterler şu şekilde sıralanmaktadır: (a) plastik yüzeye tutunma, (b) spesifik yüzey antijeni (Ag) sunumu (CD105, CD73 ve CD90 pozitif ($\geq\%95$), CD45, CD34, CD14 veya CD11b, CD79 α veya CD19 ve HLA-DR negatif ($\leq\%2$) ve (c) multipotent farklılaşma potansiyeli. Hücrelerin plastik yüzeye tutundukları izlenmiştir (Resim 1). Buna karşın, tavşana ait monoklonal antikorlar olmadığından immünofenotiplendirme yapılamamıştır. Hücrelerin multipotent farklılaşma potansiyelleri ise aşağıdaki şekilde gösterilmiştir.

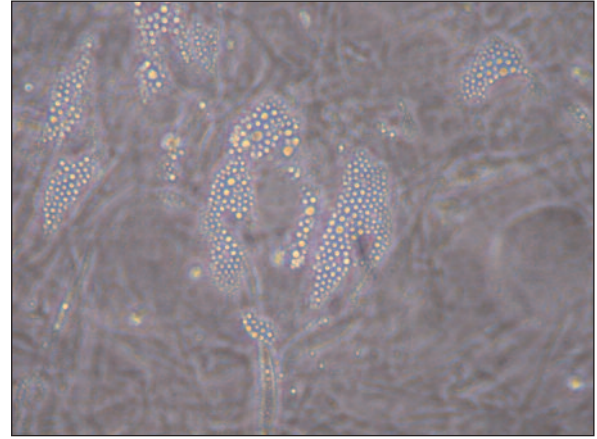
Adipojenik Farklılaşma: Besiyeri, 90 mL Mesencult Basal Medium (Stem Cell Tech., Vancouver, Canada) içine 10 mL Adipojenik Supplement ilave edilerek hazırlandı. Dilüsyonu yapılan mezenşimal kök hücreler T25'lik flaklarda 10 mL besiyeri içinde ekildi. Besiyerindeki renk değişimini takiben, besiyerinin 5 mL'si atılıp, üzerine 5 mL taze besiyeri ilave edildi. İki hafta sonra adipojenik farklılaşma lipit damlacıklarının görülmesi ile değerlendirildi (Resim 2).

Osteojenik Farklılaşma: Mezenşimal kök hücrelerin in vitro osteojenik farklılaşmasının değerlendirilmesi amacıyla, hücreler, flaskın zeminine yapışmaları için Liquid-Dulbecco's Modified Eagle Medium (L-DMEM) içinde 24 saat boyunca inkübe edildi. Ertesi gün hücrelerin içinde bulunduğu besiyeri, içinde %10 fetal sığır serumu, 100 nM dekametazon, 10 mM sodyum β -gliserofosfat ve 0,05 mM askorbik asit bulunan L-DMEM ile değiştirildi. Besiyeri üç günde bir değiştirildi. Osteojenik farklılaşma iki hafta sonra alkalen fosfataz ile boyanarak değerlendirildi (Resim 3).



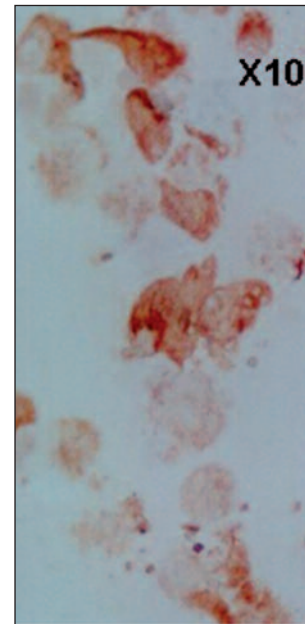
RESİM 1: Flask tabanına yapışmış fibroblastoid görünüşlü koloni yapan mezenşimal kök hücreler (x10).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 2: Hücrelerin adipojenik farklılaşmalarının gösterilmesi (x10).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 3: Hücrelerin osteojenik farklılaşmalarının gösterilmesi (Alkalen Fosfataz boyama, x10).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

Ayrıca hücreler “Vimentin” boyası ile de boyandı ve %95’in üzerinde pozitiflik gözlemlendi. Çalışma için uygun olduğuna karar verilen hücreler tripsinize edilerek, $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ olacak şekilde “Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium” (DMEM, Invitrogen Life Sciences, USA) ile hücre konsantrasyonu ayarlandı.

CERRAHİ YÖNTEM

Operasyondan önce enfeksiyon profilaksisi amacı ile oksitetrasiklin HCl 50 mg/kg intramusküler olarak uygulandı. Cerrahi işlemlere başlanmadan önce premedikasyon için intramusküler olarak 5 mg/kg ksilazine enjeksiyonu yapıldı. Daha sonra genel anestezi sağlamak için 20-40 mg/kg ketamin HCl uygulandı. Operasyona başlamadan önce, tavşanların tüyleri traş edilerek, Batticon solüsyonu ile bölgenin dezenfeksiyonu sağlandı. Operasyon sahası dışındaki bölgeler steril örtüler ile kapatıldı.

Deney hayvanının kafatasının transversal olarak tam ortasından, sagittal yönde yaklaşık 3 cm uzunluğunda cilt insizyonu yapıldı. Daha sonra, aynı doğrultuda periost insizyonu yapılarak, periost elevatör yardımı ile kaldırıldı. Kafatasının oksipital bölgesinde, pariyetal sütürün her iki tarafında, 1 mm çapında çelik frez kullanılarak 1 mm çap ve 1 mm derinlikte dekortike alanlar oluşturuldu.

Kollajen taşıyıcı, steril titanyum kapsülleri dolduracak şekilde yerleştirildi; dört titanyum kapsülün ikisine, toplam $100 \mu\text{L}$ içinde 1 000 000 adet hücre olacak şekilde hazırlanan MKH emdirildi. Bu şekilde kapsüllerin her birine 500 000 adet hücre implante edilmiş oldu. Kök hücreli kapsüllerden biri dekortikasyon yapılmış kemik yüzeyine, diğeri de dekortikasyon yapılmamış kemik üzerine, açık olan yüzü kemik yüzeye bakacak şekilde yerleştirildi. Diğer iki kapsül de içlerinde MKH’siz kollajen taşıyıcı olduğu halde dekortikasyon yapılmış kemik yüzeyi ile dekortikasyon yapılmamış bölgeye aynı tarzda yerleştirildi. Periost insizyon hattı, rezorbe olabilen 4,0 sütür ile kapsüllerin yerlerinde sabitlenmesini sağlayacak şekilde, kapsüllerin üzerinden gergin olarak sütüre edildi. Cilt insizyonu da 3,0 ipek sütür ile primer kapatıldı (Resim 4). Operasyon sahasının dezenfeksiyonu Batticon solüsyonu ile sağlandı.

Tüm deneklerin operasyon sonrasında bakım ve gözetimleri veteriner hekimler tarafından yapılarak, operasyon sonrasında tek başlarına bir kafeste kalmaları sağlandı. Postoperatif enfeksiyon profilaksisi için deneklere beş gün süreyle 12 saatte bir 50 mg/kg oksitetrasiklin HCl intramusküler olarak uygulandı.

SAKRİFİKASYON

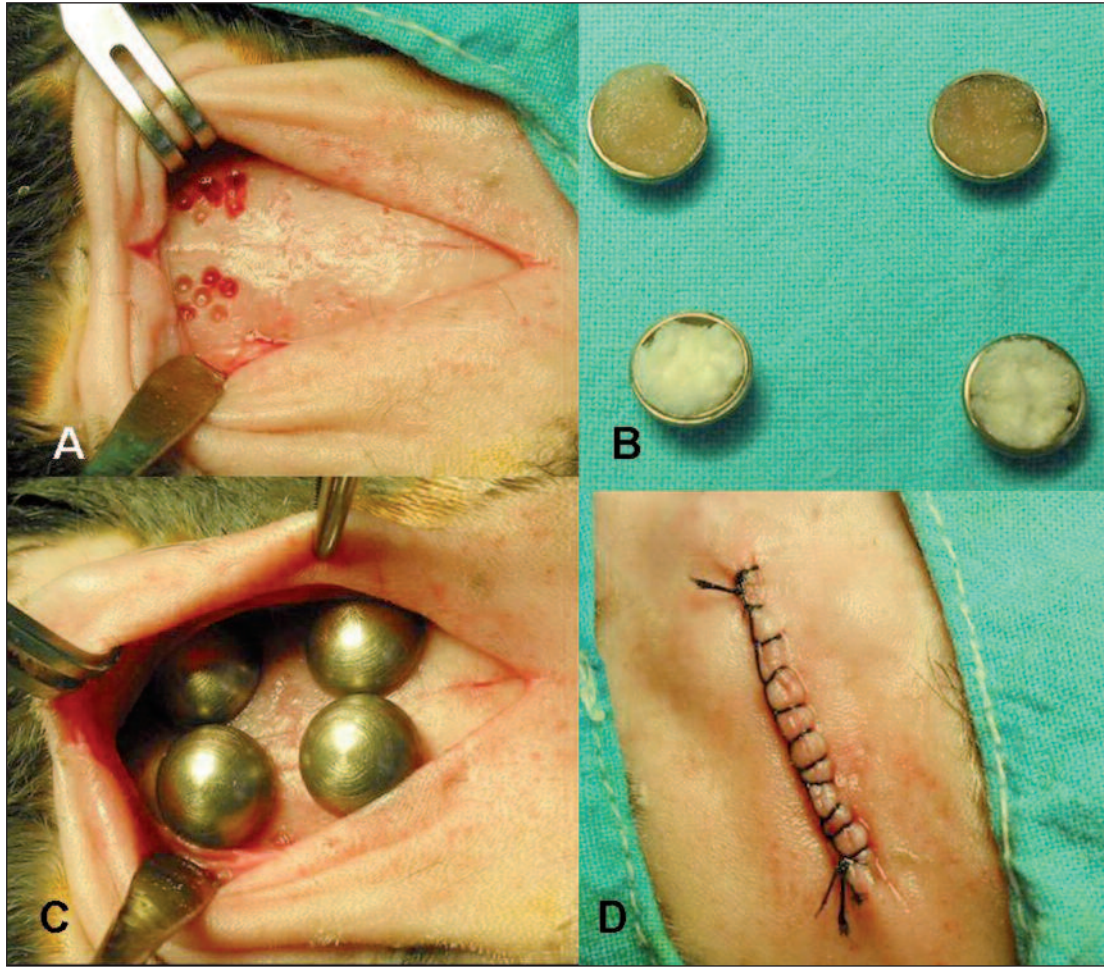
Deneklerin sakrifikasyonları postoperatif sekizinci haftada gerçekleştirildi. Denekler öncelikle ksilazin (3-5 mg/kg) ve ketamin (40 mg/kg) kombinasyonu ile genel anesteziye alınıp, daha sonra intrakardiyak sodyum pentobarbital (100 mg/kg) enjeksiyonu ile uyutuldu. Sakrifikasyon sağlandıktan sonra operasyon bölgesi açılarak, titanyum kapsüllerin bulunduğu bölge elmas diskler ve osteotomlar ile kafatasından ayrılarak çıkarıldı (Resim 5). Çıkarılan parçalar %10’luk formalin solüsyonuna konuldu.

ÖRNEKLERİN HAZIRLANMASI VE HİSTOPATOLOJİK İNCELEME

Sakrifikasyondan sonra kemikler 10 gün süreyle %10’luk formalin solüsyonu içinde fikse edildi. Daha sonra kemiklerin demineralizasyonu amacıyla hazırlanan asit solüsyonuna (200 cc %100 formik asit, 160 cc %37 hidroklorik asit ve 1640 cc çeşme suyu) kondu. Beş gün sonunda demineralizasyon tamamlandı, titanyum kapsülün altında kalan bölge kapsül dışındaki normal kemiği de içerecek şekilde kesildi. Plastik kasetlere alınan dokular parafin bloklara gömülerek parafinde iki gün bekletildi. Parafin bloklardan mikrotom kullanılarak 5 μm kalınlığında kesitler alındı ve bu kesitler Hematoksilen Eozin (HE) ile boyanarak histopatolojik incelemeye geçildi.

İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Verilerin işlenmesinde ve analizinde SPSS 15,0 (Chicago, USA) programı kullanıldı. İstatistiksel analizde öncelikle tüm gruplar birbiriyle aynı anda karşılaştırıldı, daha sonra ikişerli karşılaştırmalar yapıldı. Grupların tümünün karşılaştırılmasında “Kruskal-Wallis” testi, ikişerli karşılaştırılmalarında “Mann-Whitney U” testi kullanıldı. Grupların ikişerli karşılaştırılmasında “Bonferroni”



RESİM 4: A; Oksipital bölgede frezle yapılan dekortikasyon. B; Titanyum kapsüller ve içindeki kollajen taşıyıcı. C; Kapsüllerin periost altına yerleştirilmesi. D; cildin ipek sütür ile kapatılması.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

düzeltilmesi yapıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi olarak $p < 0,05$ kabul edildi.

BULGULAR

Hiçbir denekte klinik olarak herhangi bir komplikasyon gelişmedi. Postoperatif bekleme süresi sonunda sakrifiye edilen tavşanların kalvaryumlarından hazırlanan preparatlar, uzman bir patoloğ tarafından incelendi. Yapılan histopatolojik inceleme sonucunda gruplara göre aşağıdaki bulgular gözlemlendi:

Grup A: Histopatolojik incelemede çalışma bölgesinin tabanında kalvaryuma ait histolojik yapısı normal kemik dokusu görüldü. Kemik korteksinin üzerinde rejeneratif kemik oluşumu gözlemlendi. Rejeneratif kemik genel olarak altta belirgin bir hat oluşturmuş, kapsülün kenarlarından

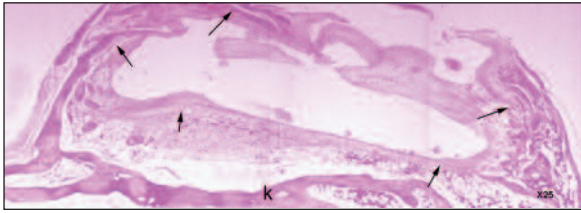


RESİM 5: Sakrifikasyon sonrası incelenecek bölgenin kalvaryumdan çıkarılması.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

yukarıya doğru ilerleyerek üst tarafta birleşmişti (Resim 6).

Grup B: Grubun histopatolojik incelemesinde kalvaryuma ait histolojik yapısı normal kemik gö-



RESİM 6: A grubundan x25 büyütmeyle alınan mikroskopik görüntü. Defekt tabanı, yanı ve üzerinde yeni kemik yapımı (oklar). Boş alanın alt kısmında kalvaryumun kompakt kemik dokusu (k) (HE).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

rüldü. Kompakt kemik yüzeyinde kırık iyileşmesinde benzer rejeneratif değişiklikler izlendi. Kompakt kemik üzerinde belirgin bir hat halinde rejeneratif kemik dokusu görüldü. Kapsülün kenarlarından yukarıya doğru uzanan rejeneratif kemik tespit edildi (Resim 7).

Grup C: Grubun histopatolojik incelemesinde kalvaryuma ait histolojik yapısı normal kemik görüldü. Kompakt kemiğin üzerinde rejeneratif kemik yapı belirgin bir şekilde görüldü. Rejenera-

tif kemiğin kapsülün kenarlarında da mevcut olduğu gözlemlendi (Resim 8).

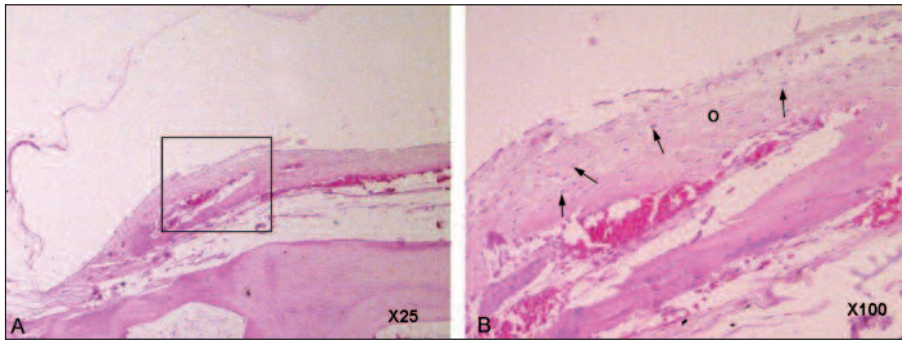
Grup D: Histopatolojik incelemede çalışma bölgesinde kalvaryuma ait histolojik yapısı normal kemik dokusu görüldü. Kemiğin kompakt ve spongiöz tabakaları izlendi, ancak genel olarak üzerinde rejeneratif kemik oluşumu görülmedi. Birkaç kesitte ise çok ince bir bant halinde rejeneratif kemik izlendi (Resim 9).

SKORLAMA KRİTERLERİ

Oluşan rejeneratif kemik miktarı aşağıdaki şekilde değerlendirildi:

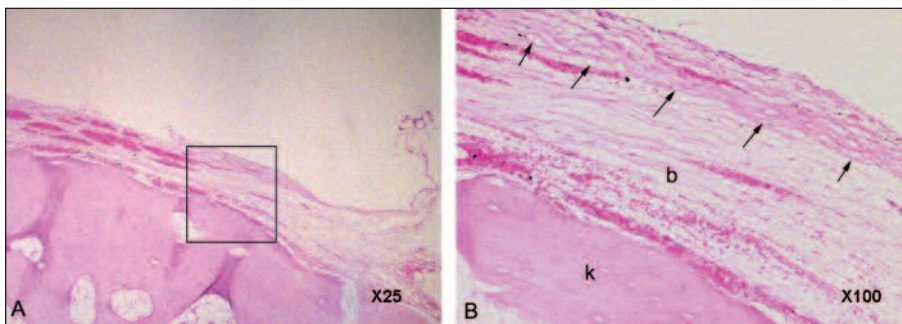
Skor 0: İncelenen kesitlerde kalvaryumun kompakt tabakasının üzerinde rejeneratif kemik oluşumu görülmedi.

Skor 1: Kesitler incelendiğinde kompakt kemiğin üzerinde ince bir hat halinde rejeneratif kemik oluşumu gözlenir.



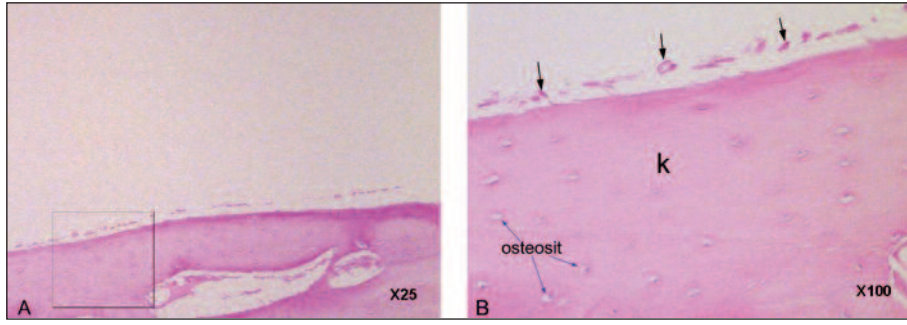
RESİM 7: A; B grubundan x25 büyütme ile alınan mikroskopik görüntü. Kalvaryal kemikte irregüler yüzeyin üzerinde bant halinde yeni kemik yapımı. Kapsülün içinde yan ve üst kısımlarda ince fibröz bağ dokusu bandı bulunmaktadır. Bu alanda kemik izlenmemiştir. **B;** işaretli alanın x100 büyütmesinde kısmen lameller görünüm içeren kemik ve üzerinde osteoid matris (o) içinde osteoblastik hücreler (oklar) (HE).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 8: A; C grubundan x25 büyütme ile alınan mikroskopik görüntü. **B;** işaretli bölgeden x100 büyütme ile alınan fotoğrafta kalvaryum kemiği (k), üzerinde ince bağ dokusu (b) ile defekt tabanında yeni kemik yapımı (oklar) (HE).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



RESİM 9: A; D (kontrol) grubundan x25 büyütme ile alınan mikroskopik görüntü. **B;** işaretli bölgenin x100 büyütmesinde kalvaryuma ait kompakt kemik dokusu (k). Kemikte rejenerasyon izlenmemektedir. Kapsül içine bakan yüzeyinde ince tek hücreli hat halinde yeni periost oluşumu (oklar) (HE). (Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

Skor 2: Kalvaryumun kompakt tabakasının üzerinde belirgin rejeneratif kemik oluşumu gözlenir.

Skor 3: Kompakt tabakanın üzerindeki belirgin rejeneratif kemik oluşumu titanyum kapsüllerin kenarlarında kapsülün içine doğru uzantılar yapmaktadır.

Skor 4: Bu tip kesitlerde rejeneratif kemik oluşumu kemik korteksinin üzerinde belirgindir ve kapsülün kenarlarından kapsül içine doğru uzayarak birleşmiş ve titanyum kapsüllerin içini doldurmuştur; ancak ortasında boş alan görülmektedir.

Skor 5: Bu tip kesitlerde kemik titanyum kapsülün içini tamamen doldurmuştur.

Deneklerin kalvaryumundan hazırlanan histopatolojik kesitlerin uzman patoloğ tarafından incelenmesinden sonra, yeni kemik dokusu skorlarının ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 2’de görülmektedir.

Deney gruplarının tümü birbiri ile “Kruskal-Wallis” testiyle karşılaştırıldığında, deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (Tablo 2).

Grupların ikişerli karşılaştırmalarında “Mann-Whitney U” testi sonuçlarına göre; grupların ikili karşılaştırılmaları sonucunda “Bonferroni” düzeltmesi (Bonferroni düzeltmesi gereği $p < 0,008$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir) yapıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (Tablo 3).

TABLO 2: Grupların skorlarının tanımlayıcı istatistiksel değerleri ve tüm grupların “Kruskal-Wallis” testi ile karşılaştırılması.

Gruplar	Ortanca	Persantil 25	Persantil 75	p
A	4,0	3,0	4,0	0,006
B	2,0	2,0	3,0	
C	3,0	2,0	3,0	
D	0,0	0,0	1,0	

İstatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$).

TABLO 3: İkişerli gruplu karşılaştırmada “Mann-Whitney U” testi sonuçları.

Gruplar	p	Fark
A-B	0,024	Anlamsız
A-C	0,226	Anlamsız
A-D	0,009	Anlamsız
B-C	0,184	Anlamsız
B-D	0,031	Anlamsız
C-D	0,015	Anlamsız

Karşılaştırmada “Bonferroni” düzeltmesi kullanılmıştır.

$p < 0,05$ değerler istatistiksel olarak anlamlıdır. Ancak bu tabloda, grupların ikişerli Mann-Whitney U testi ile karşılaştırılmasında, “Bonferroni düzeltmesi” ($p/6$) gereği $p \leq 0,008$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

TARTIŞMA

Kemik, anatomik ve fizyolojik yapısından dolayı özellikle doku tamir ve rekonstrüksiyonlarında vücudun birçok dokusundan farklıdır. Kemik dokularının iyileşmesi sırasında epitelyal dokular, mezenşimal dokulardan daha hızlı proliferasyon göstermekte ve boşlukları doldurarak ideal kemik iyileşmesini engellemekte-

dir.²³ Bu nedenle, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu sağlamak için kullanılan materyallerde, dış yüzey bariyer özelliği gösterirken, iç yüzey rejenerasyonu stimüle edecek özellikte olmalıdır. Böylece kemik dokusunun büyüme, farklılaşma ve matürasyonu ideale yakın şekilde ve en kısa sürede sağlanmış olur.²⁴

Kraniyo-maksillofasyal cerrahi alanında kök hücre çalışmalarının son zamanlarda hızla arttığı gözlenmektedir.²⁴⁻²⁷ Miyamoto ve ark., 12 Japon tavşanı üzerinde periostal MKH uygulamasını, titanyum ve *poli-L-laktik asit* (PLLA) kapsüller kullanılarak gerçekleştirilen yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ile yapmışlardır.²¹ Yapılan histopatolojik inceleme sonucunda, kollajen taşıyıcı ihtiva eden gruplarda değişen derecelerde boş, ölü alanlar tespit edilmiştir. Kapsülün içinde hiçbir madde bulunmayan grupla karşılaştırıldığında, kollajen taşıyıcının kemik oluşumu üzerinde negatif etkisinin bulunduğu ortaya konmuştur. Çalışma sonucunda titanyum ve PLLA kapsüller altında oluşan kemik miktarı ve kalitesinde herhangi bir fark olmadığı görülmüş ve periosttan alınan hücrelerin implante edildiği kapsüllerin altında diğer gruplardan daha yüksek oranda proliferasyon aktivitesi tespit edilmiştir. Bu çalışmada da Miyamoto ve ark., yapmış olduğu çalışmanın bulgularına paralel olarak, titanyum kapsüller altında boş alanlar tespit edilmiştir. Bu durum, kollajen taşıyıcının çabuk rezorbe olmayarak yer kapladığını, yeni kemik oluşumu için alanı daralttığını ve rezorbe oldukça yerini yeni kemiğe bıraktığını düşündürmektedir. Buna ilave olarak, bu çalışmada yeni kemik miktarının en çok görülebildiği grup, MKH uygulanarak dekortikasyon yapılan grup olmuştur. Bu sonuç, Miyamoto ve ark. tarafından yapılan çalışmanın sonucuyla benzer özellik sergilemektedir.²¹

Literatürde MKH'lerin sentetik kemik materyalleri ile kullanıldığı çalışmalar da mevcuttur. Kadiyala ve ark., sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarda, deneysel olarak oluşturdukları defektlere MKH ile birlikte poröz seramik implante etmişlerdir.²⁵ Ohgushi ve ark. ise benzer bir çalışmada kemik iliği kullanmışlardır.²⁶ Çalışmaların sonucunda yalnız seramik uygulanmış defektlerde çok az miktarda yeni kemik oluşurken, diğer de-

fektlerde kemik rejenerasyonunun ideal bir şekilde elde edildiğini bildirmişlerdir.

Ueda ve ark., fibuladan ayrıştırılan MKH'leri, tavşanlarda sinüs tabanını yükseltmek için yaptıkları operasyonda β trikalsiyum fosfat (TCP) ile birlikte kullanmışlardır.²⁸ Çalışmanın sonucunda, TCP ile MKH'nin birlikte uygulandığı deney grubunda lamellar yapıya sahip yeni kemik oluştuğu gözlenmiştir. Bunun yanında Ueda ve ark., fibuladan MKH izolasyonunu kolay olması nedeniyle tercih ettiklerini belirtirken, bu çalışmada, kemik iliği, tavşanın tibiasından ayrıştırılmıştır. Deneyimlerimize göre, fibuladan 1 cc kemik iliği alınabilirken, tibiadan 5 cc kemik iliği elde edilebilmektedir. Yoshikawa ve ark., sıçanlarda yaptıkları bir çalışmada, sıçanın femurundan aldıkları kemik iliği hücrelerini, kültür ortamında hidroksi apatitle birleştirmiş ve in vitro ortamda hidroksi apatit porlarının yüzeyinde kemik oluşturmuşlardır.²⁹ Bu yolla kompozit greft elde etmişler ve bunu kansellöz kemik grefti ile karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda kompozit greftin kansellöz kemik greftine göre daha yüksek oranda osteoblastik aktiviteye sahip olduğu ortaya konmuştur. Lechner ve Huss yaptıkları in vitro çalışmada, kök hücre uygulamalarında kullanılabilir ve iskelet teşkil edebilecek biyomateryalleri karşılaştırmışlardır.⁶ Transplante edilebilecek kompozit greftleri oluşturabilmek için kollajen, hidroksiapatit ve TCP kullanmışlar, bu maddeleri MKH ile birlikte 28 gün kültüre etmişlerdir. Sonuçta hepsinde birbirine benzer biyolojik yanıtlar elde etmişlerdir.

Ohya ve ark., yaptıkları çalışmada, MKH ile kansellöz kemik partiküllerinin sinüs tabanı yükseltme operasyonlarında yeni kemik oluşumuna etkisini karşılaştırmıştır.³⁰ Bunun için iliak kemikten ayrıştırılan MKH ve kansellöz kemik, trombosit zengin plazma (TZP) ile karıştırılarak 18 yetişkin Japon tavşanına uygulanmıştır. Sekizinci haftada hayvanların sakrifiye edildiği çalışmanın sonucunda, MKH-TZP karışımının, osteogenez ve kemik hacmi açısından otojen kemik-TZP karışımından üstün olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, TZP her iki grupta da kullanıldığından, MKH'lerin osteojenik potansiyelinin ve oluşan yeni kemik miktarı açısından otojen kemik greftinden

üstün olduğu anlaşılmaktadır. Sakrifikasyon sürelerinin çalışmamızla aynı olmasına rağmen, elde edilen yeni kemik miktarı, Ohya ve ark.nın çalışmalarında elde edilenden daha düşüktür. Bu durum, defekt alanının Ohya ve ark.nın çalışmasında kemiğin içinde olması ve bu nedenle hücrelerin beslenmesinin daha iyi olması hipotezi ile ilişkilendirilebilir.³⁰

Buna ilave olarak, Ueda ve ark., sinüs tabanını kaldırdıklarından, yeni kemiğin oluşabilmesi için kavite şeklinde bir boş alan elde etmişler ve böylece bariyer olarak membran kullanılabilmiş ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu uygulayabilmişlerdir.²⁸ Çalışmamızda ise kemik yüzeyi düz bir hat halinde olduğundan, titanyum kapsüller ile bariyer oluşturmak zorunda kalınmıştır. Ayrıca, kök hücrelerin kemik yüzeyinde tutunmaları güç olduğundan, MKH'ler kapsül içindeki kollajene emdirilerek yerleştirilmiştir.

Araştırmamızda çalışma koşulları göz önüne alınarak, kompozit bir greft hazırlama yerine in vitro koşullarda kemik iliğinden ayırtığımız MKH'lerin sayısı artırılmış ve MKH'ler kemik üzerine, kapsüllerin içine yerleştirilen kollajen taşıyıcılar aracılığı ile implante edilmiştir. Lechner ve Huss'un, kollajen taşıyıcıların kullanımı ile ilgili olumlu yöndeki bulgularına rağmen, Miyamoto ve ark. tarafından yapılan çalışmada olduğu gibi, bizim çalışmamızda da hücrelere iskelet teşkil edecek materyal olarak kullanılan kollajen taşıyıcı, oluşan yeni kemik içerisinde boş alanların oluşmasına neden olmuştur.^{6,27} Bu nedenle, ileride yapılacak çalışmalarla saptanabilecek daha uygun bir taşıyıcı materyal başarıyı artıracaktır.

Li ve Li, tavşanların mandibulasında deneysel olarak oluşturdukları defektlerin tamirinde, kemik iliğinden ayırttıkları ve kültürde osteoblasta dönüştürdükleri hücreleri deneysel olarak oluşturulan defekte implante etmişler ve kontrol grubuna

demineralize kemik grefti uygulamışlardır.³¹ On iki hafta sonunda kontrol tarafında kısmi defekt mevcutken, deney tarafında tamamen iyileşme olduğu tespit edilmiştir. Çalışmamızda oluşturulan kemik defekti dekortikasyonla sınırlıdır ve deney sonunda dekortikasyon yapılan her iki grupta da korteks tamir olmuş, ancak korteksin üzerinde yeni kemik oluşumu MKH uygulanan grupta daha fazla miktarda bulunmuştur. Bunun yanında, dekortikasyon yapılarak implante edilen MKH'lerin, dekortikasyon sayesinde daha iyi beslenebildiği de düşünülebilir.

Lokal çalışmaların yanı sıra sistemik kemik bozukluklarında da kök hücrelerin kullanılması ile ilgili çalışmalar da yapılmaktadır. Pereira ve ark., radyasyona maruz bırakılmış farelerde sistemik doluşma verilen MKH'lerin, kemik ve kırık dokusunda rejenerasyon süreci üzerine olan olumlu etkilerini göstermişlerdir.³² Krampera ve ark., osteogenezis imperfektalı çocuklara kemik iliği hücreleri aşılandığında, yan etki görülmemesi bir yana, üç ay sonra osteoblast sayısında, yeni lameller kemik oluşumunda ve tüm vücut mineral içeriğinde artış sağlandığını ortaya koymuştur. Bunlara ek olarak kırık frekansı azalmış, vücut büyüme oranı artmıştır.³³

SONUÇ

MKH uygulamaları kraniyomaksillofasyal bölgedeki kemik yükseltme teknikleri içinde, önemi vurgulanması gereken bir yöntemdir. MKH uygulamaları, yeni kemik dokusu oluşumunu başarılı bir şekilde indüklemektedir; defekte göre üretilecek yönlendirilmiş doku rejenerasyonu kafesleri ile gereksinim duyulan hacim ve şekilde kemik dokusu elde edilmesi mümkün olabilir. Bu durum özellikle vertikal yönde augmentasyon gerekliliğinin sıkça hissedildiği alveol kret üzerindeki dental uygulamalar açısından büyük önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Gürbüz Y, Şahin F, Özdedeli S, Öktem G, Avcı ÇB, Saydam G, et al. Experimental repair of rabbit segmental bone defects by using autologous bone marrow and electrical stimulation. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2010; 30(2):623-30.
2. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000 2006;40(1):164-72.
3. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif* 2004;37(1):97-110.
4. Fibbe WE. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair. *Ann Rheum Dis* 2002;61(Suppl 2):i29-i31.
5. Kortedidis A, Zannettino A, Isenmann S, Shi S, Lapidot T, Gronthos S. Stromal-derived factor-1 promotes the growth, survival, and development of human bone marrow stromal stem cells. *Blood* 2005;105(10):3793-801.
6. Lechner S, Huss R. Bone engineering: combining smart biomaterials and the application of stem cells. *Artif Organs* 2006;30(10): 770-4.
7. Jensen J, Sindet-Pedersen S. Autogenous mandibular bone grafts and osseointegrated implants for reconstruction of the severely atrophied maxilla: a preliminary report. *J Oral Maxillofac Surg* 1991;49(12):1277-87.
8. Friedenstein AJ. Marrow stromal fibroblasts. *Calcif Tissue Int* 1995;56(Suppl 1):S17.
9. Friedenstein AJ. Precursor cells of mechanocytes. *Int Rev Cytol* 1976;47:327-59.
10. Derubeis AR, Cancedda R. Bone Marrow Stromal Cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances. *Ann Biomed Eng* 2004;32(1):160-5.
11. Taguchi K, Ogawa R, Migita M, Hanawa H, Ito H, Orimo H. The role of bone marrow-derived cells in bone fracture repair in a green fluorescent protein chimeric mouse model. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 331(1):31-6.
12. Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106(6): 1901-10.
13. Fehrer C, Lepperding G. Mesenchymal stem cell aging. *Exp Gerontol* 2005;40(12): 926-30.
14. Monaco E, Bionaz M, Hollister SJ, Wheeler MB. Strategies for regeneration of the bone using porcine adult adipose-derived mesenchymal stem cells. *Theriogenology* 2011;75(8): 1381-99.
15. Habal MB. Bone tissue engineering applications in craniofacial reconstructive surgery. *Clin Plast Surg* 2004;31(3):387-92.
16. Brevi BC, Magri AS, Toma L, Sesenna E. Cranioplasty for repair of a large bone defect with autologous and homologous bone in children. *J Pediatr Surg* 2010;45(4):E17-20.
17. Conway JD. Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *Orthop Clin North Am* 2010; 41(1):75-84.
18. Kohn D, Sander-Beuermann A. Donor-site morbidity after harvest of a bone-tendon-bone patellar tendon autograft. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 1994;2(4):219-23.
19. Grayson WL, Frohlich M, Yeager K, Bhumiratana S, Chan ME, Cannizzaro C, et al. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107(8): 3299-304.
20. Khan SN, Cammissa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 2005;13(1): 77-86.
21. Miyamoto I, Tsuboi Y, Takahashi K, Hyon SH, Iizuka T. Enhancement of bone volume in guided bone augmentation by cell transplants derived from periosteum: an experimental study in rabbit calvarium bone. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(3):308-14.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8(4):315-7.
23. Laurell L, Gottlow J, Zybuz M, Persson R. Treatment of intrabony defects by different surgical procedures. A literature review. *J Periodontol* 1998;69(3):303-13.
24. Vanheusden AJ, Goffinet G, Zahedi S, Nusgens B, Lapière CM, Rompen EH. In vitro stimulation of human gingival epithelial cell attachment to dentin by surface conditioning. *J Periodontol* 1999;70(6):594-603.
25. Kadiyala S, Young RG, Thiede MA, Bruder SP. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro. *Cell Transplant* 1997; 6(2):125-34.
26. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand* 1989;60(3):334-9.
27. Yamada Y, Ueda M, Naiki T, Nagasaka T. Tissue-engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clin Oral Implants Res* 2004;15(5):589-97.
28. Ueda M, Sumi Y, Mizuno H, Honda M, Oda T, Wada K, et al. Tissue engineering: applications for maxillofacial surgery. *Materials Science and Engineering: C* 2000;13(1):7-14.
29. Yoshikawa T, Ohgushi H, Tamai S. Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 1996;32(3):481-92.
30. Ohya M, Yamada Y, Ozawa R, Ito K, Takahashi M, Ueda M. Sinus floor elevation applied tissue-engineered bone. Comparative study between mesenchymal stem cells/platelet-rich plasma (PRP) and autogenous bone with PRP complexes in rabbits. *Clin Oral Implants Res* 2005;16(5):622-9.
31. Li Z, Li ZB. Repair of mandible defect with tissue engineering bone in rabbits. *ANZ J Surg* 2005;75(11):1017-21.
32. Pereira RF, Halford KW, O'Hara MD, Leeper DB, Sokolov BP, Pollard MD, et al. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(11):4857-61.
33. Krampera M, Pizzolo G, Aprili G, Franchini M. Mesenchymal stem cells for bone, cartilage, tendon and skeletal muscle repair. *Bone* 2006;39(4):678-83.