

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**PERİKONDRIUM ETKİSİYLE YAĞ DOKUSU
KAYNAKLI YETİŞKİN MEZENŞİMAL KÖK
HÜCRELERDEN KIKIRDAK ELDE EDİLMESİ:
(TAVŞANLAR ÜZERİNDE DENEYSEL
ÇALIŞMA)**

DR. ARAZ SALMANOV

TIPTA UZMANLIK TEZİ

İZMİR - 2010

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE
ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI

**PERİKONDRIUM ETKİSİYLE YAĞ DOKUSU
KAYNAKLI YETİŞKİN MEZENŞİMAL KÖK
HÜCRELERDEN KIKIRDAK ELDE EDİLMESİ:
(TAVŞANLAR ÜZERİNDE DENEYSEL
ÇALIŞMA)**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

DR. ARAZ SALMANOV

Danışman: DOÇ. DR. HALUK VAYVADA

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2009 KB SAG 24 sayı ile desteklenmiştir

İÇİNDEKİLER

1- ÖZET	1
2- GİRİŞ	3
• Amaç	4
3- GENEL BİLGİLER	5
• Kıkırdak	5
<i>Yapısı ve görevi</i>	5
<i>Perikondriumun özellikleri</i>	5
• Kıkırdak Onarımında kullanılan Yöntemler	6
<i>Mekanik yöntemlerle kıkırdak rejenerasyonunun artırılması</i>	6
<i>Başka materyallerle onarım</i>	6
<i>Doku mühendisliği</i>	8
• Kök Hücreler	9
<i>Tanımı</i>	9
<i>Özellikleri</i>	9
<i>Embriyonik kök hücreler</i>	10
<i>Yetişkin mezenşimal kök hücreler</i>	11
<i>Çevrenin kök hücrelere etkisi</i>	13
• Yetişkin Mezenşimal Kök Hücre Kaynakları	14
<i>Kemik iliği kaynaklı yetişkin mezenşimal kök hücreler</i>	14
<i>Cilt kaynaklı mezenşimal yetişkin kök hücreler</i>	15
<i>Amniyotik sıvı kaynaklı yetişkin mezenşimal kök hücreler</i>	15
<i>Umbilikal kord kaynaklı yetişkin mezenşimal kök hücreler</i>	16

•	Yağ Dokusu Kaynaklı Yetişkin Mezenşimal Kök Hücreler	16
	<i>Tarihçe</i>	16
	<i>Özellikleri ve avantajları</i>	18
	<i>Kıkırdak onarımında yeri</i>	18
4-	GEREÇ VE YÖNTEM	21
•	Ön Çalışma	21
	<i>İn vitro kıkırdak elde edilmesi</i>	22
	<i>İn vivo kıkırdak elde edilmesi</i>	23
•	Deney Grupları	25
	<i>Grup 1.</i>	25
	<i>Grup 2.</i>	26
	<i>Grup 3.</i>	26
•	DeneySEL Prosedür	28
	<i>Birinci cerrahi prosedür; cilt alt yağ dokusu elde edilmesi</i>	28
	<i>Yağ dokusundan SVF elde edilmesi</i>	29
	<i>ADAS hücrelerinden kültür elde edilmesi</i>	33
	<i>Büyüme faktörü aracılığıyla ADAS hücrelerin kartilojeneze yönlendirilmesi</i>	33
	<i>ADAS hücrelerin işaretlenmesi</i>	33
	<i>İkinci cerrahi prosedür; kıkırdak defekti oluşturulması</i>	34
•	Değerlendirme	37
	<i>Makroskobik değerlendirme</i>	37
	<i>Mikroskobik değerlendirme</i>	37
5-	BULGULAR	40
•	Makroskobik Değerlendirme	40
	<i>Grup 1.</i>	40
	<i>Grup 2.</i>	40
	<i>Grup 3.</i>	40

• Mikroskopik Değerlendirme	44
<i>Grup 1.</i>	44
<i>Grup 2.</i>	47
<i>Grup 3.</i>	48
• İstatistiksel Değerlendirme	52
6- TARTIŞMA	53
7- SONUÇ VE ÖNERİLER	62
8- KAYNAKLAR	63

TABLO LİSTESİ

Tablo 1	39
Tablo 2	53

ŞEKİL LİSTESİ

Resim 1	12
Resim 2	22
Resim 3	23
Resim 4	24
Resim 5	25
Resim 6	27
Resim 7	28
Resim 8	29
Resim 9	30

Resim 10	31
Resim 11	31
Resim 12	32
Resim 13	32
Resim 14	35
Resim 15	35
Resim 16	36
Resim 17	36
Resim 18	39
Resim 19	41
Resim 20	42
Resim 21	42
Resim 22	43
Resim 23	43
Resim 24	44
Resim 25	45
Resim 26	45
Resim 27	46
Resim 28	46
Resim 29	47
Resim 30	48
Resim 31	49
Resim 32	50
Resim 33	50
Resim 34	51
Resim 35	51

KISALTMALAR

- Mezenşimal kök hücre MKH
- Embriyonik kök hücre EKH
- *Aipose derived adult stem cell* ADAS
- Yetişkin mezenşimal kök hücre YMKH
- Yetişkin yağ dokusu kaynaklı kök hücre YYDKKH
- Stromal vasküler fraksiyon SVF
- Alcian blue AB
- Hemotoksilin Eozin HE

PERİKONDRIUM ETKİSİYLE YAĞ DOKUSU KAYNAKLI YETİŞKİN MEZENŞİMAL KÖK HÜCRELERDEN KIKIRDAK ELDE EDİLMESİ: (TAVŞANLAR ÜZERİNDE DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Araz SALMANOV

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

E-mail: zerdabi2002@yahoo.com

ÖZET

Belirli boyutun üzerindeki kıkırdak defektlerinin onarımı zordur. Bu defektlerin onarımında en sık kullanılan yöntem otolog kıkırdak greftleridir. Donör alan kısıtlaması bu yöntemin en önemli dezavantajıdır. Bu çalışmada yetişkin yağ dokusu kökenli mezenşimal kök hücrelerden perikondriumun salgıladığı büyüme faktörlerinin etkisiyle kıkırdak elde edilebilirliği ve kıkırdak defektlerinin bu yolla onarımı araştırıldı.

Bu amaçla tavşan kulağında perikondrium korunarak 2x2 cm kıkırdak defekti oluşturuldu, aynı tavşandan cilt altı yağ dokusu alınarak SVF elde edildi. ADAS hücreleri Dil boyası ile işaretlenerek üç farklı grupta deneye tabi tutuldu. Kıkırdak defektlerine Grup 1 de ADAS tan zengin SVF, Grup 2 de kültüre edilerek çoğaltılmış ADAS hücreleri ve Grup 3 te kültüre edilerek çoğaltılmış ve kartilojeneze yönlendirilmiş ADAS hücreleri verildi.

40 gün sonra tavşanlar sakrifiye edilerek kıkırdak defektlerinde oluşan onarım dokusu makroskobik ve mikroskobik olarak değerlendirildi. Sonuçlar *Student t*-testi ile istatistiksel analize tabii tutuldu($p<0,05$).

Sonuç olarak; SVF kullanılan Grup 1. denek grubunda makroskobik olarak yeni kıkırdak benzeri doku oluşumu saptansa da istatistiksel olarak kontrole nazaran anlamlı fark bulunmadı. Çoğaltılmış ADAS verilen Grup 2. denek grubunda ve çoğaltılarak kartilojeneze yönlendirilmiş ADAS verilen Grup 3. denek grubunda

defektlerin tam ve tama yakın onarıldığı saptandı. Fakat oluşan kıkırdağın kalitesinin orijinal kulak elastik kıkırdak kalitesinden düşük olduğu görüldü.

Anahtar kelimeler: Yetişkin yağ dokusu kaynaklı mezenşimal kök hücre, kıkırdak rejenerasyonu, mezenşimal kök hücre, kıkırdak rekonstrüksiyonu

SUMMARY

Repair of large cartilage defects is mostly problematic. For this, autologous cartilage grafts are most preferred one among the reconstructive alternatives. The most important disadvantage of this method is limited donor area. In this study, it was investigated the possibility of regeneration of new cartilage tissue creating by adult adipose derived mesenchymal stem cells to be stimulated by perichondrium which secretes growth factors.

For this purpose, three different groups (Group 1, 2 and 3) were designed by using both ears of the rabbits. The 2x2 cm cartilage defects were created leaving perichondrium intact in the rabbit's ears. The defects of the right ears were used as experimental side and the left ones were used as control side in the same animal. Stromal vascular fraction (SVF) was obtained by taking subcutaneous fat tissue from the same animal. Adipose derived adult stemcell (ADAS) were put to assay in three different groups by marking Dil stain. ADAS rich SVF was applied into the cartilage defect in group 1, replicated ADAS in culture into the cartilage defect in group 2 and replicated and redirected in culture ADAS into the cartilage defect in group 3.

After follow-up period, the rabbits have sacrificed after 40 days and the repaired tissue in the cartilage defects were evaluated by macroscopic and microscopic methods. The results were statistically analyzed with the Student t- test (p value was 0.05).

As a result, although the experimental defects in the group 1 have showed cartilage-like tissue, no important statistically difference was found with the result of the controls. The group 2 and 3 have showed complete or near-complete cartilage formation in the defects by application ADAS.

In conclusion; the replicated ADAS used in the group 2 and the replicated and redirected ADAS used in the group 3 have produced complete or near-complete cartilage formation in the defects. But, the quality of the new-formed cartilage has showed lower than the original elastic cartilage of the ear.

Key words: Adipose derived adult stem cell, cartilage regeneration, mesenchymal stem cell, cartilage reconstruction

GİRİŞ

Doğumsal ve edinsel (travma, tümör, rezeksiyon vb.) nedenlerle kıkırdak defektleri oluşmaktadır. Oluşan kıkırdak defektleri fonksiyonel ve estetik sorunlar yaratmaktadır. Kıkırdağın kendini yenilemesi sınırlıdır ve genellikle yetersizdir, bu nedenle bu olgularda oluşan kıkırdak defektlerinin onarımı gerekmektedir(1-3).

MKH ile kıkırdak defektlerinin onarımına dair yapılmış çalışmalar mevcuttur. Çalışmalar sırasında büyüme faktörleri ve diğer pahalı hücre ayırma ve kültür yöntemleri kullanılmış, bazı pozitif sonuçlar da elde edilmiştir(4-6). Bu çalışmalar pahalı ve uzun sürelidir. Ayrıca küçük çaplı (3-4mm) ve büyüme faktörlerinden zengin eklem yüzeylerinde osteokondral defektlerin onarımında başarı sağlanmıştır, fakat klinikte uygulanabilir bir yöntem geliştirilmesine olanak sağlamamıştır(4,6).

Yetişkin yağ dokusu kaynaklı mezenşimal kök hücreler (Adipose derived adult stem cell, ADAS) 2001 yılında Zuk ve arkadaşları tarafından insan yağ dokusundan elde edilmiştir(7-8). ADAS hücrelerinin en önemli avantajları arasında elde edilmelerinin diğer kök hücre kaynaklarına göre kolay olması, verici alan morbiditesinin minimal olması, kültüre edildiklerinde üreme özelliklerini ve multipotentiğini kaybetmemeleri sayılabilir. İn vivo ve in vitro çalışmalar ile ADAS hücrelerinin osteojenik, kondrojenik, adipojenik, hepatik, nörojenik yönlere farklılaşabildikleri saptanmıştır(9-12).

Bilindiği gibi kök hücrelerin farklılaşmasında mikroçevre çok önemli role sahiptir(13). Kıkırdak oluşumunda ise ana kaynak perikondriumdur(14). Perikondrium küçük çaplı kıkırdak defektlerini onarabilmektedir, oysa daha büyük

defektlerde yetersiz kalmaktadır(15-18). Perikondriumun kıkırdak rejenerasyonu sırasında büyüme faktörleri salgıladığı bilinmektedir(19). Tavşanlar üzerinde yapılan bu çalışma sırasında ADAS hücrelerinin perikondriumun salgıladığı büyüme faktörlerinin etkisiyle kıkırdak hücrelerine dönüşümünün sağlanabileceği hipotezi incelendi.

Amaç

1- Perikondrium etkisiyle ADAS tan kıkırdak elde ederek kıkırdak defektlerinin onarımında kullanılabilirliğinin araştırılması.

2- Kıkırdak elde edilebilmesi açısından kültüre edilmiş, kültüre edilmemiş ve büyüme faktörü kullanılarak kartilojeneze yönlendirilmiş ADAS hücrelerinin kullanılması ve başarı oranlarının karşılaştırılması.

3- Daha ucuz ve basit bir yolla elde edilen ADAS içeren SVF den kıkırdak elde edilebilirliğinin ve kıkırdak defektlerinin onarımında kullanımının araştırılması.

4- Literatürde MKH ile kıkırdak defektlerinin onarımı ile ilgili çalışmalar küçük(3-4mm) defektlerde yapılmıştır. Bu çalışmada 2x2 cm boyutlarında defektler oluşturularak yöntemin başarısı incelenmiştir. Büyük kıkırdak defektlerinin kullanılması modeli kliniğe daha uygun hale getirmiştir.

5- MKH kullanılarak yapılan kıkırdak rejenerasyon çalışmaları daha sıklıkla hiyalin kıkırdakta yapılmaktadır. Bu çalışmada elastik kıkırdak rejenerasyonu çalışılmıştır.

GENEL BİLGİLER

Kıkırdak

Yapısı ve görevi

Kıkırdak insan iskeletinin önemli yapıtaşlarından ve vücudumuzda dayanıklılık ve esneklik gereken yerlerdeki iskelet yapısını oluşturur. Yapı olarak avasküler olup, kondrositlerden ve ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Hiyalin, elastik ve fibrokartilaj olmak üzere üç tipi mevcuttur. Her tip kıkırdağın kendine özgü fonksiyonu ve yapısı vardır. Hiyalin kıkırdak eklem yüzeylerinde, kaburga uçlarında, larinks, trakea ve nazal septumda bulunur. Sert, basınca dayanıklı, homojen amorf matriksli dokudur. Elastik kıkırdak dış kulak, nazal yapılar, larinks ve epiglotta yer alır. Bol elastik liflere sahip olduğu için elastik yapılı ve sarı renklidir. Hiyalin kıkırdaktan farklı olarak matriksi kalsifiye olmamaktadır. Fibrokartilaj destek gereken gergin alanlarda, intervertebral diskler, bazı ligaman ve tendonların yapısında mevcuttur. Kondrositlerden ve dens konnektif dokuyla zengin matriksten ibarettir. Kıkırdak tipini belirleyen yapısal değişiklikler ekstraselüler matriksin içeriğine bağlıdır, kondrositlerde her hangi bir değişiklik gözlenmemektedir(20-23).

Perikondriumun özellikleri

Perikondrium kıkırdağın yüzeyinde yerleşen ve avasküler kıkırdağın beslenmesini sağlayan ince yapıdır. İnce iç kambial ve dış fibroz katman olmak üzere iki kattan oluşur. Dış katman damarlanma açısından zengindir ve kıkırdağın beslenmesinde, iç katmansa rejenerasyonunda rol almaktadır. O'Driscoll ve Fitzsimmons yaptıkları çalışmada dış katmanın fibroblastlar içerdiği ve yara kenarlarını onardığı, iç katmanınsa kondroblastlar içerdiği ve yeni kıkırdak oluşumunu sağladığını göstermişlerdir(14).

Perikondriumun küçük kıkırdak defektlerini (milimetrik) kendi başına onardığı bilinmektedir. Perikondrial greftlerle küçük kıkırdak defektlerinin başarılı onarımına

dair çalışmalar mevcuttur(15-16). Perikondriumun rejenerasyon kapasitesi buyk kıkırdak defektlerinin onarımında yetersizdir. Tavşan kulağında yapılan bir çalışmada perikondriumun kıkırdakta oluşturulmuş 1x1 cm defekti her hangi dış etken olmadan kapatamadığı, defektin sadece kıyısında bir miktar yeni kıkırdak oluştuğu gözlenmiştir(17). Başka bir çalışmada perikondriumun 2x2 cm çapında kıkırdak defektlerini kapatamadığı görülmüştür(18). Perikondriumun ince kambial katında kondroblastlar bulunduğu ve büyüme faktörleri salgıladığı bilinmektedir. Duynstee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada perikondriumun yeni kıkırdak oluştururken TGFb ve FGF2 salgıladığı gösterilmiştir(19). TGFb ve FGF MKH hücrelerden in vitro ve in vivo kıkırdak elde edilmesi için sık kullanılan büyüme faktörleridir(24-25).

Kıkırdak Onarımında Kullanılan Yöntemler

Mekanik yöntemlerle kıkırdak rejenerasyonunun arttırılması

Kıkırdağın rejenerasyonunu arttırmak için mikrofraktürler, drille delme, abrazyonlar ve başka yöntemler denenmiş, fakat istenilen sonuçlar elde edilmemiştir. Burkart ve Imhoff 2001 yılında, Agneskirchner ve arkadaşları 2002 yılında, Steadman ve arkadaşları 2001 yılında eklem yüzeylerinde osteokondral rejenerasyonu arttırmak için mikrofraktür yöntemini kullanmış, fakat yeterli sonuç elde edememişlerdir. Müller ve Kohn 1999 yılında kıkırdak rejenerasyonunu arttırmak için eklem yüzeylerinde drilleme yöntemini kullanmışlardır. Fakat yeterli kıkırdak rejenerasyonu sağlanamamıştır (26-29).

Başka materyallerle onarım

Kıkırdak greftleri ile onarım

Bu amaçla kıkırdak otogreft ve homogreftleri ile periostal ve perikondrial otojen greftler kullanılmıştır. En ideal yöntem otojen kıkırdak greftleridir(30-31). Yüzde kontur düzensizliklerini onarmak için, özellikle nazal bölge başta olmak üzere

kullanılmaktadır. Otojen kıkırdak greftleri yeni yerine kolay adapte olmakta, doku rejeksiyonuna neden olmamakta, hacmini korumaktadır(30, 32-34). Fakat verici alan morbiditesi yaratmakta, operasyon süresini uzatmaktadır. En önemli dezavantajı ise otojen kıkırdak greftinin sınırlı kaynağa sahip olmasıdır(35). Eklem kıkırdak onarımında bu dezavantajı aşmak için Kooy ve Weis 2000 yılında *mosaicoplasty* olarak adlandırılan bir yöntem yayınladılar. Eklem yüzeylerinden silindir şeklinde alınan osteokondral oto greftler başka eklem yüzeyindeki defektlere implante edildi. Greftler sınırlı da olsa viabilite göstermelerine rağmen yöntemin sınırlı verici alan, verici alan morbiditesi ve 2cm² den fazla defekte uygulanamaması gibi dezavantajları görüldü(36)

Başka bir kaynak olan homogreftler sınırsız kaynak teşkil etmesi, verici alan morbiditesi yaratmaması gibi avantajlara sahiptir. Maksillofasiyal rekonstrüktif cerrahide bazen kullanılmaktadır(35, 37-38). Velidedeoğlu ve arkadaşları tarafından 2005 yılında yayımlanan çalışmada solventte prezerve edilmiş kadavra homogreftlerin augmentasyon rinoplastide başarılı kullanımı bildirilmiştir(35). Tüm avantajlarına rağmen homogreftlerin kullanılması doku uyumsuzluğu, zamanla hacmini kaybetmesi, enfeksiyon taşıma riski, hazırlanmasının maliyetli olması, kadavradan doku alınarak canlı insana yerleştirilmesi gibi etik ve diğer sorunlar yaratmaktadır(35, 39).

Perikondrial ve periostal greftler eklem yüzeylerindeki küçük osteokondral defektlere başarılıdır(15-16). Sarı ve arkadaşlarının 2006 yılında tavşanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada perikondrial ve periostal greftler elde edilerek kendi üzerinde büküldükten sonra poş haline getirilmiş, içine kan enjekte edilerek abdominal kas dokusuna gömülmüştür. Zamanla greftlerden fibrokartilaja benzer doku elde edilmiştir. Yazarlar bu dokunun kıkırdak kalitesinde olmasının tartışmalı olduğunu belirtmişlerdir(15). Ulutaş ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınlanan tavşanlar üzerinde yapılmış çalışmada perikondrial ve periostal greftler elde edilerek tavşan kulağındaki kıkırdak defekti onarılmıştır. 1x1 cm defektin elastik kıkırdağa benzer dokuyla başarılı şekilde onarıldığı bildirilmiş, periostal ve perikondrial greftler arasında fark bulunmamıştır(16). Tüm çalışmalara rağmen küçük boyutlu perikondrial greftler klinikte yalnızca dejenere diz eklemi yüzeylerinde

kullanılabilmektedir. Diz eklemının kanlanması, eklem sıvısında bol progeneratör ajanların bulunması perikondrial greftlerin kullanımına izin vermektedir(19, 40-41).

Alloplastik materyaller

Organik ve inorganik implantlar kıkırdak defektlerinin onarımı için kullanılmaktadır. Verici alan morbiditesi yaratmaması, sınırsız kaynak teşkil etmesi, istenilen formatta üretilebilmesi, kolay sterilizasyonu nedeniyle birçok deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmıştır. Konulduğu yere kötü adaptasyonu, çevre dokulardan farklı mekanik özelliklere sahip olması, sık deformasyona, alerjik ve enflamatuvar reaksiyonlara neden olması, vücuttan kolay dışarıya çıkması gibi son derece ciddi istenmeyen yan etkilere sahiptir(37, 39).

Doku mühendisliği

Doku mühendisliği doku kaynağı olarak yeni ufuklar açan, aynı zamanda umut veren yöntemler içermektedir(1). Kültür yapmak için gereken başlangıç yetişkin kondrositlerden veya kök hücrelerden elde edilebilir.

Yetişkin kondrositlerin kültür ortamında üretilmesi ve kıkırdak defektlerinin onarımına dair çalışmalar mevcuttur(42-43). Otolog kondrositlerin implantasyonu yöntemi son 10 yıldır kullanılmaktadır. Diz eklemının az bası gelen yerinden biyopsiyle kondrositler elde edilmekte ve monolayer kültürde üretilmektedir. Mevcut osteokondral kıkırdak defektinin üzerine periostal greft suture edildikten sonra defektle greft arasında çoğaltılmış kondrositler implante edilmektedir. Postoperatif dönemde yapılan klinik, artroskopik ve histolojik muayenelerde tek lezyonlarda % 92, multipl lezyonlarda %67 başarı sağlanmıştır(44). Bazı başarılı sonuçlara rağmen yöntemin klinikte uygulanmasını engelleyen ciddi dezavantajları mevcuttur. Bu dezavantajlar sırasıyla şöyle özetlenebilir:

1. Doku elde etmek ve uygulamak zordur.
2. Yetişkin kondrositler zonal belleğe sahiptir, yüzeysel kondrositlerden elde edilen kültüre edilmiş kıkırdak derinde yaşamamaktadır.
3. Monolayer kültürde dediferansiye olmaktadır. Yani kıkırdak özelliğini kaybetmektedir.

4. Yetişkin kondrositlerin üremesi sınırlıdır, bireyin yaşı arttıkça azalmaktadır. Ayrıca bol miktar başlangıç hücre gerekmekte, dolayısıyla ciddi verici alan hasarına neden olmaktadır.

5. Yetişkin hücrelerden yapılan kültür sonuçları tahmin edilemez, avasküler oldukları için yeni ortamda yaşam kapasiteleri düşüktür.

6. Kullanılan yöntemler maliyetlidir (45-48).

Kök Hücreler

Tanımı

Rejeneratif tıp hızla gelişen bir bilim dalıdır. Daar ve Greenwood (2007) rejeneratif tıbbi hücre, doku veya organların onarımı, replasmanı veya rejenerasyonu ile ilgilenen bilim dalı olarak tanımladılar. Rejeneratif tıp vücudun kayıp veya hasarlı dokusunun yeni fonksiyonel dokuyla replasmanını hedeflemektedir. Klasik tedavi yöntemleriyle giderilemeyen doku veya organ hasarlarında devreye giren ultra modern yöntemler içermektedir(49).

İnsan vücudu zarar gören doku ve hücreleri onarmakla görevli endojen sisteme sahiptir. Bu sistem kök hücreler ve onları kontrol eden mekanizmalardan oluşmaktadır. Kök hücreler vücudumuzun tüm dokularında mevcuttur. Zaman geçtikçe dokularımızdaki hücreler doğal ve doğal olmayan (travma, enfeksiyon, enflamasyon) nedenlerle ölmektedirler. Kök hücreler onların onarımıyla görevlidirler. Hücre ölümü gerçekleştiğinde kontrol mekanizmaları (humoral ve sinirsel) devreye girerek kök hücreleri uyarmaktadır. Uyarılan kök hücreler büyük miktarlarda çoğalmakta ve *undiferansiyel* "kök" halinden buldukları çevre etkisiyle farklılaşmış fonksiyonel hücrelere dönüşmektedir (50-51).

Özellikleri

Kök hücrelerin iki ana özelliği vardır:

1-Pluripotent özelliğini kaybetmeden sınırsız sayıda çoğala bilme

2-Uygun çevre koşullarında uygun dokuya dönüşebilme (50)

Kök hücrelerin mevcut doku ortamında uygun dönüşüm geçirdiği görülmüştür(2, 50, 52). Çevredeki hücrelerden ve ekstraselüler matriksken gelen moleküler sinyaller kök hücrenin genlerine etki etmekte, “kök” özelliklerini uyarmaktadır. Kök hücreler yeni ortamda yerel mikro faktörlerin etkisiyle çoğalmakta ve değişim geçirmektedir(51). Mesela insan nöral kök hücreleri kas dokusuna implante edildiğinde kas oluşturduğu(Galli ve ark. 2000), kemik iliği kök hücreleri nöral dokuya implante edildiklerinde sinir oluşturduğu(Zhao ve ark. 2002; Mezek ve ark. 2003) görülmüştür(53-55).

Tüm bu özellikler kök hücreler üzerindeki dikkatin artmasına ve bu konuda gittikçe artan sayıda çalışma yapılmasına neden olmuştur. Buna rağmen kök hücrelerin klinikte uygulanmasını engelleyen bazı dezavantajları mevcuttur:

1. Canlıdan elde edilen hücre sayısının yetersiz olması, bu nedenle kök hücreleri kültür ortamında üretmek zorunluluğu
2. İmplantasyon sonrası oluşan hücre apoptozu
3. Onarılan dokunun damarlanma problemleri
4. Taşıyıcı *scaffold* sorunları
5. Etik sorunlar
6. Yüksek maliyet(50, 56-57)

Bu konuda ilk çalışmalar Becker ve arkadaşlarına aittir. Kök hücreler(*stem cell*) *polipotent* olup birçok farklı tipte hücreye dönüşebilmektedir. Kök hücreler embriyonik ve yetişkin kök hücreler olmakla iki ana gruba ayrılmaktadır(50, 52, 58).

Embriyonik kök hücreler(EKH)

EKH *totipotenttir*. Yani her hangi doku veya hücre tipine dönüşebilmektedir. Oysa yetişkin kök hücreler *pluripotenttir*, daha az çeşit hücreye dönüşmektedir. İlk EKH zigottur. Tüm diğer hücreler ondan köken almaktadır. EKH implante olmamış 5-6 günlük embriyodan elde edilmektedir(2, 50). EKH ilk defa 1981 yılında Martin tarafından tanımlanmıştır. İlk insan EKH hattı 1998 yılında bilime sunulmuştur(59). 2008 yılına kadar tanımlanmış olan 225 EKH hattı mevcuttur. EKH hattı teorik olarak ölümsüz (*immortal*) sayılmaktadır. Besleyici kültür ortamında sınırsız sayıda

çoğalmaktadır. Elde edilen hücrelerden büyüme faktörleri ve başka ajanlar etkisiyle farklılaşmış ve farklı hücre grupları elde edile bilmektedir. Bu hücre hatlarının büyük bilimsel ve ekonomik önemi mevcuttur. EKH klinik kullanımı sınırlıdır, üremesini kontrol etmek zordur. Çoğu zaman teratoma dönüşmektedir(60) *Totipotent* özelliğine rağmen embriyonal kök hücrelerin kullanımı hakkında bilgiler çelişkilidir ve etik sorunlar yaratmaktadır(61-62). Etik sorunlar nedeniyle birçok ülkede EKH ile çalışma yapmak yasaktır veya sınırlanmış durumdadır. EKH kullanarak yeni canlı yaratmak perspektifi etik açıdan sakıncalıdır ve bu nedenle çoğu araştırmacı embriyonik olmayan kök hücrelere yönelmiş durumdadır. Tüm bu sorunlara rağmen EKH ile çalışmalar büyük potansiyele sahiptir. Diyabet (Soria ve arkadaşları, 2000), omurilik yaralanmaları (Hendricks ve arkadaşları, 2006), karaciğer (Duan ve arkadaşları, 2007) ve kalp nakli (Kofidis ve arkadaşları, 2005) ile ilgili çalışmalar yürütülmektedir(63–66)

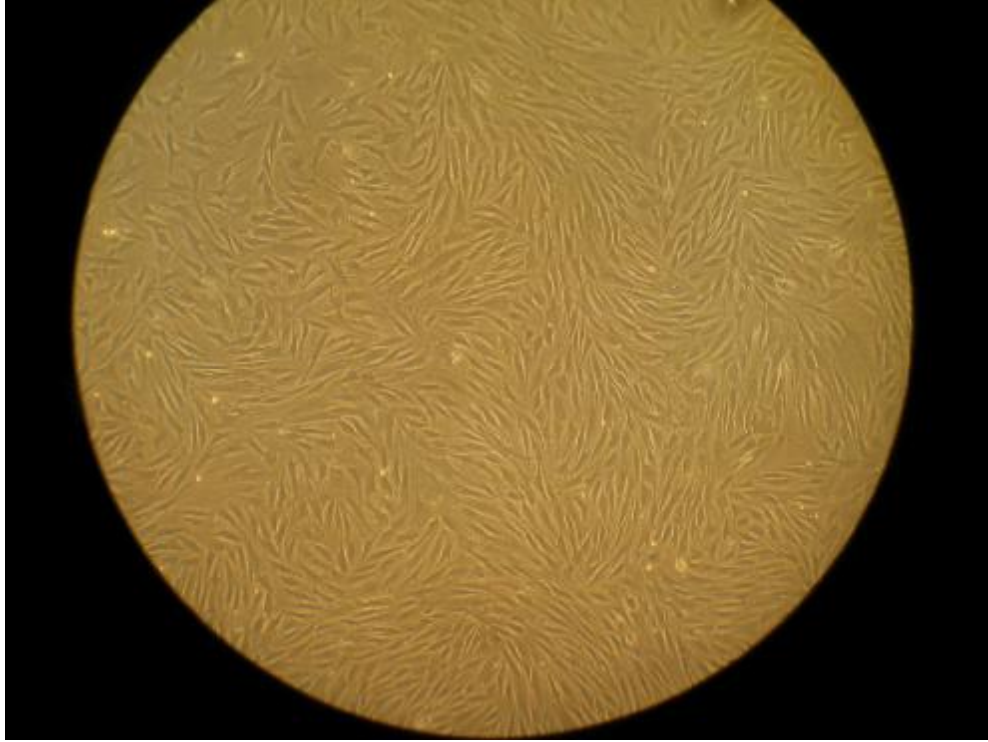
Yetişkin mezenşimal kök hücreler(YMKH)

1963 yılında Becker ve arkadaşları yaptıkları deneysel çalışma sırasında kemik iliğinden elde ettikleri hücreleri radyasyona maruz kalmış sıçanlara enjekte ettiler. Daha sonra sıçanlara yapılan otopsi sırasında dalakta çok sayıda nodüller farkedildi. Nodül sayısının enjekte edilen hücre sayısına eşit olduğunu gören araştırmacılar her hücreden bir nodül geliştiğini düşündüler. Daha sonraki çalışmalarda araştırmacılar kemik iliği hücrelerinin kendini çoğalarak yenilendiğini farkettiler, böylece kök hücrelerin iki ana özelliğinden biri, değişmeden kendini yenileme keşfedildi(67).

Friedenstein ve Petrakova 1966 yılında sıçan kemik iliği stromal fraksiyonundan mezenşimal kök hücreleri (MKH) ayırarak identifiye ettiler. Bu hücrelerin mezenşimal kökenli dokulara (kemik, bağ, kas, kıkırdak, yağ) dönüşe bildiği görüldü. Ek olarak MKH kemik iliğinde hemopoetik hücreler için stromal destek fonksiyonu görmektedir. MKH kemik iliği hücre popülasyonunda %0.001–0.01 paya sahiptir(Pittenger ve arkadaşları, 1999)(68-69).

YMKH vücudumuzun her yerinde mevcuttur, pluripotent olup birçok dokudan elde edilmektedir. Yapılan deneysel çalışmalarda periost, kemik iliği, dalak, timus, kas, yağ, cilt, retina (Mizuno ve Glowacki, 1996; Doherty ve ark. 1998; Bosch ve

ark. 2000; Levy ve ark. 2001; Zuk ve ark. 2001; Huang ve ark. 2002) dokularından elde edilmiştir(70-73). Amniotik sıvıdan (De Coppi ve ark. 2007), umbilikal korddan (Wharton maddesinden) (Wang ve ark. 2004) santral sinir sisteminden (Gage, 2000) elde etmek mümkündür(74-78). En sık kullanılan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerdir. Elde edilen hücreler genelde %10 FBS(*fetal bovine serum*) eklenmiş Dulbecconun modifiye Eagle kültür ortamında inkube edilmektedir(Pittenger ve ark. 1999)(69). MKH kültürde fibroblastlara benzer morfoloji sergilemektedir(Resim 1). Primer kültürde üreyen ve yüzeye yapışan MKH 12–16 gün sonra yüzeye yapışmayan hemopoetik hücre fraksiyonundan ayrılmaktadır. Büyüme faktörü olarak FGF-2 (*fibroblast growth factor-2*) kültüre eklenmesi MKH nin osteojenik yönde farklılaşmasına neden olmaktadır(Martin ve ark. 1997)(79)



Resim 1: Kültüre edilmiş yetişkin yağ dokusu kökenli ADAS. (40x büyütme)

Tüm yararlı özelliklerine rağmen hala tam olarak açıklanmamış konular mevcuttur. Bu yüzden birçok bilimsel merkezde MKH ile ilgili araştırmalar yoğun olarak devam etmektedir.

Çevrenin kök hücrelere etkisi

Kök hücre hatlarının değişmeden devam etmesi veya farklılaşmayaa uğramasıyla ilgili bazı hipotezler mevcuttur. En yaygın hipotez kök hücre mikroçevresi veya ortamıyla ilgilidir. Mikroçevre kök hücreler ve onların etrafındaki ekstrasellüler matriks yerleşimli sinyal molekülleri, hücrelerarası bağlantılar ve karşılıklı etkileşimlerden oluşmaktadır.

Bu üç boyutlu mikroçevre hücrelerdeki kontrol genlerine etki ederek MKH nin 'kök' özelliklerini uyarmaktadır. Bu etkileşim sonrası MKH farklılaşmamış halde kendini yenilemekte veya değişerek farklılaşmış fonksiyonel hücreye dönüşmektedir(80). Burada merak edilen konu kök hücrelerin hangi mekanizmalarla oldukları ortama uygun farklılaşma geçirdikleridir. Mesela insan nöral kök hücrelerin kas dokusuna implante edildiğinde kas oluşturduğu(Gali ve ark. 2000), kemik iliği kök hücreleri nöral dokuya implante edildikte sinir oluşturduğu(Zhao ve ark. 2002; Mezek ve ark. 2003) görülmüştür(53-55). Yapılan başka bir çalışmada karaciğer kaynaklı kök hücrelerin insulin üreten ada hücrelerine dönüştüğü görüldü(81). Bu bulgular çevre etkileşiminin kök hücre farklılaşmasında önemli olduğunu göstermektedir.

Başka bir hipotez hücrelerarası füzyonu (*cell-cell fusion*) ön planda tutmaktadır. Bu hipoteze göre her hangi bir ortamda bulunurken kök hücreler yerel hücrelerle füzyona girerek onların özelliklerini kazanmaktadırlar(Wurmser ve Gage, 2002)(82). *In vitro* yapılan çalışmalarda sinir hücrelerinin erkek EKH lerle (Ying ve ark. 2002) veya kemik iliği hücrelerinin erkek EKH lerle (Terada ve ark. 2002) füzyona girdiği görüldü(83-84). *In vivo* yapılan başka bir çalışmada kemik iliği kökenli MKH lerin Purkinje nöronları, kardiyomiyositler ve hepatositlerle füzyon yaptığı rapor edildi (Alvarez-Dolado, 2003)(85). Bu hücreler dual fenotipe, tetraploid kromozomlu büyük nukleusa sahiptir. XXXY kromozomlu hücrelerin mevcudluğu hücrelerarası füzyonun kök hücre değişiminde rolünü ispatlamaktadır. Diğer yandan hücre füzyon sayısının az olduğu gözlemlendi. Bu nedenle hücrelerarası füzyon hipotezi kök hücre implantasyonları sırasında dokulardaki büyük miktarda gözlemlenen hücre rejenerasyonunu açıklamamaktadır(Orlic ve ark. 2002)(86). Gelecek çalışmaların bu yönde devam etmesi kök hücre değişimini daha iyi aydınlatacaktır.

Yetişkin mezenşimal kök hücre kaynakları

Kemik iliği kaynaklı mezenşimal kök hücreler (Bone marrow-derived stromal stem cells veya BMSC)

Kemik iliği veya *stroması* konnektif doku hücrelerinden oluşan heterojen bir populasyondan oluşmaktadır. Bu hücreler kemik iliğindeki hematopoezis için destek yapı oluşturmaktadır (Tavassoli ve Friedenstein, 1983)(87). Stromal hücreler aynı zamanda hematopoetik kök hücreler için mikroçevre yaratmaktadır. BMSC denildiğinde mezenşimal dokulara dönüşmek potansiyeline sahip bir grup kemik iliği hücresi akla gelmektedir. Bu hücreler arasında multipotent özellikli, tüm mezenşimal dokulara dönüşebilen farklılaşmamış hücre alt grubu mevcuttur. Bu hücre popülasyonu tüm postnatal dokularda mevcuttur ve mezenşimal kök hücre (*mesenchymal stem cells, MSC*) olarak adlandırılmaktadır (88). İlk defa Friedenstein ve Owen tarafından 1960 yılında bulunmuş, daha sonraki çalışmalarda özellikleri öğrenilmiştir (68). Yapılan doku kültüründe fibroblastlara benzer hücrelerden oluşan ayrı yerleşimli koloniler (*colony-forming unit fibroblasts, CFU-Fs*) gözlenmiştir(89). CFU-F kök hücre özelliklidir ve birçok dokuya dönüşebilmektedir(90). Bu hücreler *in vitro* çalışmalarda kemik (Beresford ve ark. 1993), bağ dokusu (Altman ve ark. 2002), yağ dokusu (Beresford ve ark. 1992), kıkırdak (Johnstone ve ark. 1998) ve kas dokusuna (Wakitani ve ark. 1995) dönüşmektedir. CFU-F *in vivo* çalışmalarda implante edildikleri yerde küçük kemik, kas ve kıkırdak yığınları oluşturmaktadır(91-94). Benzer hücreler diğer mezenşimal dokulardan, sinovyum (De Bari ve ark. 2003), tendon (Salingcarnboriboon ve ark. 2003), iskelet kaslarından (Bosch ve ark, 2000), yağ dokusundan (Zuk ve ark. 2001, 2002; Erickson ve ark. , 2002) elde edilmiştir(7–8). Klinik ve deneysel çalışmalarda en sık kullanılan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerdir(50).

Cilt kaynaklı yetişkin mezenşimal kök hücreler (Skin-derived precursor (SKP) stem cells)

Cilt vücudumuzun en büyük organıdır. Epidermis ektodermal, dermis mezodermal kökenlidir. Toma ve arkadaşlarının 2001 yılında sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışma sırasında dermisten multipotent özellikli hücreler elde edilmiştir. Çalışma sırasında bu hücrelerin proliferasyon ve farklılaşma sonrası nöronlara, glial hücrelere, düz kaslara ve yağ hücrelerine dönüştüğü görüldü. Oluşan nöronlar periferik nöronlara ve Schwann hücrelerine benzemekteydi. SKP kök hücreler embriyonik nöral krest kalıntısıdır. Embriyogenez sırasında ciltte bulunmaktadır, yetişkinlerde az miktardadır (95) SKP hücreleri Schwann hücreleri kaynağı gibi önemlidir. Schwann hücreleri omurilik yaralanmalarında rejeneratif amaçla deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu hücreleri elde etmek için klasik yöntem olarak sinir sisteminden biyopsi alınmaktadır. Biyopsi alınması her zaman sinir sistemine zarar vermek demektir. Aynı zamanda Schwann hücreleri zayıf üreme özelliğine sahiptir. McKenzie ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları çalışma sırasında neonatal SKP kökenli Schwann hücreleri ezilmiş siatik sinir defektine implante edilmiştir. Bu hücreler başarılı bir şekilde rejenerasyon olan aksonları mielinize etmişlerdir. Osteojenik potansiyeli yüksek olan SKP hücreler kemik rejenerasyonu için de iyi kaynak olabilmektedir(96).

Amniyotik sıvı kaynaklı mezenşimal kök hücreler (Amniotic fluid-derived stem cells)

De Coppi ve arkadaşları 2007 yılında amniyotik sıvıdan kök hücreler elde ettiler. Bu farklılaşmamış hücrelerin EKH ait bazı yüzey markerlarına sahip olduğu saptandı. Bu hücreler EKH ve MKH arasında geçiş oluşturmaktadır. Hızlı üremekte, kültür ortamında besleyici katman gerektirmemektedir. Hücre sayısının iki katına çıkması (*doubling time*) 36 saatte olmakta, *in vivo* ortamda teratom oluşturmamaktadır. EKH benzer şekilde her üç embriyonik katman mezoderm, ektoderm ve endoderm kaynaklı dokulara dönüşebilmektedir. Adipojenik, miyogenik, endotelial, nöronal ve

hepatik özellikleri mevcuttur. Böyle geniş bir grup dokuya dönüşebilmesi ve teratom oluşturmaması amniyotik sıvı kökenli kök hücrelerin önemini arttırmaktadır(75).

Umblikal kord kaynaklı mezenşimal kök hücreler (Umbilical cord-derived stem cells)

Umblikal kordun hem kanından, hem de Wartin jelinden kök hücre elde etmek mümkündür. Umblikal kord kanı hem pluripotent kök hücreler, hem de hematopoetik kök hücreler için kaynaktır (Kogler ve ark. 2004)(97). Wang ve arkadaşları 2004 yılında Wartin jelinden kök hücreler elde ettiler. Bu hücreler düşük immunojeniteye sahiptirler. Hem anne, hem de çocuk için kullanılabilirler. Umblikal kord kökenli kök hücreler kök hücre bankası yaratmak için en ideal adaylardır(74).

Yetişkin Yağ Dokusu Kaynaklı Mezenşimal Kök Hücreler (Adipose derived adult stem cell veya ADAS)

Tarihçe

Son yıllarda kök hücrelerle ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Genelde kemik iliği kökenli MKH kullanımıyla gerçekleştirilen bu çalışmaların hücre kaynağıyla ilgili bazı dezavantajları mevcuttur. MKH elde etmek için kemik iliği aspirasyonu gibi travmatik yöntem kullanılması, spinal veya genel anesteziye ihtiyaç duyulması, elde edilen kök hücre sayısının aspiratta düşük miktarda bulunması yeni MKH kaynakları arayışına neden olmuştur(8, 90).

2001 yılında Patricia A. Zuk ve arkadaşları tarafından insan lipoaspiratından multipotent özellikli hücreler elde edildi. İnsan lipoaspiratından kök hücreden zengin stromal vasküler fraksiyon (SVF) elde edildi. Elde edilen SVF kültüre edilerek insan fibroblastları, kas hücreleri, preadipositler, kemik iliği kökenli MKH ile karşılaştırıldı. İmmunohistokimyasal ve immunoflorasens özellikleri incelendi. *In vitro* ortamda farklı kültür ortamları kullanılarak kök hücrelerden osteojenik, kondrojenik, adipojenik ve miyojenik farklılaşma gözlemlendi. Bu çalışma sonucu bilim dünyasına yeni bir kök

hücre kaynağı sunulmuş oldu. Yetişkin yağ dokusu kaynaklı kök hücre (*adipose derived adult stem cell*, ADAS) olarak adlandırılan hücreler diğer dokulardan elde edilen MKH kıyasla bazı avantajlara sahiptir. Kolay ve bol miktarda elde edilmesi, *liposuction* gibi az travmatik ve az ağrılı yöntemle ihtiyacı duyulması yöntemine olan ilgiyi arttırmaktadır. Zuk ve arkadaşlarının bu çalışmasını dünyanın birçok ülkesinde yapılmış ve yapılmakta olan benzeri çalışmalar izledi. ADAS hücrelerinin özelliklerini araştıran *in vivo* ve *in vitro* çalışmalar sırasında mezenşimal dokuların onarımında başarılı sonuçlar elde edilmiştir(7-8).

Halvorsen ve arkadaşlarının 2001 yılında yapmış oldukları çalışma sırasında ADAS hücrelerinin osteojenik farklılaşması gerçekleştirildi. Ascorbat, beta-glycerophosphat, dexamethazon ve vitamin D(3) kullanarak ADAS hücrelerinin *in vitro* ortamda değiştiği, ekstrasellüler matrikste kalsium fosfat toplandığı görüldü(9).

Seo ve arkadaşlarının 2005 yılında yapmış oldukları çalışmada uygun medyumda insan ADAS hücrelerin hepatositlere dönüştüğü gözlemlendi. Farklılaşan ADAS hücrelerinin hepatositlere benzer şekilde albumin ve diğer fraksiyonlarda proteinler ürettiği görüldü. Çalışmacılar sonuç olarak ADAS hücrelerin organ naklinde seçenek olarak kullanılabilirliğini söyledi(11).

Safford ve arkadaşlarının 2002 yılında yayınladıkları çalışmada insan lipoaspiratından elde edilmiş ADAS hücreleri valproik asit, butilleştirilmiş hidroksiyanzol, insulin ve hidrokortizon etkisiyle farklılaştırıldı. Farklılaşma kültür ortamıyla etkileşim sonrası ADAS hücrelerinde immunhistokimyasal yöntemlerle sinir dokusuna ait filament M, netsin ve NeuN maddeleri tayin edildi. Sinir dokusuna dönüşmesi ADAS hücrelerinin "kök" potansiyelinin mezenşimal doku sınırını aştığının göstergesidir(12).

Erickson ve arkadaşlarının 2002 yılında yapmış oldukları çalışma sırasında ADAS hücreleri kıkırdak yönünde farklılaştırıldı. İnsan lipoaspiratından elde edilen ADAS hücreler *in vitro* ortamda alignat matriks üzerinde kondrojenik medyum kullanılarak çoğaltıldı. Daha sonra *nude* farelere subkutan plana implante edilen hücrelerin bol miktarda kıkırdak matriks sentezlediği görüldü(5). Huang ve arkadaşlarının 2004 yılında benzeri çalışmayı yayımladılar. İnsan lipoaspiratından SVF elde ederek TGFb1, askorbik asit, insulin ve transferin etkisiyle *in vitro* kültürde

kıkırdağa benzeyen milimetrik nodüller oluşturdular. Nodüller incelendiğinde tip2 kollajen, kondroitin-4-sülfat ve keratan sülfattan zengin olduğu görüldü(10).

Özellikleri ve avantajları

Cilt altı yağ dokusu kemik iliği gibi mezenşimal kökenlidir. Benzer şekilde stromal desteğe sahiptir. Kolaylıkla izole edile bilen stromada destek hücrelerle beraber kök hücreler de mevcuttur. SVF de (*stromal vascular fraction*) endotelial hücreler, perisitler, kas hücreleri daha fazla bulunmakla beraber kök özellikleri olan bir grup hücre ayırt edilmiştir. Preadipositler olarak adlandırılan bu grup mezenşimal kökenli dokulara dönüşebilmektedir(7-8).

Hücre kaynağı olarak ADAS çok uygundur. Diğer kök hücre kaynaklarına göre daha verimlidir (61). 1 gr yağ dokusundan 10. 000-25. 000 kök hücre elde edile bilmektedir (98). Yapılan başka bir çalışmaya göre 1gr cilt altı yağ dokusundan 5000 kök hücre elde edilmiştir. Karşılaştırma yapıldığında 1gr kemik iliğinden 100 – 1000 arası kök hücre ayırmak mümkündür(99). Diğer bir deneysel çalışmaya göre 1gr yağ dokusundan 350.000 preadiposit izole edilebilmektedir(100). Lipidden zengin adipositlerin kök hücrelere dönüştüyü, daha sonra bu yeni oluşan kök hücrelerin başka dokulara (mesela kemik) dönüştüğü gözlemlenmiştir(101). En önemlisi canlıya minimal zarar verilerek büyük miktarlarda yağ dokusu, dolayısıyla yağ dokusu kökenli kök hücre elde etmek mümkündür. Yağ emme(*liposuction*) gibi az travmatik yöntemle insandan litrelerce doku ve infiltrasyon sıvısı karışımı olan lipoaspirat elde edilmektedir(1, 5, 9). ADAS hücreleri kültüre edildiğinde üreme özelliğini, pluripotentliğini kaybetmemektedir (58, 61). ADAS kartilojenik, osteojenik, miyojenik, nörojenik, adipojenik özelliklere sahiptir(9-12). Tüm bunlar ADAS hücrelerini eşsiz otolog doku kaynağı yapmaktadır.

Kıkırdak onarımında yeri

İlk defa 2001 yılında Zuk ve arkadaşları ADAS hücrelerden kıkırdak elde ettiler. Bu çalışmayı dünyanın birçok merkezinde kıkırdak rejenerasyonu ile ilgili yapılan çalışmalar izledi. 2002 yılında Erickson ve arkadaşlarının ADAS hücrelerinin *in vitro*

ve *in vivo* koşullarda kıkırdağa dönüşümünü gösteren çalışması yayınlandı. İnsan lipoaspiratından elde edilen ADAS hücreler *in vitro* ortamda kartilojenik ortam ve alignat matriks kullanılarak kültüre edildi. Aynı hücreler daha sonra *nude* farelerin cilt altı dokusuna enjekte edildi. Hem *in vitro*, hem de *in vivo çalışma* sonucu ADAS hücrelerinin bol miktarda kıkırdak matriks elemanları sentezlediği, dolayısıyla kıkırdağa dönüşümü gözlemlendi(7-8).

Huang ve arkadaşlarının 2004 de yayınladıkları deneysel çalışmada *in vitro* koşullarda ADAS hücrelerinin kartilojenik ortam(TGF b1, insulin, transferin ve askorbik asit) etkisiyle 48 saat içinde nodüller oluşturduğu ve tip2 kollajen, kondroitin-4-sulfat ve keratan sulfat sentezelediği görüldü. Kıkırdak için özellikli sayılan bu proteoglikanların salgılanması neokartilogenezi göstermektedir(10).

Suresh ve arkadaşları 2003 yılında tavşanlarda osteokondral defektlerin ADAS hücrelerle onarımına dair deneysel çalışmayı yayınladılar. Çalışma sırasında tavşandan kemik iliği, dermis, yağ dokusu ve periosteum alınarak kök hücre elde edilmiştir. Daha sonra tavşanların femur başında 6x3x1mm osteokondral defekt oluşturularak farklı hayvanlarda ADAS hücreleri, kemik iliği kökenli kök hücreler, periosteum kökenli kök hücreler, dermis kökenli kök hücreler ve otogreft(osteokondral) ile onarıldı. 2, 6, 12, 24 hafta sonra kurban edilen hayvanların onarılmış femur başı defektleri histolojik ve biyomekanik incelemeye tabii tutulmuştur. En iyi sonuçlar ADAS hücreleriyle onarılan deneklerden elde edilmiştir. Yazarlar elde edilen sonuçların dikkate değer olduğunu, ama ADAS hücrelerin kıkırdak onarımına katkısının daha fazla araştırılması gerektiğini savunmuşlardır(61).

Wei ve ark. 2006 yılında yayınladıkları *in vitro* deneysel çalışmada tavşandan elde edilen ADAS hücreleri kondratin sulfat ile kombine edilmiştir. ADAS hücreleri fibrin skafold üzerinde deneye tabii tutulmuştur. Kontrol grubunda sadece ADAS hücreleri, deney grubunda ADAS hücreleri ve kondratin sulfat kullanılan çalışmada 14 gün sonra deneklerden elde edilen dokular histolojik olarak analiz edilmiştir. Her iki grupta ADAS hücrelerinin kondrositlere dönüştüğu görülsede deney grubunda kondratin sulfat etkisiyle daha fazla hücre proliferasyonu, proteoglikan sentezi izlenmiştir. Elde edilen veriler çevredeki glikozaminglikan yapıllı kondratin sulfatın ADAS hücrelerden neokartilaj oluşmasına pozitif yönde etki ettiğini göstermektedir(1).

Başka bir çalışmada ADAS hücrelerinin farklılaşması için adenovirüs sentezli GDF-5 (*growth and differentiation factor 5*) kullanılmıştır. Sıçan ADAS hücreleri GDF-5 sentezleyen adenovirüs vektörüyle kombine edildikten sonra *in vitro* kıkırdak oluşumu izlenmiştir. Kontrol gruplarında ADAS hücreleri üreyen ortama GDF-5 ve TGFb eklenerek deney grubuyla karşılaştırılmıştır. Tüm gruplarda neokartilojenez gözlemleyen araştırmacılar GDF-5 in kondrojenik olduğunu, bu amaçla hücre kültürü çalışmalarında kullanılabileceğini gösterdiler(59).

Dragoo ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları *in vivo* çalışmada ADAS hücreleri ile osteokondal defektleri başarılı bir şekilde onardılar. Tavşan femur başında 3x4mm çapında tam kat osteokondral defekt oluşturuldu ve *in vitro* çoğaltılarak büyüme faktörleri kullanılarak kartilojeneze yönlendirilmiş ADAS hücreleri yerleştirildi. 8 hafta sonra femur başlarından alınan histolojik preparatlarda kıkırdak gelişimi gözlemlendi(4).

Koga ve arkadaşları 2007 yılında yayınladıkları çalışmada mezenşimal kökenli dokulardan (eklem zarı, kemik iliği, yağ ve kas) kök hücre elde ederek onların kıkırdak oluşturma kapasitelerini karşılaştırdılar. *In vitro* çalışmada dokulardan elde edilen hücreler birkaç pasaj çoğaltılarak büyüme faktörleri etkisiyle kıkırdağa dönüştürüldü. *In vivo* deney sırasında aynı şekilde elde edilen ve kültür ortamında çoğaltılan kök hücreler kollajenle karıştırılarak tavşanın femurunda trokanterik bölgede oluşturulan 5x5x3mm osteokondral defekte yerleştirildi. Defektin üzeri otolog periostal greftle kapatıldı. *In vitro* ve *in vivo* benzer şekilde en iyi kıkırdak oluşumu eklem zarı ve kemik iliği kökenli kök hücrelerin çevresinde görüldü(6).

ADAS hücrelerinin kondrojenik kapasitesi ile ilgili literatürde yayınlanmış çok sayıda *in vitro* ve *in vivo* çalışma mevcuttur. Diğer mezenşimal dokulardan elde edilen kök hücrelerin kartilojenez yönünde daha iyi sonuç verdiği dair bilgilere rağmen ADAS hücrelerinin diğer kaynaklardan elde edilen kök hücrelere nazaran ciddi avantajı mevcuttur. Bu hücreleri elde etmek için verici organizmaya çok az zarar verilmektedir. Ayrıca ADAS hücrelerinin daha düşük kıkırdak oluşturma kapasitesi hakkında bilgiler çelişkilidir ve tekrar araştırılmasına ihtiyaç vardır. Tüm bu bilgileri göz önünde bulundurarak çalışmamızda perikondriumun salgıladığı büyüme faktörlerinin etkisiyle ADAS hücrelerinden kıkırdak oluşturulması hipotezi incelendi

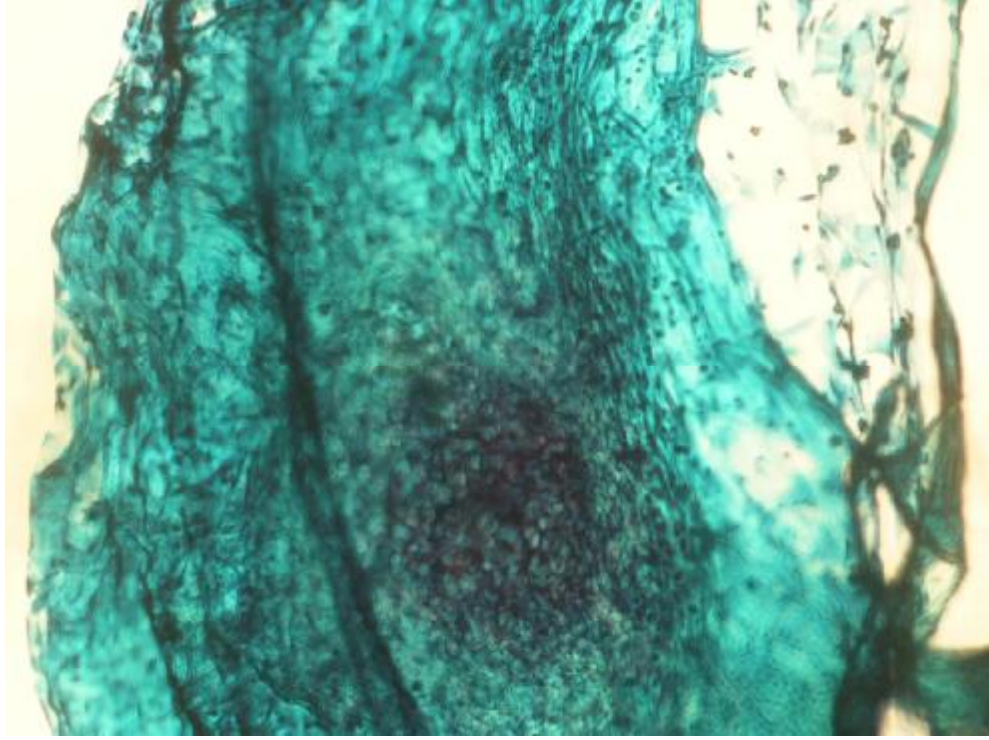
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Yeni Zelanda cinsi, beyaz, dişi, 1200-1500gr ağırlığında 3-5 aylık konvansiyonel koşullarda yetiştirilmiş tavşanlar üzerinde yapıldı. Tavşanlara deney süresince 'Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı Usul ve İşleyiş Esasları' doğrultusunda D. E. Ü. Deney Hayvanları Laboratuvarı' nda bakım uygulandı. Deney süresince tavşanlar standart tavşan yemi verilerek standart sıcaklık ve nem ortamında tutuldu.

Tavşanlar üzerindeki cerrahi prosedürler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı' ndaki hayvan ameliyathanesinde steril koşullarda uygulandı. Yağ dokusundan kök hücre elde edilmesi işlemi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A. D. laboratuvarında yapıldı. Deney prosedürü öncesinde literatürde belirtildiği şekilde kök hücre elde edilmesi işleminin Dokuz Eylül Üniversitesi olanakları ile elde edilebilirliğinin test edilmesi amacıyla ön çalışma planlandı.

Ön Çalışma

Öncelikle yağ dokusundan kök hücre elde edilebilirliğini kanıtlanması ve çalışmanın yapılacağı hayvan türünün belirlenmesi amaçlandı. Çalışma sırasında diğer deneyler sırasında kullanılan ve yeni sakrifiye edilmiş sıçanların cilt altı yağ dokusundan mezenşimal kök hücreler elde edilerek ve *in vitro* çoğaltılarak büyüme faktörü aracılığıyla kıkırdak dokusuna dönüştürüldü(Resim 2).



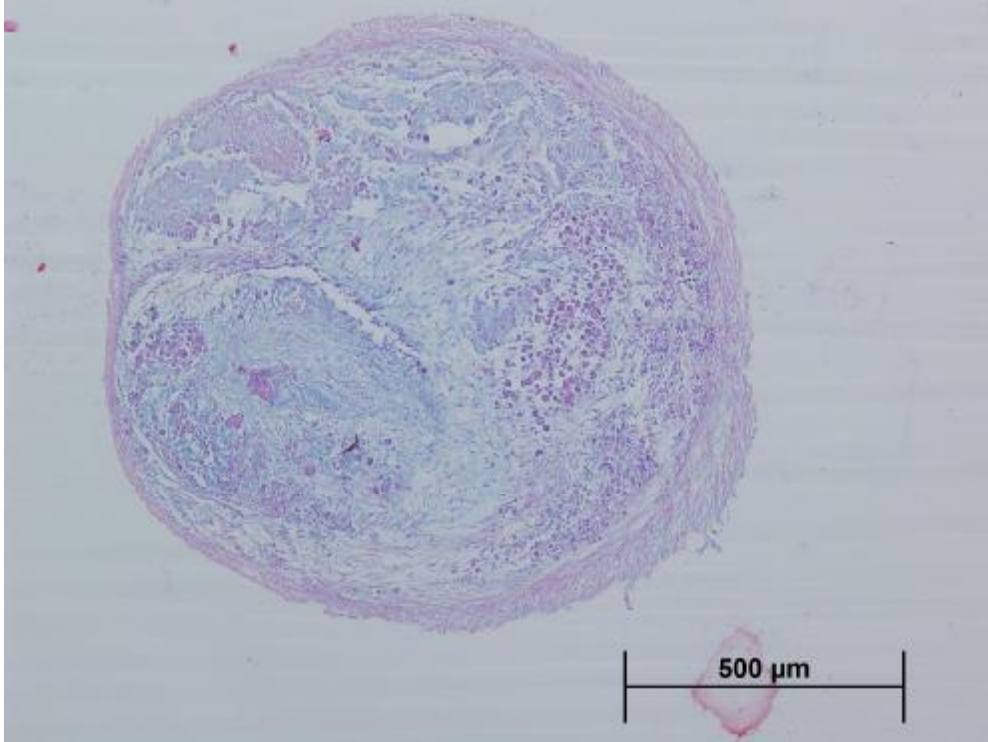
Resim 2: Sıçan ADAS hücrelerinde kondrojenik farklılaşma. Safranin O boyası ile görülen morsu alan proteoglikan kümesini göstermekte (10x büyütme)

Çalışmanın amacı kök hücrelerden kırıkta elde edilerek kırıkta defektlerinin onarımında kullanılması olduğundan ve bunun için tavşan kulağı kullanımı daha uygun olduğundan ön çalışma tekrar bir adet tavşan üzerinde de uygulandı. Çalışmanın cerrahi prosedür kısmında belirtildiği şekilde(Bkz. Birinci *cerrahi prosedür; cilt altı yağ dokusunun elde edilmesi*) kasık yağ dokusu alındı. Yağ dokusu belirtildiği gibi(Bkz. *Yağ dokusundan SVF elde edilmesi, ADAS hücrelerden kültür elde edilmesi*) işleme tabi tutuldu. Elde edilen ADAS hücreler ile *in vitro* ve *in vivo* olmak üzere ön çalışma yapıldı.

İn vitro kırıkta elde edilmesi

50. 000 ADAS tüp içerisinde kültüre edildi. Kültür ortamı olarak kondrojenik uyarıcı ortam (%10 FBS(*fetal bovine serum*)+antibiyotik(streptomisin/penisilin karışımı)+5ng/ml FGF+6,25ng/ml transferin+5ng/ml TGFb+6,25ng/ml

insulin+100ng/ml dexametazon+50nM/ml askorbik asit+1mMsodyum piruvat+6,25ng/ml selenyum) kullanıldı. Ortam 2 günde bir değiştirildi. 21. gün oluşan kıkırdak parçasının boyutu ölçülerek histolojik değerlendirilme yapıldı. Hemotoksilin eozin ve alcian blue ile boyama yapılarak oluşan doku parçasının daha çok mezenşimal orijinli olduğu gösterildi. AB ile yapılan boyama hücreler arasında proteoglikan kümeleşmesini, dolayısıyla kıkırdağa benzer doku oluştuğunu tespit etti(Resim 3). Elde ettiğimiz *in vitro* dokunun kıkırdak benzeri olduğu gösterildi.



Resim 3: *In vitro* kıkırdak elde edilmesi. AB boyaması. (10x büyütme)

In vivo kıkırdak defekti onarımı

Ön çalışmanın ikinci aşamasında yağ dokusundan elde edilen ADAS ile defekt onarımı test edildi. Aynı tavşana ikinci seans cerrahi uygulanarak sağ ve sol kulağında 2x2cm kıkırdak defekti oluşturuldu. Sağ kulaktaki kıkırdak defekte 5. 000. 000 ADAS verildi. Sol kulaktaki defekt kontrol amacıyla boş bırakıldı(Bkz. İkinci cerrahi prosedür; *kıkırdak defekti oluşturulması*). 40. gün denek yüksek doz phenobarbitale verilerek sakrifiye edildi. Her iki kulak makroskobik ve mikroskobik

olarak incelendi. Her iki kulaktaki defektin kontrakte olarak ve kenardan rejenerasyon sonucu bir miktar küçüldüğü ve onarım dokusuyla dolduğu görüldü. Denek kulakta defektin %100 onarılmış olduğu, onarım dokusunun kıkırdak ve mezenşimal doku karışımından oluştuğu gözlemlendi. Işık mikroskopunda incelendiğinde kontrol sol kulakta defektin kısmen rejenere olduğu bunun da daha çok kenardan geldiği gözlemlendi(Resim 4-5).

Ön çalışma sonuçları tavşan cilt altı yağ dokusundan ADAS elde edilebilirliğini, bu kök hücrelerin *in vitro* olarak yönlendirilerek kıkırdak elde edilebilirliğini ve ADAS ile tavşan kulağındaki defektin onarılabilirliğini ortaya koymuştur.

Ön çalışma sonuçlarının umut verici olması üzerine literatürde daha önce rastlanmamış olan ADAS ile tavşan kulağındaki geniş kıkırdak defektlerinin onarımı ile ilgili çalışmamız planlanmıştır.



Resim 4: ADAS verilmiş sağ kulak defekti



Resim 5: Kontrol sol kulak defekti

Deney Grupları

Toplam 15 adet tavşan, her grupta 5 denek olacak şekilde 3 grupta deneye tabii tutuldu. Her grupta tavşanların sağ kulakları denek, sol kulakları da kontrol grupları olarak kullanıldı. Sonuçta 3 adet denek, 3 adet de kontrol olmak üzere toplam 6 grup elde edildi.

Grup 1

Bu grupta ADAS hücreleri açısından zengin olan SVF in uygun mikroçevre sağlandığı takdirde herhangi bir işleme tabii tutulmadan kıkırdak oluşturma kapasitesi incelendi.

Grup 1 sağ kulak: Sağ kulakta kıkırdak defekti oluşturularak perikondrokütanöz flep altına ADAS tan zengin SVF(10-12. 000. 000 canlı karışık hücre) verildi. SVF deki kök hücre oranının %1-2 olduğunu düşünürsek, defekte verdiğimiz ADAS hücre sayısı yaklaşık 100.000 -200.000 arasında değişmektedir.

Grup 1 sol kulak: Sol kulakta kıkırdak defekti oluşturularak perikondrokütanöz flep 5/0 vikrille yerine sütüre edildi. Kontrol olarak perikondriumun tek başına kıkırdak onarma kapasitesi belirlendi(Resim 6).

Grup 2

Bu grupta kültür ortamında çoğaltılan ayrıştırılmış ADAS hücrelerinin kıkırdak oluşturma kapasiteleri değerlendirildi. Bu gruptaki işlem iki seansta yapıldı. İlk seansta tavşanın kasık yağ dokusundan ADAS hücreleri elde edildi ve bu hücreler kültür ortamında çoğaltıldı.

Grup 2 sağ kulak: Kültüre edilerek çoğaltılmış ADAS hücreleri (5.000.000 canlı hücre) 200µl MKH büyüme ortamında(*mesenchymal stem cell growth medium*) süspansedildi ve ikinci seansta aynı şekilde sağ kulaktaki kıkırdak defektine verildi.

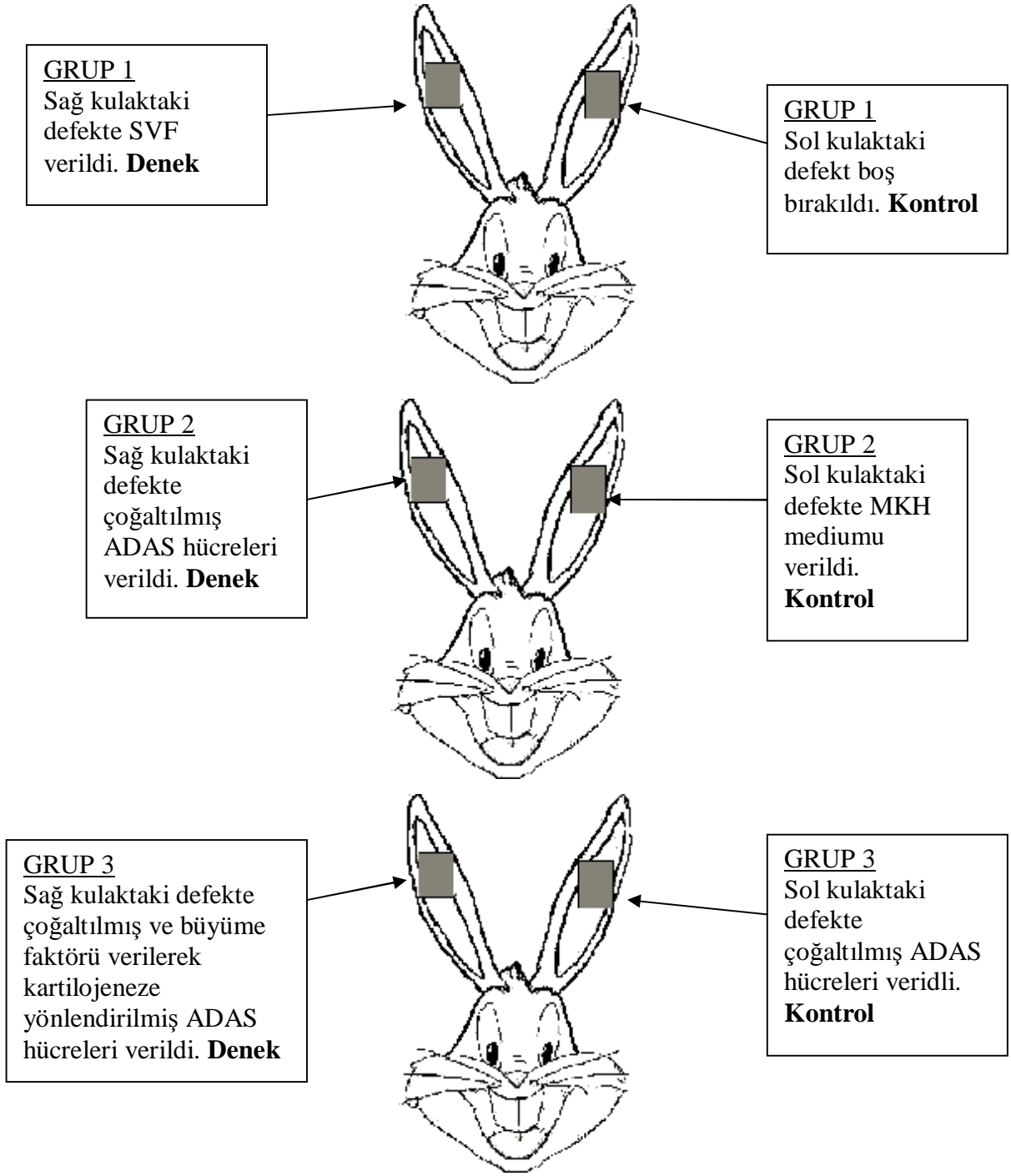
Grup 2 sol kulak: Sol kulaktaki kıkırdak defektine kontrol amaçla 200µl MKH büyüme ortamı verildi.

Grup 3:

Bu grupta kültür ortamında kartilojeneze yönlendirilen ADAS hücrelerinin kıkırdak oluşturma kapasiteleri incelendi. Bu gruptaki işlem de iki seansta gerçekleştirildi. İlk seansta ADAS hücreleri alınarak kültür ortamında çoğaltıldı.

Grup 3 sağ kulak: Sağ kulakta TGFb1 ile indüklenmiş ve kartilojeneze yönlendirilmiş 5.000.000 hücre 200µl MKH büyüme ortamında süspansedilerek kıkırdak defektine verildi.

Grup 3 sol kulak: Kontrol için 5.000.000 ADAS hücresi 200µl MKH de süspansedilerek sol kulaktaki kıkırdak defektine verildi.



Resim 6: Deney gruplarının şematik görünümü

Deneysel Prosedür

Birinci cerrahi prosedür; cilt altı yağ dokusunun elde edilmesi

- A. Tavşana i. m. ketamin 25mg/kg + xylazin 5mg/kg karışımıyla genel anestezi uygulandı.
- B. Tavşan ameliyat masasına sırt üstü yatırılarak kasık bölgesi tıraş edildi.
- C. Bölge daha sonra betadin solüsyonuyla temizlenerek orta sagittal hattın yapılan insizyonla cilt katı açıldı.
- D. Tavşanın kasık bölgesindeki cilt altı yağ dokusu(20-25ml) eksize edildi.
- E. Elde edilmiş yağ dokusu steril enjektör içinde laboratuara götürüldü(Resim 7-8)



Resim 7: Tavşanın kasık yağ dokusunun alınması



Resim 8: Yağ dokusunun steril enjektörle transportu

Yağ dokusundan SVF elde edilmesi

A. Yaklaşık 20-25 ml hacimli yağ dokusu doku makasıyla küçük parçalar halinde doğrandı.

B. Antibiyotik içeren 20 ml HBSS (*Hank's buffered salt solution*) ile 5 kere yıkanarak kan ve diğer yapıların yağ dokusundan uzaklaştırılması sağlandı(resim 9).

C. Yağ dokusu % 0,2 Tip 2 kollajenaz solüsyonu ile 37 °C de 2 ile 3 saat karıştırılarak çalkalandı(Resim 10)

D. %10 FBS(*fetal bovine serum*) eklenerek kollajenaz aktivitesi durduruldu ve 400xg de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı atılarak alttaki pellett hücreleri ile çalışmaya devam edildi.

E. Hücre pelleti içindeki eritrositleri uzaklaştırmak için 20 ml hücre lizis tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi.

F. 300xg de 10 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı. Hücre pelleti 5ml PBS (*phosphate buffered saline*) ile karıştırıldı(Resim11)

G. Hücre süspansiyonu 100 µm çapa sahip delikli yapıdan süzdürüldü. 50 ml lik tüpte toplanan hücreler bu seferde 40 µm çapa sahip delikli yapıdan süzdürüldü. Böylelikle hücre dışındaki büyük yapılardan ayrıldı.

H. 50 ml tüpte toplanan hücre süspansiyonu 45 derece açıyla tutulan 20 ml histopaque solüsyonu üzerine damla damla bırakılarak *histopaque* solüsyon üzerinde kalması sağlandı.

İ. 400xg de 30 dakika santrifüj yapılarak hücrelerin gradient olarak ayrılması sağlandı. Santrifüj sonrası en üstte beyaz bulutumsu bir tabaka dikkatlice çekilip yeni bir tüpe aktarıldı(Resim 12)

J. Bu hücre süspansiyonun hacmi kadar yıkama tamponu eklendi ve 300xg de 10 dakika santrifüj yapıldı. Üst sıvı atıldı ve tekrardan yıkama tamponu ile hücreler karıştırılarak santrifüj edildi. Bu işlem 3 kere tekrarlandı.

K. Elde edilen SVF *trypan blue* ile boyanarak ışık mikroskobu altında sayıldı. 10-12. 000. 000 canlı hücre sayıldı. SVF 200µl SF ile süspanse edilerek kullanıldı(Resim 13).



Resim 9: Küçük parçalara ayrılmış ve yıkamış yağ dokusu



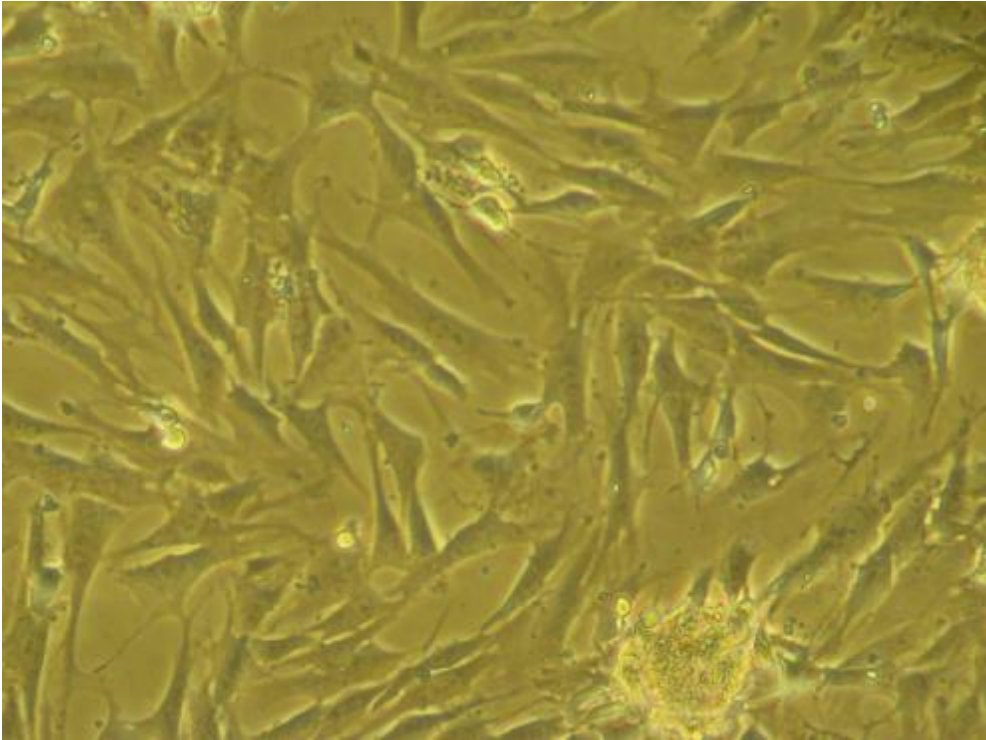
Resim 10: Kollajenzla işlenmiş ve hücrelere ayrılmış yağ dokusu



Resim 11: Tüpün dibinde ADAS ile zengin hücre pelleti görülmekte



Resim 12: Santrifuj sonrası histopaque madde üzerinde toplanan ADAS tan zengin bulutumsu tabaka



Resim 13: Işık mikroskobunda ADAS görüntüleri (40x büyütme)

ADAS hücrelerinden kültür elde edilmesi

A. Hücreler 130cm² lik hücre kültürü kaplarına ekildi. MKH büyüme ortamı(*mesenchymal stem cell growth medium*) ile kültüre edildi.

B. 2 gün sonra ortam yıkanarak değiştirildi ve hücre yoğunluğuna göre pasajlandı.

C. % 90 *confluent* olunca tekrar pasajlandı.

D. 3 gün arayla 2-3 pasaj daha yapılarak yaklaşık 5.000.000 ADAS elde edildi. Hücreler 200µl MKH büyüme ortamında süspense edilerek kullanıma hazır duruma getirildi.

Büyüme faktörü aracılığıyla ADAS hücrelerinin kartilojeneze yönlendirilmesi

A. Aynı yöntemle elde edilen SVF MKH büyüme ortamında 145 cm² hücre kültürü kabına ekildi.

B. *Confluent* olan örnekler %10 DMEM(*Dulbecco modified eagle medium*) %20 PBS içeren mediumda donduruldu.

C. Tekrar açılarak hücreler 130 cm² kaplara ekildi. Sayıları 1. 500. 000 gelinceye kadar MKH büyüme ortamında çoğaltıldı

D. 145 cm² hücre kültür kabına pasajlanarak %1 PBS içeren DMEM solüsyonunda bekletildi.

E. Hücreler kültür kabına yapışınca 10ng/ml TGFb eklendi.

F. 2. gün sonunda ortam yıkanarak 4. gün sonunda hücreler kullanıma hazır hale getirildi. 5. 000. 000 kök hücre 200µl MKH büyüme ortamında süspense edildi.

G. Kontrol amaçlı sol kulaktaki defekte vermek için yukarıda tarif edildiği gibi(Bkz. *ADAS hücrelerinden kültür elde edilmesi*) 5. 000. 000 kök hücre hazırlandı

ADAS hücrelerinin işaretlenmesi

Elde ettiğimiz dokunu verdiğimiz ADAS hücrelerinden oluştuğunu kanıtlamak amacıyla işaretleme işlemi uygulandı.

A. Tüm gruplarda hazırlanan hücre süspansiyonları kıkırdak defektine verilmeden önce Dil boyasıyla işaretlendi. Dil boyası ile işaretlenen kök hücreleri mikroskopik inceleme sırasında DAPİ ile tayin edildi.

B. α MEM solüsyonda 1×10^6 hücre/cc hesabıyla 5 μ l/ml Dil (*fluorescent lipophilic tracer*) boyası eklendi

C. 5% CO2 ortamda 37°C de 20 dakika bekletildi,

D. 5 dakika 450xg'de santrifüj edilerek *phosphate-buffered saline* solüsyonla tekrar süspansiyon yapıldı.

İkinci cerrahi prosedür; kıkırdak defekti oluşturulması

A. Yağın alınması sırasında kullanılan aynı yöntem ile anestezi verilerek tavşan sırtüstü pozisyonda yatırıldı.

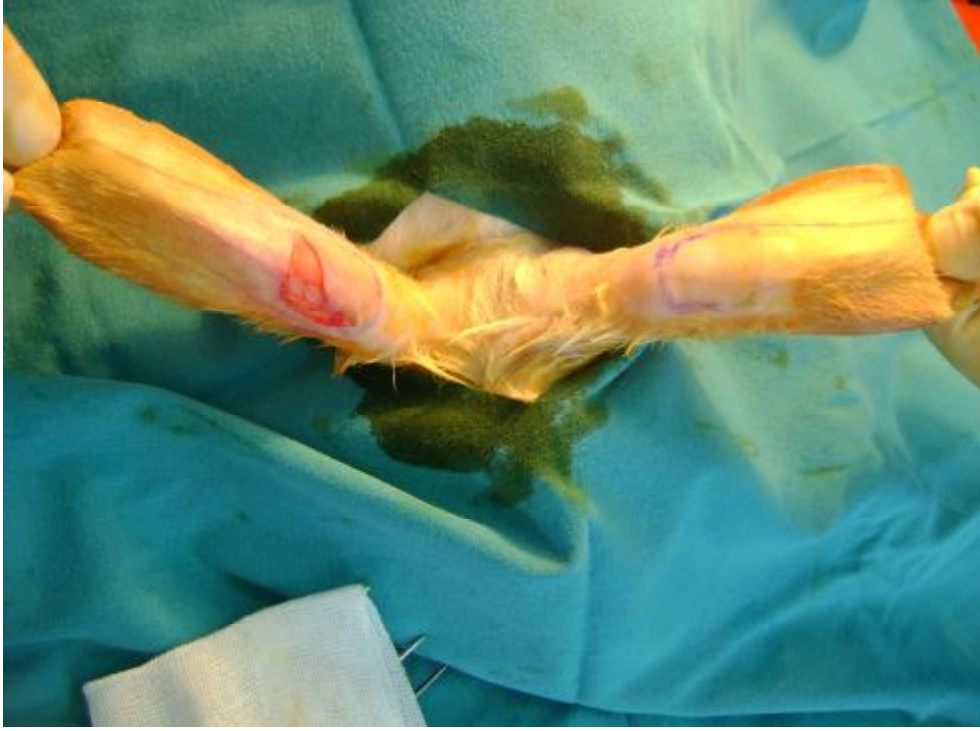
B. Bilateral kulaklar tıraş edilerek *povidon iodin* solüsyonuyla temizlendi.

C. Kulak posteriyorundan 2x2 cm boyutlarda insizyon yapılarak kıkırdak üzerinden bazı proksimale doğru olacak şekilde perikondrokütanöz flep (cilt ve perikondrium bir birinden ayrılmadan kompozit şekilde) eleve edildi(Resim 14)

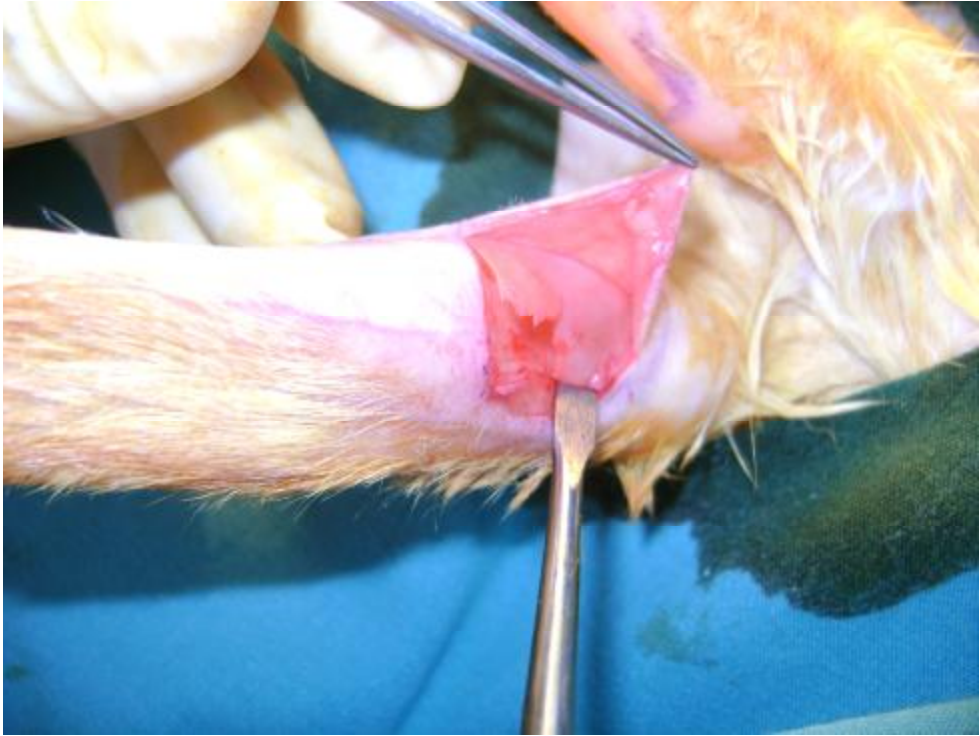
D. Her iki yüzeydeki perikondrium tabakası titiz bir şekilde korunarak kıkırdak 2x2cm boyutlarda eksize edildi(Resim 15–16)

E. Perikondrokütanöz flep yerine suture edilerek sıvı geçirmeyecek boşluk oluşturuldu.

F. Kök hücreler süspansiyon halinde travmatize olmamaları için yavaş akımla ve büyük menfezli plastik enjektör aracılığıyla her gruba uygun içerikte defekte verildi(Resim 17).



Resim 14: Perikondrokütanöz flebin kaldırılması



Resim 15: Kıkırdak diseksiyonu



Resim 16: Eksize edilmiş kıkırdak



Resim 17: Oluşturulmuş hermetik defekte ADAS süspansiyonu verilmesi

Tüm denekler 40. gün yüksek doz phenobarbitale kullanılarak kurban edildi. 15 hayvanda toplam 30 kulak olmak üzere sonuçlar makroskopik ve mikroskopik olarak değerlendirildi.

Değerlendirme

Makroskopik değerlendirme

Oluşturulmuş kırıkta defekt bölgesi öncelikle cilt ve cilt altı dokulardan diseksiyonla ayrıldı. Boyut olarak, çevredeki kırıkta kenarıyla ilişkisi, kalınlık ve deformasyon derecesine göre değerlendirildi. Daha sonra çevresinde 5-6mm salim kırıkta bırakılacak şekilde kesilerek bütün olarak histolojik incelemeye tabii tutuldu.

Mikroskopik değerlendirme

A. Işık Mikroskopik Doku İzleme Protokolü;

Örnekler Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında işleme tabii tutuldu. %10'luk formaldehit ile tespit edilen dokular, fiksatifin uzaklaştırılması amacıyla 1 gece akarsu altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70, %80 ve %96'lık etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından aseton ve ksilen serilerinden geçirildi. 60°C'lik etüv içinde parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü.

B. Hematoksilen-Eozin İle Boyama Protokolü;

Mikrotom (Reichert-Jung) aracılığı ile alınan 5µ'luk parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilene tabii tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %96'dan %70'e azalan alkol serilerinden geçirilen kesitler distile su ile yıkandı. 2 dakika hematoksilen (33230, Riedel-de Haen, Almanya) ile boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 30 saniye eozin (1345, Merck, Darmstadt, Almanya) boyası ile boyandı. Aynı şekilde 5 dakika akarsu altında yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %70, %80 ve %96'lık alkol serilerinden geçirilip havada kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki

değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Almanya) ile kapatıldı.

C. Orcein İle Boyama Protokolü;

Kesitler %70'lik alkole kadar dehidratasyon yapıldı. Kapağı kapalı şalede 90 dk tutulduktan sonra akarsuda yıkandı. %70'lik alkolle çalkalama yapıldıktan sonra 1 dk Light Green'de tutuldu. Akarsuda çalkalanıp %70'lik alkolden başlayıp dehidratasyon yapıldı. Kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı.

D. Alcian Blue ile Boyama Protokolü;

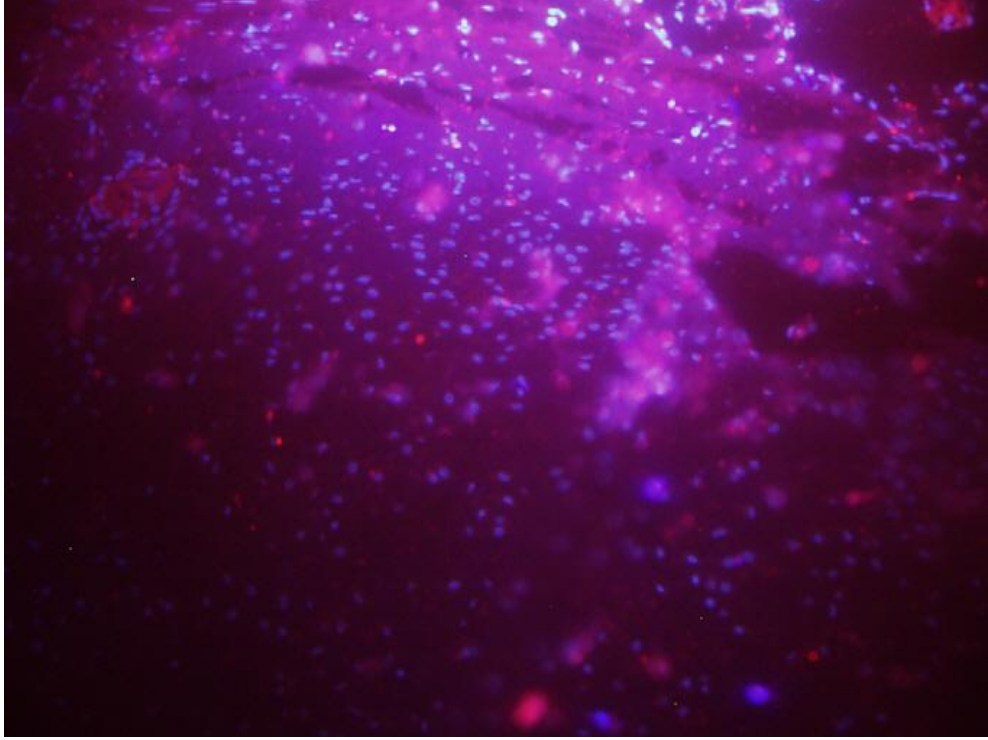
Kesitler distile suya alındı. 5 dk Alcian Blue (pH: 2,5) uygulandıktan sonra distile su ile yıkandı. 5 dk Eosin'de tutulduktan sonra tekrar distile su ile yıkandı. %70'lik alkolden absolü alkole doğru alkol serilerinden geçirildi. Şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan ile kapatıldı.

E. Dil ile boyama protokolü;

Kesitlerin bir bölümü Toluidin Blue ile boyandı. Bu kesitler flüoresan mikroskopunda Dil boyası(1,1'-dioctadecyl-3. 3. 3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate) ile işaretlenmiş ADAS hücrelerinden gelişmiş kondrositleri tayin etmede kullanıldı(Resim 18).

Kesitlere kıkırdak defektlerinde kullanılan histolojik derecelendirme yöntemi uygulanarak, oluşmuş dokunun kalitesi belirlendi. Bunun için Ulutaş ve arkadaşları tarafından elastik kıkırdak için geliştirilmiş ve 2005 yılında yayınlanmış histolojik derecelendirme yöntemi kullanıldı(Tablo1).

Gruplar kendi aralarında ve kontrol grupları ile karşılaştırılarak sonuçlar *Student t*-testi ile istatistiksel olarak değerlendirildi.



Resim 18: Kıkırdak defektine verilmeden önce DiI boyası ile işaretlenmiş ve 40 gün sonra DAPI ile tayin edilmiş kök hücreler (40xbüyütme)

Tablo 1: Kıkırdak rejenerasyonunun histolojik olarak değerlendirilmesi(15).

Hücre morfolojisi		Çevre kıkırdakla bağlantı	
Fibröz doku + mezenşim(az)	1	Çevreyle bağlantı yok	0
Fibröz doku + mezenşim(çok)	2	Tek tarafta bağlantı mevcut	1
Mezenşim + kıkırdak(az)	3	Tüm taraflarda bağlantı mevcut	2
Mezenşim + kıkırdak(çok)	4		
Kıkırdak(%100)	5		

BULGULAR

Makroskobik Değerlendirme

Grup 1

Hem kontrol, hem de denek grubunda defektin bir miktar küçüldüğü, kenarlardan minimal kalınlaşma şeklinde kıkırdak rejenerasyonu olduğu görüldü. Kontrol grubunda defektin santral alanlarında yeni doku oluşumu olmadığı veya minimal doku rejenerasyonu olduğu izlendi. Oysa tüm denek grubunda santralde bazı alanlarda yeni doku oluşumu gözlemlendi ve defektin onarım miktarı kontrol grubundan daha fazla olarak izlendi(Resim19-20).

Grup 2

Kontrol grubunda defektin bir miktar küçüldüğü, kenarlardan minimal kalınlaşma şeklinde kıkırdak rejenerasyonu olduğu görüldü. Bu görüntü grup 1. kontrol grubuyla benzerlik göstermektedir. Denek grubunda kontrol grubuna benzer olarak defekt kenarlarında yeni kıkırdak oluşumu ile beraber defektin santralinin de tamamen dolduğu izlendi. Defektin santralindeki yeni dokunun kıkırdak benzeri saydam gümüşü renkte olduğu ve çevre kıkırdakla kıyaslandığında ince olduğu saptandı. Santraldeki bu dokunun kısmi olarak elastik kıkırdağa benzer sertlikte olduğu belirlendi. Kontrol grubunda santral alan rejenerasyonu gözlenmedi(Resim 21–22).

Grup 3

Hem denek, hem de kontrol grubunda defektin tamamının veya tamama yakın yeni dokuyla dolduğu izlendi(Resim 23–24). Her iki kulakta oluşan dokunun renk ve yapısının kıkırdakla uyumlu olduğu görüldü. Denek tarafta oluşan dokunun kalınlığının kontrol tarafa nazaran daha fazla olduğu ve kıvamında daha sert olduğu saptandı.

Tüm denek ve kontrol gruplarını karşılaştırdığımız zaman en iyi sonuçların Grup 2. denek ve Grup 3. denek ve kontrol gruplarında olduğu gözlemlendi. Grup 1. denek grubunda(sadece SVF kullanılan) sonuçların kontrol grubuna nazaran daha iyi olduğu, fakat 2x2 cm kıkırdak defektini tam onaramadığı görüldü.



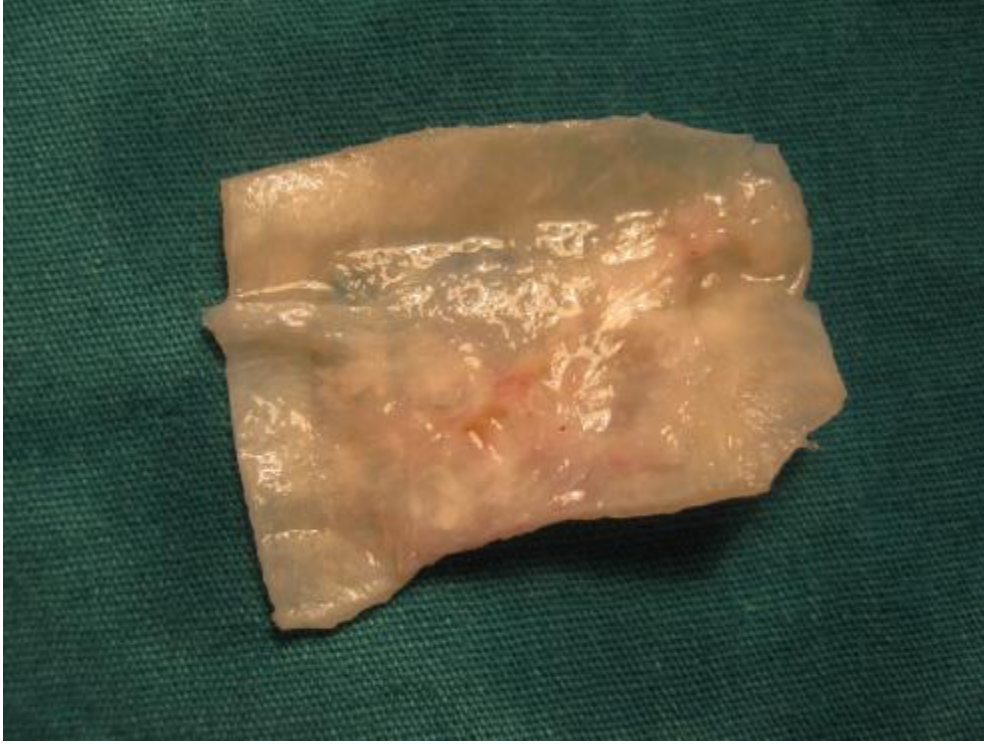
Resim 19: Grup 1, kontrol grubu sol kulak



Resim 20: Grup 1, denek grubu sağ kulak



Resim 21: Grup 2, kontrol grubu sol kulak



Resim 22: Grup 2, denek grubu sağ kulak



Resim 23: Grup 3, kontrol grubu sol kulak



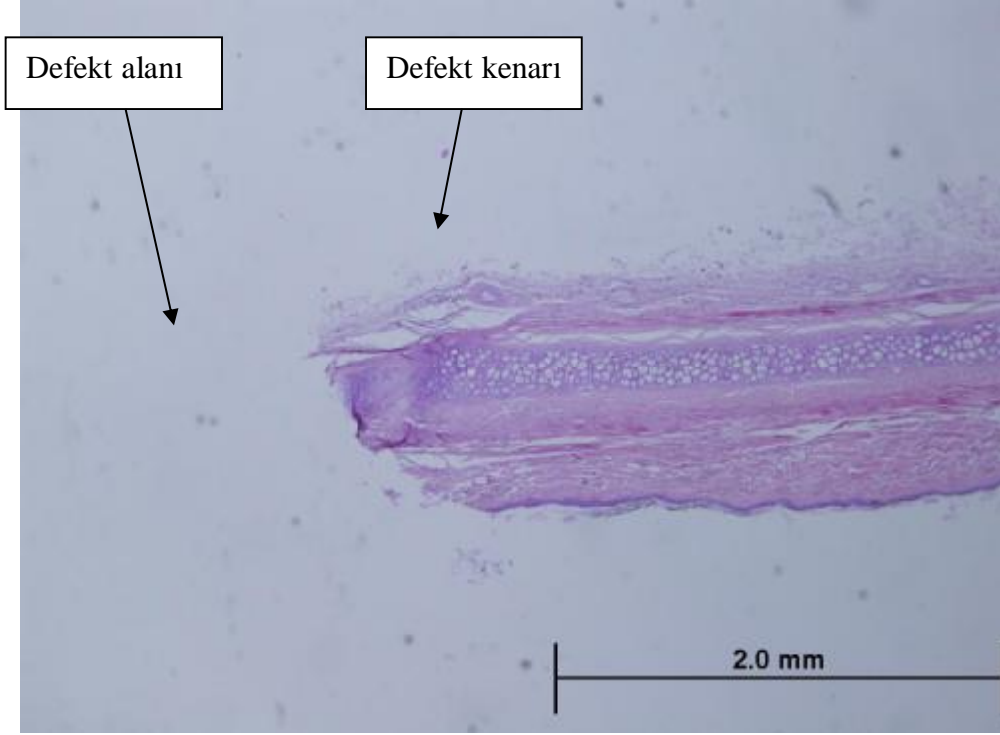
Resim 24: Grup 3, denek grubu sağ kulak

Mikroskopik Değerlendirme

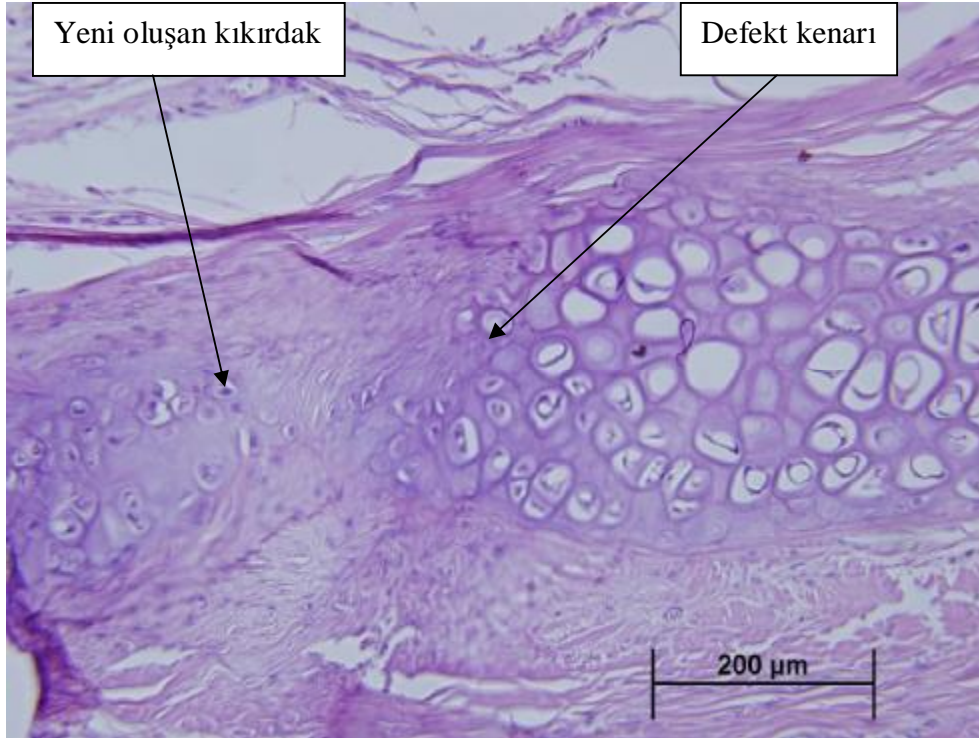
Grup 1

Hem denek, hem de kontrol grubunda periferde bir miktar rejenerasyon ve yeni kıkırdak oluşumu gözlemlendi. Denek grubunda bunun dışında defektin diğer alanlarında da kısmi yeni doku oluşumu gözlenmekteydi. Oluşan doku daha çok mezenşim görünlü olsa da bazı alanlarda kondrosite benzer yeni hücreler saptandı. Grup 1. denek defektlerinde yeni doku oluşumu Grup 3. ve Grup 2. denek defektlere rağmen az olsa da Grup 1. kontrol defektlere nazaran önemli ölçüde fazlaydı(Resim 25–28).

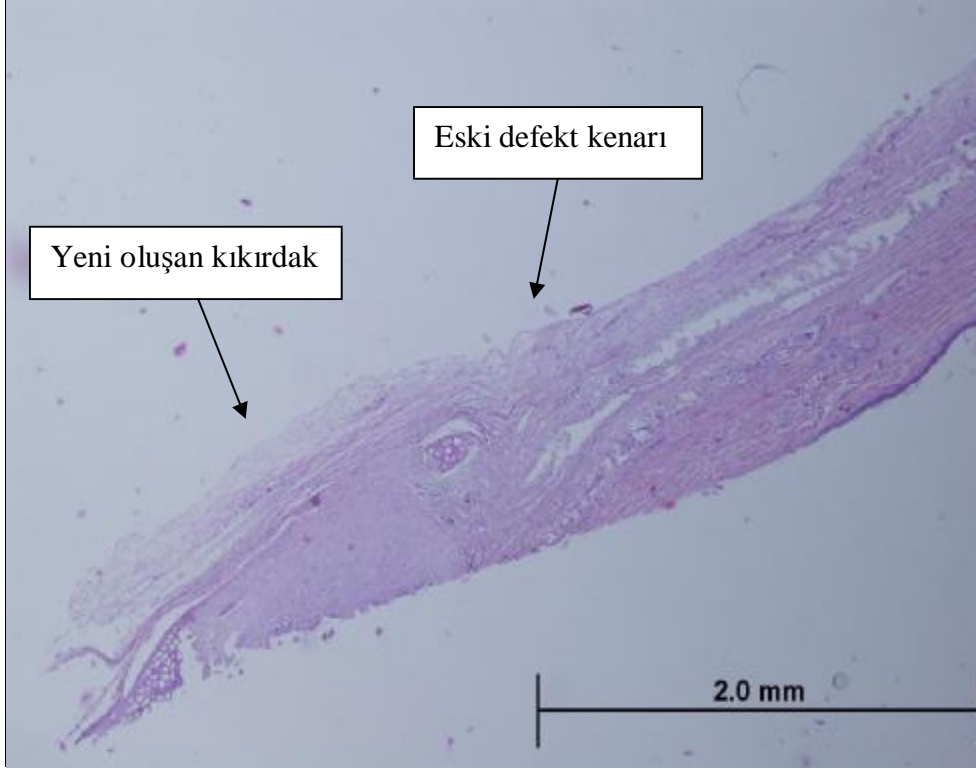
Grup 1. denek grubu için hücre morfolojisi değerleri 1-2, ortalama 1,8 ve çevre ile bağlantı değerleri 1, ortalama 1 olarak derecelendirildi. Grup 1. kontrol grubu için hücre morfolojisi değerleri 1, ortalama 1 ve çevre ile bağlantı değerleri 0-1, ortalama 0,6 olarak belirlendi(Tablo 2).



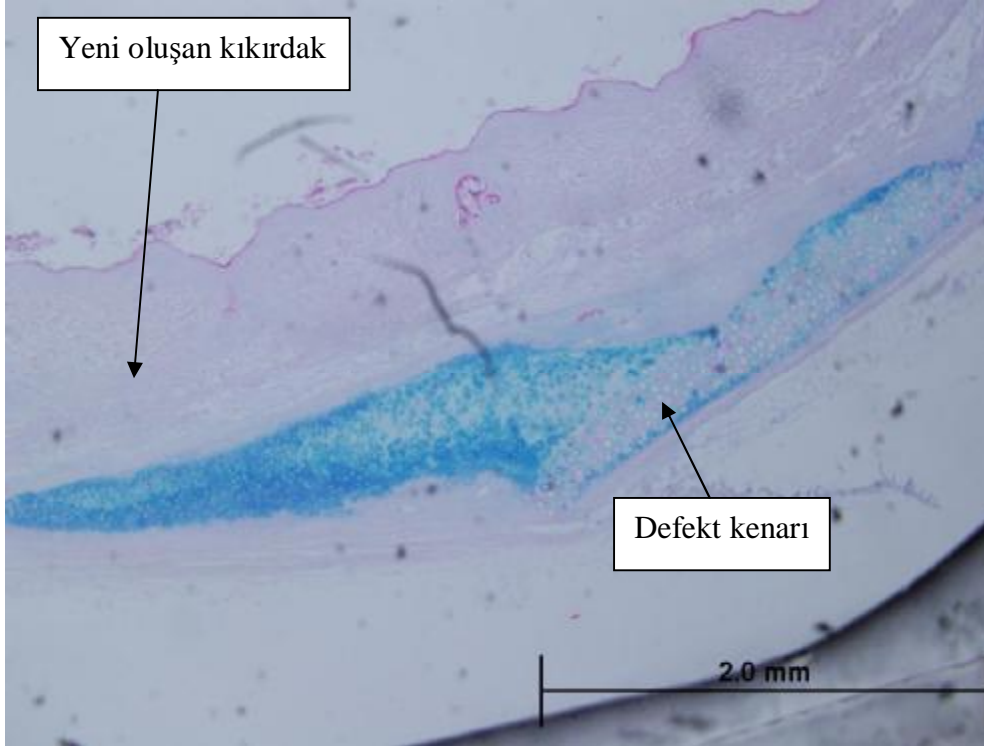
Resim 25: Grup 1. kontrol grubu. Olgu 5. Kıkırdak kenarında minimal rejenerasyon görülmekte. HE boyaması. (4x büyütme)



Resim 26: Grup 1. kontrol grubu. Olgu 5. Kıkırdak kenarında minimal rejenerasyon görülmekte. HE boyaması. (20x büyüme)



Resim 27: Grup 1. denek grubu. Olgu 3. Kısmi yeni doku oluşumu mevcut. HE boyaması. (4x büyütme)

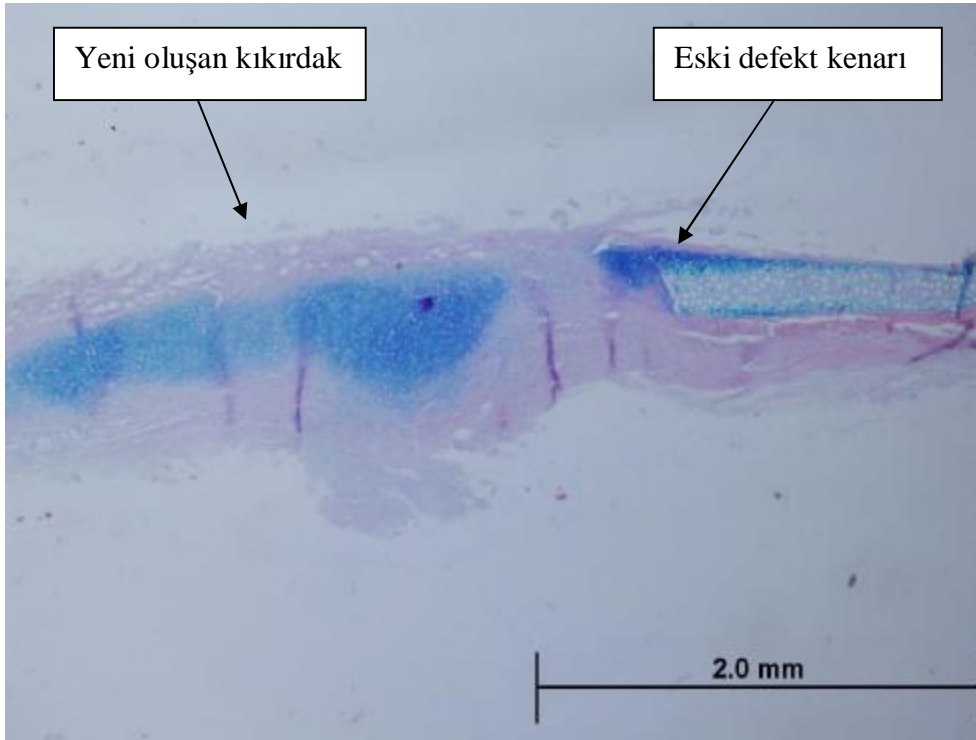


Resim 28: Grup 1. denek grubu. Olgu 3. Kısmi yeni doku oluşumu mevcut. AB ile boyamada lacivert renk proteoglikan toplanmasını göstermekte. (20x büyütme)

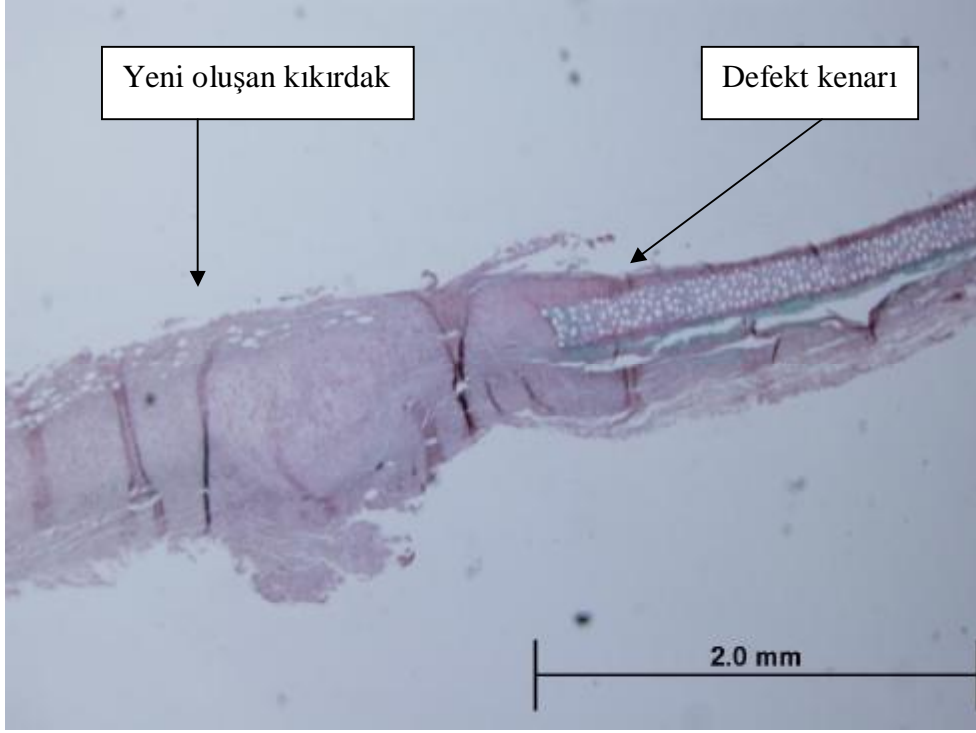
Grup 2

Grup 2. kontrol defektlerin histolojik görüntüleri Grup 1. kontrol görüntülerine benzer özelliklerdeydi. Grup 2. denek defektlerin histolojik değerlendirmesi yeni doku oluşumunu, bu dokunun daha fazla kıkırdağa benzer olduğunu göstermektedir. Kontrol grubundan farklı olarak denek grubunda sadece defekt kenarında değil, aynı zamanda defekt santral alanlarda da yeni doku oluşumu gözlemlendi. Bu doku makroskopik görüntüsüne uygun olarak mikroskopik incelemede de normal kıkırdaktan farklıydı. Eski kıkırdak hücrelerinin yanında daha küçük, daha ağırlıklı mezenşime benzer hücreler mevcuttur. Bu hücreler arasında küçük, ama kondrosite benzer morfolojili hücreler saptandı. Bu hücrelerin çevresinde proteoglikan ve elastik fibrillerin toplanması yeni oluşan dokunun elastik kıkırdak benzeri olduğunu kanıtlamaktadır(Resim 29–30).

Grup 2. denek grubu için hücre morfolojisi değerleri 3-4, ortalama 3,2 ve çevre ile bağlantı değerleri 1-2, ortalama 1,8 olarak derecelendirildi. Grup 2. kontrol grubu için hücre morfolojisi değerleri 1, ortalama 1 ve çevre ile bağlantı değerleri 0-1, ortalama 0,8 olarak belirlendi(Tablo 2).



Resim 29: Grup 2. denek grubu. Olgu1. Yeni doku oluşumu. AB ile boyamada lacivert renk proteoglikan toplanmasını göstermekte. (4x büyütme)



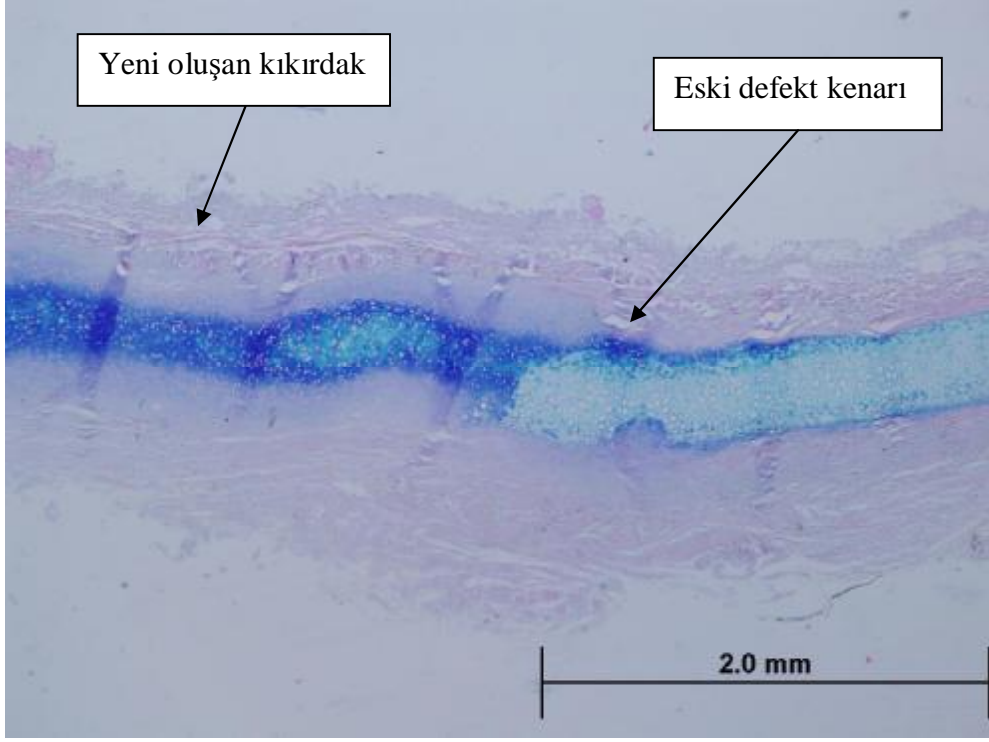
Resim 30: Grup 2. denek grubu. Olgu1. Yeni doku oluşumu. Orcein ile boyamada morumsu renk elastik fibrillerin toplandığını göstermekte. (4x büyütme)

Grup 3

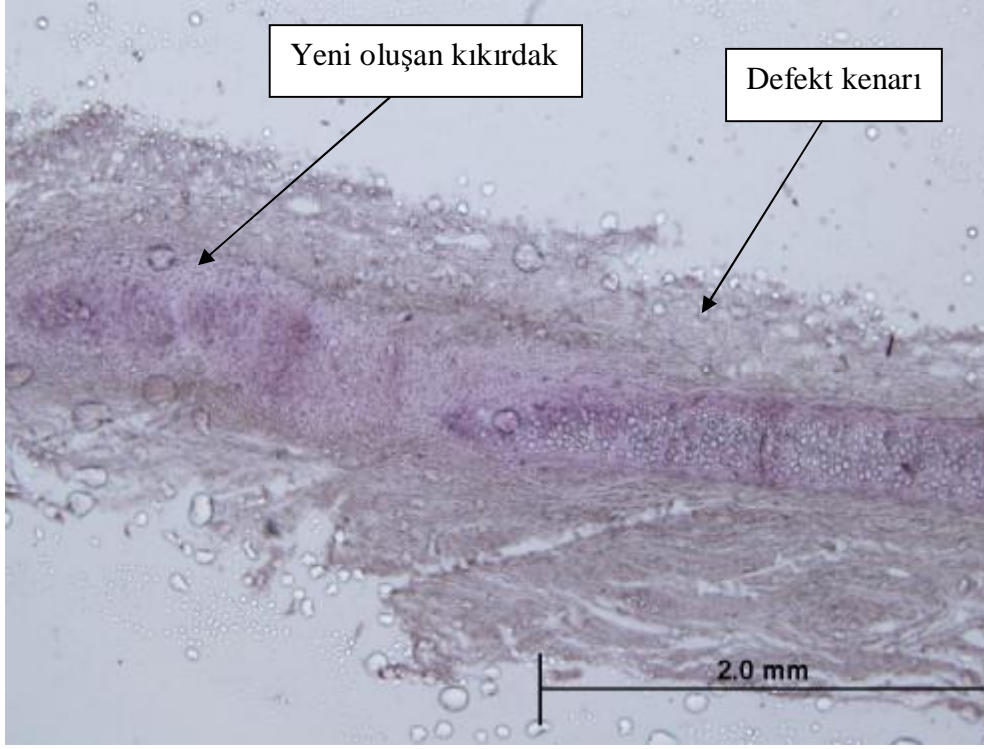
Grup 3. denek taraf defektlerinde sadece kenarlarda değil, diğer alanlarında da yoğun yeni doku oluşumu gözlemlendi. Bu dokuda mezenşimal hücrelerin yanı sıra Grup 2. denek grubundan farklı olarak daha fazla kondrosite benzer hücreler görülmektedir. Bu hücreler ister yapı, isterse de proteoglikan ve elastik liflerin hücreler arası alana toplanması açısından kıkırdak karakterlidir. Grup 3. kontrol grubundaki görüntüler Grup 2. denek defektlerinin görüntüleriyle benzerdir. TGFb verilen Grup 3. denek tarafındaki defektlerde yeni oluşan dokunun özellikleri açısından kıkırdağa daha çok benzediği mikroskopik inceleme ile gösterilmiştir (Resim 31-35).

Grup 3. denek grubu için hücre morfolojisi değerleri 3-4, ortalama 3,8 ve çevre ile bağlantı değerleri 1-2, ortalama 1,8 olarak derecelendirildi. Grup 3. kontrol grubu

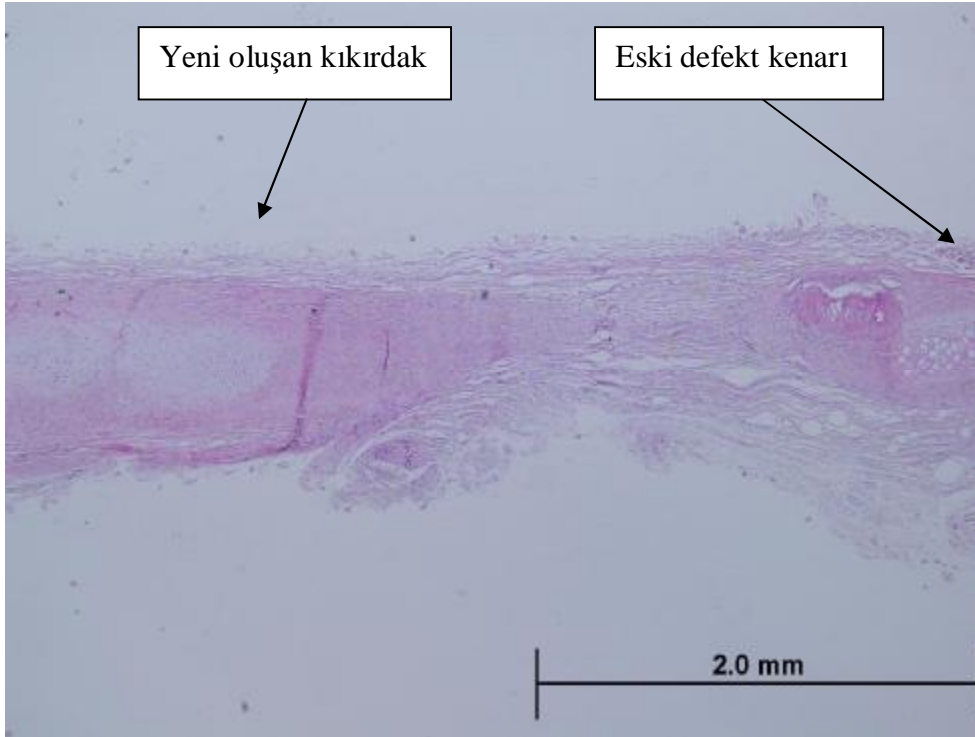
için hücre morfolojisi değerleri 2-4, ortalama 3 ve çevre ile bağlantı değerleri 1-2, ortalama 1,8 olarak belirlendi(Tablo 2).



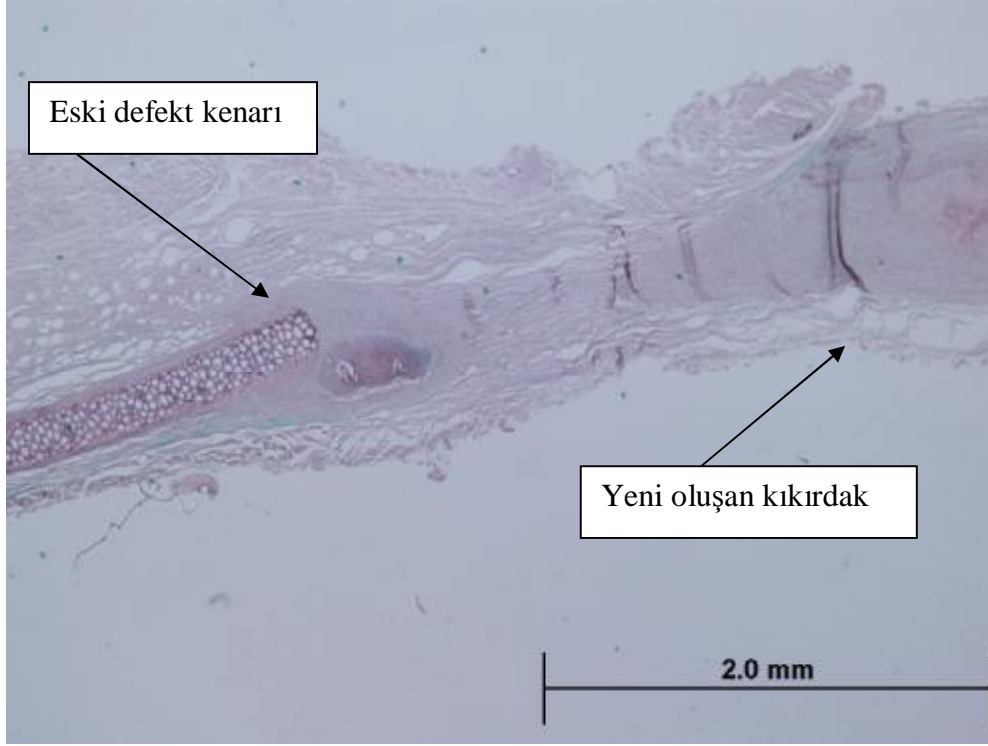
Resim 31: Grup 3. denek grubu. Olgu1. Yeni doku oluşumu. AB ile boyamada lacivert renk proteoglikan toplanmasını göstermekte. (4x büyütme)



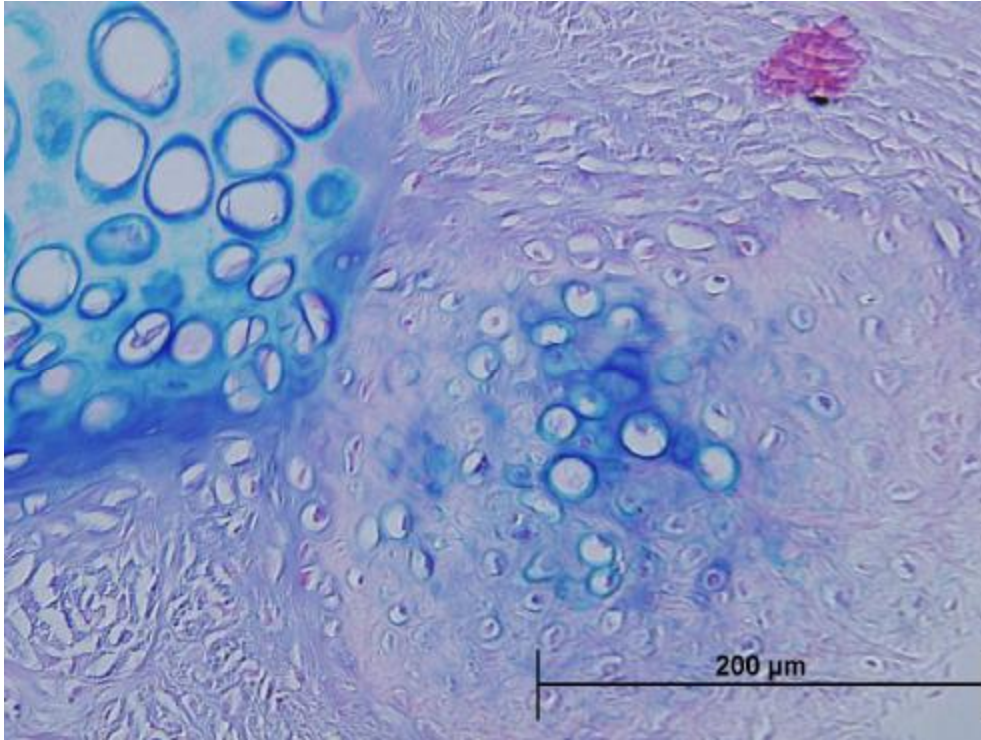
Resim 32: Grup 3. denek grubu. Olgu1. Yeni doku oluşumu. Orcein ile boyamada morumsu renk elastik fibrillerin toplandığını göstermekte. (20x büyütme)



Resim 33: Grup 3. kontrol grubu. Olgu3. Yeni doku oluşumu. HE ile boyama. (4x büyütme)



Resim 34: Grup 3. deney grubu. Olgu3. Yeni doku oluşumu. Orcein ile boyamada morumsu renk elastik fibrillerin toplandığını göstermekte. (4x büyütme)



Resim 35: Grup 3. deney grubu. Olgu3. Büyük lakunalı eski kondrositlerle beraber benzer yapı, ama küçük lakunalı yeni kondrosite benzer hücreler görülmekte. AB ile boyamada lacivert renk proteoglikanların toplandığını göstermekte. (40x büyütme)

İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçlar bilgisayarda Sigmaplot programı kullanılarak *Student t*-testi ile değerlendirildi. Her grup kendi içinde denek ve kontrol olarak ve diğer gruplarla çapraz şekilde karşılaştırıldı. Grup 1. denek(SVF verilen) ve kontrol(boş bırakılan) gruplar arasında makroskobik değerlendirme sırasında denek grup sonuçları daha iyi olmasına rağmen iki grup arasındaki fark hücre morfolojisi ve çevre ile bağlantı skorları açısından istatistiksel olarak anlamlı değildi($p>0,05$). Grup 2. denek grubun(çoğaltılmış ADAS verilen) sonuçları kontrol(sadece MKH ortamı verilen) grup sonuçlarıyla karşılaştırıldığında makroskobik değerlendirmeye uygun olarak hücre morfolojisi ve çevre ile bağlantı skorları denek grubunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde iyi bulundu($p>0,05$). Aynı zamanda Grup 2. denek grubun(çoğaltılmış ADAS verilen) sonuçları Grup1. denek grubu(SVF) sonuçları ile çapraz karşılaştırıldı. Grup 2. denek tarafında elde edilen skora sonuçları Grup 1. denek tarafından elde edilenlerden istatistiksel olarak anlamlı olacak düzeyde iyi bulundu. Grup 3. denek(çoğaltılmış ve kartilojeneze yönlendirilmiş ADAS verilen) ve kontrol(çoğaltılmış ADAS verilen) gruplar arasında yapılan değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı. Grup 3. denek ve kontrol gruplarının sonuçları çapraz değerlendirmede Grup 1. denek ve kontrol sonuçlarından iyiydi ve istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttu($p>0,05$). Grup 3. denek ve kontrol gruplarla Grup 2. denek grubu sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı.

Tablo 2. Kıkırdak defektlerinin histolojik derecelendirmeye göre değerlendirilmesi

		Grup 1		Grup 2		Grup 3	
		Hücre morfolojisi	Çevreyle bağlantı	Hücre morfolojisi	Çevreyle bağlantı	Hücre morfolojisi	Çevreyle bağlantı
D	Olgu1	2	1	3	2	4	2
E	Olgu2	2	1	3	2	4	2
N	Olgu3	2	1	3	2	4	2
E	Olgu4	1	1	3	1	3	1
Y	Olgu5	1	1	4	2	4	2
K	Olgu1	1	1	1	1	2	2
O	Olgu2	1	1	1	0	3	2
N	Olgu3	1	0	1	1	3	1
T	Olgu4	1	1	1	1	3	2
R	Olgu5	1	0	1	1	4	2
O							
L							

TARTIŞMA

Doğumsal ve edinsel(travma, tümör rezeksiyonu vb) nedenlerle kıkırdak defektleri oluşmaktadır(1-3). Kıkırdağı sararak beslenmesinden ve rejenerasyonundan sorumlu olan perikondrium tabakası ancak milimetrik düzeydeki defektleri onarabilmektedir. Perikondriumun rejenerasyon kapasitesi genellikle oluşan defektlerin büyüklüğü göz önüne alınırsa yetersizdir(15-16).

Tavşan kulağında yapılan bir çalışmada perikondriumun kıkırdakta oluşturulmuş 1x1 cm defekti onaramadığı, başka bir çalışmada ise 2x2 cm çapında kıkırdak defektlerini kapatamadığı görülmüştür(17-18). Biz de bu nedenle daha güvenilir

sonuç elde etmek için çalışmamızda perikondriumun tek başına onarmasının mümkün olmadığı büyük(2x2 cm) kritik hacimli kıkırdak defektlerini kullandık.

Kıkırdak rejenerasyonunu arttırmak için yeni yöntemler üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Kıkırdak defektlerini onarmak için kullanılan yöntemleri aşağıdaki gruplara ayırabiliriz:

- Kıkırdağın rejenerasyonunu arttırıcı mekanik yöntemler
- Greft kullanımı
- İnorganik implant kullanımı
- Hücre kültürü içeren yöntemler
- Kombine yöntemler

Mekanik yöntemler başlığı altında girişte özetlenen bu yöntemler arasında mikrofraktürler, drille delme, abrazyonlar denenmiş, fakat istenilen sonuçlar elde edilmemiştir. Burkart ve Imhoff 2001 yılında, Agneskirchner ve arkadaşları 2002 yılında, Steadman ve arkadaşları 2001 yılında eklem yüzeylerinde osteokondral rejenerasyonu arttırmak için mikrofraktür yöntemini kullanmış, fakat yeterli sonuç elde edememişlerdir. Müller ve arkadaşları 1999 yılında kıkırdak rejenerasyonunu arttırmak için eklem yüzeylerinde drilleme yöntemini kullanmışlardır. Sonuçlar yine yetersiz olarak bildirilmiştir(26-29)

Rejenerasyon arttırıcı yöntemlerin başarısız olması nedeniyle kıkırdak onarımında günümüzde en çok kullanılan yöntem kıkırdak greftleridir. Kıkırdak greftleri otogreft veya homogreft şeklinde olabilir. Başka bir kaynaktan elde edilen homogreftler sınırsız kaynak teşkil etmesi, verici alan morbiditesi yaratmaması gibi avantajlara sahiptir ve maksillofasiyal rekonstrüktif cerrahide bazen kullanılmaktadır. Tüm avantajlarına rağmen homogreftlerin kullanımı doku uyumsuzluğu, zamanla hacmini kaybetmesi, enfeksiyon taşıma riski, hazırlanmasının maliyetli olması gibi dezavantajları nedeniyle kısıtlanmaktadır. Ayrıca kadavradan doku alınarak canlı insana yerleştirilmesi gibi etik ve diğer sorunlar yaratmaktadır(35,37-39).

En ideal ve en çok kullanılan yöntem otojen kıkırdak greftleridir(30-31). Otojen kıkırdak greftleri yeni yerine kolay adapte olmakta, doku rejeksiyonuna neden olmamakta, hacmini korumaktadır(30, 32-34). Fakat verici alan morbiditesi yaratmakta ve operasyon süresini uzatmaktadır. En önemli dezavantajı da

kullanılabilecek donör alanlardan elde edilebilecek kıkırdak greftlerinin miktarının sınırlı olmasıdır(35–36).

Rekonstrüktif cerrahide temel prensiplerden biri onarım dokusunun mümkün olduğunca orijinaline benzer dokudan elde edilmesidir. Bilindiği üzere vücudumuzda üç tip kıkırdak mevcuttur. Bunlardan özellikle elastik kıkırdak açısından yeterli donör alan sağlanması mümkün değildir. Kıkırdak donör alanı açısından en büyük kaynak olan kaburga uçlarından elde edilen hiyalin kıkırdaktır. Bu nedenle büyük elastik kıkırdak gereksinimi olan (örneğin doğumsal mikrotia olgularda uygulanan kulak onarımlarında olduğu gibi) durumlarda defektleri hiyalin kıkırdakla onarmak zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. İdeal onarımda ise elastik kıkırdak defektlerinin gene elastik kıkırdak greftleri ile onarımı gerekmektedir(35–37,39).

Eğer kök hücre yöntemi ile elastik kıkırdak elde edilmesi sağlanabilirse bu yolla elastik kıkırdak defektlerinin orijinaline uygun onarımı sağlanabilecektir. Sonuçlara bakıldığında özellikle Grup 3. denek defekterde elde edilen kıkırdak benzeri dokunun içeriğinin elastik liflerden zengin olması kök hücre kullanılarak elastik kıkırdak elde edilebileceğini ortaya koymaktadır.

Perikondrial ve periostal greftler eklem yüzeylerindeki küçük osteokondral defektlerde başarılıdır(15-16). Sarı ve arkadaşlarının 2006 yılında tavşanlar üzerinde yapmış oldukları çalışma sırasında perikondrial ve periostal greftler otolog kanla kombine edilerek kullanılmıştır. Zamanla greftlerden fibrokartilaja benzer doku elde edilmiştir. Yazarlar bu dokunun kıkırdak kalitesinde olmasının tartışmalı olduğunu belirtmişlerdir(16). Ulutaş ve arkadaşlarının 2005 yılında yayınlanan tavşanlar üzerinde yapılmış çalışmasında perikondrial ve periostal greftlerle tavşan kulağındaki 1x1 cm kıkırdak defekti onarılmıştır(15). Tüm çalışmalara rağmen perikondrial ve periostal greftler klinikte sadece dejenere diz eklemi yüzeylerinde kullanılabilmektedir(40–41).

Organik ve inorganik implantlar kıkırdak defektlerinin onarımı için kullanılmaktadır. Verici alan morbiditesi yaratmaması, sınırsız kaynak teşkil etmesi, istenilen formatta üretilebilmesi, kolay sterilizasyonu nedeniyle birçok deneysel ve klinik çalışmalarda kullanılmıştır. Konulduğu yere kötü adaptasyonu, çevre dokulardan farklı mekanik özelliklere sahip olması, sık deformasyona, allerjik ve

enflamatuar reaksiyonlara neden olması, kolay vücuttan dışarıya çıkması gibi istenmeyen yan etkilere sahiptir(37, 39).

Hücre kültürü ihtiva eden yöntemlerde temel prensip az miktarda hücre elde ederek kültür ortamında çoğaltmak ve defekti onaracak kalitede doku elde etmektir. Kıkırdak için gereken başlangıç yetişkin kondrositlerden veya kök hücrelerden elde edilebilir.

Yetişkin kondrositlerin kültür ortamında üretilmesi ve kıkırdak defektlerinin onarımında kullanımına dair çalışmalar mevcuttur(42-43). Otolog kondrositlerin implantasyonu yöntemi son 10 yılda kullanılmaktadır. Bazı başarılı sonuçlara rağmen yetişkin kondrosit kültürlerinin klinikte uygulanmasını engelleyen ciddi dezavantajları mevcuttur. Bu dezavantajlar şu şekilde sıralanabilir;

1. Doku elde etmek ve uygulamak zordur.
2. Yetişkin kondrositler zonal belleğe sahiptir ve yüzeysel kondrositlerden elde edilen kültür kıkırdak derinde yaşamamaktadır.
3. Monolayer kültürde dediferansiye olmaktadır. Yani kıkırdak özelliklerini kaybetmektedirler
4. Yetişkin kondrositlerin üremesi sınırlıdır, bireyin yaşı arttıkça üreme azalmakta ve bol miktar başlangıç hücre gerekmektedir, bu da ciddi verici alan hasarına neden olmaktadır.
5. Yetişkin hücrelerden yapılan kültür sonuçları tahmin edilemez, avasküler oldukları için yeni ortamda yaşam kapasiteleri düşüktür.
6. Kullanılan yöntemler maliyetlidir(45-48).

Kök hücrelerden de kıkırdak elde etmek mümkündür. Kök hücreler vücudumuzun ölen veya zarar gören hücrelerini onarmakla görevlidirler. Vücudumuzda her gün sınırlı sayıda ölen veya zarar gören hücreleri yenilemektedirler. En büyük sorun kök hücrelerin onarım kapasitelerinin sınırlı olması, büyük doku kayıplarında yetersiz onarım ve düşük kaliteli skar dokusu oluşumudur (50-51). Kök hücreler yeni ortamda yerel mikro faktörlerin etkisiyle çoğalmakta ve uygun dokuya dönüşmektedir(50, 52-53, 55).

Kök hücreler embriyonik ve yetişkin kök hücreler olmak üzere 2 grupta incelenebilir. EKH ilk defa 1981 yılında Martin tarafından tanımlanmıştır. İlk insan EKH hattı 1998 yılında kullanılmıştır(59). Bu hücreler multipotenttir, teorik olarak

ölümsüzdür ve her türlü hücreye dönüşebilmektedir. Besleyici kültür ortamında sınırsız sayıda çoğalmaktadır. Bu hücre hatlarının büyük bilimsel ve ekonomik önemi mevcuttur. Fakat aynı zamanda ciddi dezavantajları da mevcuttur. EKH klinik kullanımı sınırlıdır, üremesini kontrol etmek zordur. Çoğu zaman teratoma dönüşmektedir. Embriyonal kök hücrelerin kullanımı hakkında bilgiler çelişkilidir ve etik sorunlar yaratmaktadır. Bu etik sorunlar nedeniyle birçok ülkede kullanımı yasak veya sınırlıdır(60-62).

YMKH ile ilgili ilk çalışmalar Becker ve arkadaşlarına aittir(1963). Friedenstein ve Petrakova ilk defa 1966 yılında sıçan kemik iliği stromal fraksiyondan mezenşimal kök hücreleri (MKH) ayırarak identifiye ettiler. YMKH vücudumuzun her yerinde mevcuttur, pluripotent olup birçok dokudan elde edilmektedir. En sık kullanılan kemik iliğinden elde edilen kök hücrelerdir(70-78).

Bu hücrelerin mezenşimal kökenli dokulara (kemik, bağ, kas, kıkırdak, yağ) dönüşebildiği gösterilmiştir. MKH kemik iliği hücre popülasyonunda %0. 001–0. 01 paya sahiptir(68-69).

Kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin birçok dezavantajı mevcuttur. Sınırlı sayıda elde edilmesi, kemik iliği ponksiyonu gibi ağırlı ve travmatik yöntem kullanılması kemik iliği kaynaklı kök hücrelerin kullanımını sınırlamaktadır(90,99).

Diğer kök hücrelerin kullanımındaki dezavantajları nedeniyle biz çalışmamızda elde edilmesi ve uygulanması daha kolay olan yağ kökenli yetişkin mezenşimal kök hücreleri(ADAS) kullandık. İlk defa 2001 yılında Zuk ve arkadaşları tarafından insan lipoaspiratından elde edilmiştir. Lipoaspirattan kök hücreden zengin stromal vasküler fraksiyon (SVF) elde edilerek fibroblastlar, kas hücreleri, preadipositler, kemik iliği kökenli MKH ile karşılaştırılmıştır. *In vitro* ortamda farklı kültür ortamları kullanılarak kök hücrelerden osteojenik, kondrojenik, adipojenik ve miyojenik farklılaşma gözlemlenmiştir(7-8). Diğer kök hücre kaynaklarına göre daha verimlidir (61). 1gr yağ dokusundan 10. 000-25. 000 kök hücre elde edilebilmektedir (98). Yapılan başka bir çalışmaya göre 1gr cilt altı yağ dokusundan 5000 kök hücre elde edilmiştir. Karşılaştırma yapıldığında 1gr kemik iliğinden 100 – 1000 arası kök hücre ayırmak mümkündür(99). Diğer bir deneysel çalışmaya göre 1gr yağ dokusundan 350. 000 preadiposit izole edilebilmektedir(100).

Huang ve arkadaşlarının 2004 de yayınladıkları deneysel çalışmada *in vitro* koşullarda ADAS hücrelerin kondrojenik ortam etkisiyle 48 saat içinde nodüller oluşturduğu ve tip2 kollajen, kondroitin-4-sülfat ve keratan sülfat sentezlediği görüldü. Kıkırdak için özellikli sayılan bu proteoglikanların salgılanması yeni kıkırdak oluştuğunu göstermektedir(10).

Suresh ve arkadaşları 2003 yılında tavşanlarda osteokondral defektlerin ADAS hücrelerle onarımına dair deneysel çalışmayı yayınladılar. Çalışma sırasında tavşandan kemik iliği, dermis, yağ dokusu ve periost alınarak kök hücre elde edilmiştir. Daha sonra tavşanların femur başında 6x3x1mm osteokondral defekt oluşturularak farklı hayvanlarda ADAS hücreleri, kemik iliği kökenli kök hücreler, periost kökenli kök hücreler, dermis kökenli kök hücreler, otogreft(osteokondral) ile onarılmıştır. 2, 6, 12, 24 hafta sonra sakrifiye edilen hayvanların onarılmış femur başı defektleri histolojik ve biyomekanik incelemeye tabii tutulmuştur. En iyi sonuçlar ADAS hücreleri ile onarılan deneklerden elde edilmiştir(61).

Wei ve ark. 2006 yılında yayınladıkları *in vitro* deneysel çalışmada tavşandan elde edilen ADAS hücreleri kondratin sülfat ile kombine edilerek fibrin skafold üzerinde deneye tabii tutulmuştur. Kontrol grubunda sadece ADAS hücreleri, deney grubunda ADAS hücreleri ve kondratin sülfat kullanılan çalışmadan 14 gün sonra sonuçlar histolojik olarak analiz edilmiştir. Her iki grupta ADAS hücrelerin kondrositlere farklılaşmış olduğu görülse de deney grubunda kondratin sülfat etkisiyle daha fazla hücre proliferasyonu, proteoglikan sentezi izlenmiştir. Elde edilen veriler çevredeki glikozaminglikan yapılı kondratin sülfatın ADAS hücrelerinden yeni kıkırdak oluşmasına pozitif yönde etki ettiğini göstermektedir(1).

Başka bir çalışmada ADAS hücrelerin farklılaşması için adenovirüs sentezli GDF-5 (*growth and differentiation factor 5*) kullanılmıştır. Sıçan ADAS hücreleri GDF-5 sentezleyen adenovirüs vektörüyle kombine edildikten sonra *in vitro* kıkırdak oluşumu izlenmiştir. Kontrol gruplarında ADAS hücreleri üreyen ortama GDF-5 ve TGFb eklenerek deney grubuyla karşılaştırılmıştır. Tüm gruplarda neokartilojenez gözlemleyen araştırmacılar GDF-5 kondrojenik olduğunu, bu amaçla hücre kültürü çalışmalarında kullanılabileceğini gösterdiler(58).

Dragoo ve arkadaşları 2007 yılında yapmış oldukları *in vivo* çalışmada ADAS hücrelerle tavşan femur başında 3x4mm çapında tam kat osteokondral defektleri

başarılı bir şekilde onardılar. Sekiz hafta sonra femur başlarından alınan histolojik preparatlarda kırıldak gelişimi gözlemlendi(4).

Koga ve arkadaşlarının 2007 yılında yayınladıkları çalışmada mezenşimal kökenli dokulardan (eklem zarı, kemik iliği, yağ ve kas) kök hücre elde ederek onların kırıldak oluşturma kapasiteleri karşılaştırıldı. *In vitro* ve *in vivo* tavşan femur başında oluşturulan 5x5x3mm osteokondral defektlerde MKH ile kırıldak onarımı özellikleri araştırıldı. Tüm MKH gruplarının kırıldığa dönüştüğü, fakat en iyi sonuç eklem zarı ve kemik iliği kökenli kök hücrelerin çevresinde görüldüğü kaydedilmiştir(6).

. Bazı çalışmalarda diğer mezenşimal dokulardan elde edilen kök hücrelerin kartilojenez yönünde daha iyi sonuç verdiğine dair sınırlı sayıda bilgi olmasına rağmen ADAS hücrelerin kondrojenik kapasitesi ile ilgili literatürde yayınlanmış birçok *in vitro* ve *in vivo* çalışma mevcuttur. Ayrıca ADAS hücrelerin daha düşük kırıldak oluşturma kapasitesi hakkında bilgiler çelişkilidir ve tekrar değerlendirilmesine ihtiyaç vardır.

ADAS hücrelerin kök hücre çalışmalarında kullanımını arttıran çok sayıda avantaj da saptanmıştır. Minimal verici alan morbiditesi ile bol miktar pluripotent kök hücre elde etmek mümkündür (61, 98-100). ADAS hücreleri kültüre edildiğinde üreme özelliğini, pluripotentiğini kaybetmemektedir (58, 61). ADAS kondrojenik, osteojenik, miyojenik, nörojenik, adipojenik özelliklere sahiptir(9-12). Tüm bunlar ADAS hücrelerini eşsiz otolog doku kaynağı yapmaktadır.

Buna rağmen kök hücrelerin klinikte uygulanmasını engelleyen bazı faktörler mevcuttur:

1. Canlıdan elde edilen hücre sayısının yetersiz olması, bu nedenle kök hücreleri kültür ortamında üretmek zorunluluğu

2. İmplantasyon sonrası oluşan hücre apoptozu

3. Onarılan dokunun damarlanma problemleri

4. Taşıyıcı *skaffold* sorunları

5. Etik sorunlar

6. Yüksek maliyet(50, 56-57)

Kök hücrelerin klinikte uygulanmasını engelleyen önemli problem maliyet sorunudur. Maliyetin fazla olmasına sebep pahalı büyüme faktörleri, *skafoldlar* ve kültür ortamlarıdır. Kök hücrelerin kırıldak defektlerin onarımı amacıyla klinikte

kullanımını engelleyen dezavantajların ortadan kaldırılması, özellikle maliyetin azaltılması gerekmektedir. Bu nedenle kök hücre kaynağı olarak özellikle daha kolay ve çok sayıda elde edilebilir olan ADAS hücrelerini tercih ettik.

Kök hücrelerin tam olarak ayrılmadığı SVF nin ADAS yönünden zengin olduğunu varsayarak maliyeti azaltmak ve klinik uygulama yönünden kolaylık açısından bunu da kullandık. Pahalı büyüme faktörleri kullanmak yerine uygun mikroçevrenin(perikondrium) kıkırdak oluşumu sağlayabileceği hipotezini araştırdık.

Perikondriumun ince kambial katında kondroblastlar bulunduğu ve büyüme faktörleri salgıladığı bilinmektedir. Duynstee ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada perikondriumun yeni kıkırdak oluştururken TGFb ve FGF2 salgıladığı görülmüştür(19) TGFb ve FGF MKH hücrelerden *in vitro* ve *in vivo* kıkırdak elde edilmesi için sık kullanılan büyüme faktörleridir. (24-25)

Perikondrium ince iç kambial ve dış fibroz katmandan oluşmaktadır. Dış katman damarlanma açısından zengindir ve kıkırdağın beslenmesinde, iç katmansa rejenerasyonunda rol almaktadır. O'Driscoll ve Fitzsimmons yaptıkları çalışmada dış katmanın fibroblastlar içerdiği ve yara kenarlarını onardığı, iç katmanın kondroblastlar içerdiği ve yeni kıkırdak oluşturduğu görülmüştür. Çalışma sırasında ayrıca dış fibröz katmanın yeni kıkırdak oluşumunu durdurduğu ve fibrozise neden olduğu gösterilmiştir(14). Bu ince oranı bozmamak için çalışmamızda her iki katmanı içeren perikondrium ve üzerindeki cilt ayrılmadan kıkırdak üzerinden kompozit flep(perikondrokütanöz) olarak kaldırıldı.

Perikondriumu aynı zamanda büyüme faktörleri salgılayan ve hücrelerin tutunacağı *skafold* görevinde kullandık. Verdiğimiz ADAS ince tabaka halinde(monolayer kültür) iç kambial kata tutunacağını ve bu kattan beslenerek çoğalacağını düşündük.

Ayrıca kulak perikondriumu mikroçevre olarak kullanılması ile literatürde daha üzerinde durulmamış olan elastik kıkırdak elde etmeyi planladık. Yayınlanan çalışmaları incelersek genellikle tavşan femur ucundaki osteokondral defektlerin kullanıldığını görebiliriz. Tavşan femurunun ucundaki eklem yüzey boyutunu düşünürsek kullanılan defekt boyutunun 3-4mm den fazla olmadığı anlaşılmaktadır. Oysa böyle küçük defektin kendi başına kapanma ihtimali yüksektir. Biz çalışmamızda büyük kıkırdak defekti kullanarak perikondriumun tek başına defekti

onarması ihtimalini ortadan kaldırdık. ADAS vermediğimiz kontrol gruplarında defektin kenarından milimetrik boyutlarda kıkırdak rejenerasyonu izlendi. Oysa ADAS verdiğimiz kıkırdak defekterinde başarılı onarım sağladık. Bu şekilde elde ettiğimiz sonuçların kliniğe uygulanabilir nitelikte olduğunu düşünmekteyiz.

SVF de az sayıda ADAS olmasının kısmi rejenerasyona neden olduğunu düşünmekteyiz. İnsandan yağ emme(liposuction) gibi az travmatik yöntemle litrelerce yağ dokusu, dolayısıyla milyonlarca ADAS elde edilebilir. Oysa tavşandan elde ettiğimiz kasık yağ dokusu sadece 20-25 gramdır, elde edilen SVF içindeki ADAS miktarı yaklaşık 100.000-200. 000 kadardır. İnsandan daha fazla SVF, dolayısıyla daha fazla ADAS elde edeceğimiz için kıkırdak defektlerini SVF kullanarak onarabileceğimizi umuyoruz. Bunun için daha fazla yağ dokusu olan büyük hayvanlar üzerinde deneysel çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Yukarıda belirtildiği üzere tavşan kasık yağ dokusundan elde edilen SVF içindeki MKH sayısının yetersiz olabileceği düşüncesiyle 2. Grup planlanarak uygulandı. MKH ortamında SVF kültüre edilerek yaklaşık 5. 000. 000 ADAS elde edildi. Onarım dokusunun kalitesinin elastik kıkırdaktan daha düşük olduğu gözlemlense de ADAS verdiğimiz sağ kulak defektleri başarılı bir şekilde onarıldı.

Bu sonuç da yukarıda belirtildiğimiz ADAS hücre sayısının artırılmasının kıkırdak onarımı üzerinde olumlu etki yapacağı tezimizi kanıtlamaktadır. Kök hücrelerden tam olarak ayrılmadan elde edilen SVF ile perikondriumun mikroçevresi kullanılan Grup 1. denek grubu hem maliyet, hem de kliniğe uygulanabilirlik açısından en uygun olan gruptur. Bu grupta makroskobik olarak yeni doku elde edilmiş olmasına ve mikroskobik olarak elastik lifler de içerdiği gösterilmesine rağmen istatistiksel olarak Grup 1. kontrol grubu ile arasında anlamlı fark bulunmadı. Bu sonuç SVF kullanımı açısından olumsuz olarak görülse de SVF ile onardığımız kıkırdak defektlerinde kısmen onarım dokusunun görülmesi ümit vericidir.

Kesitlere kıkırdak defektlerinde kullanılan histolojik derecelendirme yöntemi uygulanarak, oluşmuş dokunun kalitesi belirlendi. Bunun için Ulutaş ve arkadaşları tarafından elastik kıkırdak için geliştirilmiş ve 2005 yılında yayınlanmış histolojik derecelendirme kullanıldı. Bu histolojik derecelendirmede hücre morfolojisi ve çevre dokuyla bağlantı esas alınarak puanlama yapılmaktadır(Tablo1).

Tüm denek ve kontrol gruplarını karşılaştırdığımız zaman en iyi sonuçların Grup 2. denek ve Grup 3. denek ve kontrol gruplarında olduğu gözlemlendi. Grup 1. denek grubunda(sadece SVF kullanılan) sonuçların kontrol grubuna nazaran daha iyi olduğu, fakat 2x2 cm kıkırdak defektini tam onaramadığı görüldü. Bu da kök hücre sayısının, dolayısıyla kullanılan SVF miktarının artırılması ile daha iyi sonuçlar elde edileceğini göstermektedir.

SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz sonuçlar tavşanlarda ADAS hücrelerinin perikondrium etkisiyle kıkırdak defektlerini onarabileceğini kanıtlamaktadır. ADAS hücreleri perikondrium etkisiyle her hangi büyüme faktörü ve skafolda ihtiyaç kalmadan kıkırdağa benzer dokuya dönüşmektedir. Oluşan doku kalitesi elastik kıkırdaktan daha düşüktür. Yeni oluşan dokuda bol miktar elastik liflerin belirlenmesi ADAS uygun çevrede(elastik kıkırdak ve perikondrium) uygun dokuya(elastik kıkırdak) farklılaştığını kanıtlamaktadır. Bu dokunun mekanik özelliklerinin belirlenmesi için yeni araştırmalara ihtiyaç vardır.

Kıkırdak defektlerinin SVF verilen Grup 1. denek kapsamında kısmi, çoğaltılmış ADAS verilen Grup 2. denek kapsamında tam onarımı büyük defektler için yeterli miktarda ADAS hücrelerine ihtiyaç olduğunu göstermektedir. Bunun için ya SVF içindeki ADAS kültüre edilerek çoğaltılmalı, ya da daha fazla yağ dokusu(daha fazla SVF) elde edilmelidir. Çalışmanın yapıldığı tavşan gibi küçük hayvanlarda elde edilebilecek yağ dokusu miktarı az olduğundan küçük miktarda SVF elde edilmektedir. Ayrıca klinik uygulama açısından insanda yağ emme yöntemi ile kolaylıkla minimal donör alan morbiditesi yaratarak çok miktarda SVF elde etmek mümkündür. Bu durum çalışma sonuçlarının kliniğe uygulanması açısından son derece ümit vericidir. Daha fazla yağ dokusu elde etmek için daha iri hayvanlarda araştırma yapılmalıdır.

Grup 3. kapsamında kartilojeneze yönlendirilmiş deneklerle sadece çoğaltılmış ADAS verilen kontroller arasında anlamlı fark olmaması perikondriumun salgıladığı

büyüme faktörlerinin yeterli olduğunu göstermektedir. Kök hücre çalışmalarının en önemli dezavantajı maliyettir. Grup 3. den elde edilen sonuçlar uygun mikroçevrenin kıkırdak farklılaşması açısından yeterli olduğunu ortaya koymuştur. Yeterli miktarda SVF elde edilmesi ve farklılaşma için uygun mikroçevre kullanımı hem yöntemin maliyetini düşürecek, hem de uygulamayı kolaylaştıracak ciddi avantajlardır.

Bu sonuçlar ışığında yöntemin klinik çalışmalarda planlanarak desteklenmesine ihtiyaç vardır.

Kaynaklar:

1. Yiyong W, Yunyu H, Wei H, Yisheng H, et al. A Novel injectable scaffold for cartilage tissue engineering using adipose-derived adult stem cells. *J Orthop Res* 2008(26):27–33
2. Canceddaab R, Dozina B, Giannonia P, Quartob R. Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology* 2003(22): 81–91
3. Fussenegger M, Meinhart J, Höbling W, Kullich W, et al. Stabilized autologous fibrin-chondrocyte constructs for cartilage repair in vivo. *Ann Plast Surg* 2003(51): 493–498
4. Drago JL, Carlson G, McCormick F, Khan-Farooqi H, et al. Healing full-thickness cartilage defects using adipose-derived stem cells. *Tissue Engineering* 2007(13); 1615-1622
5. Erickson GR, Gimble JM, Franklin DM, Rice HE, et al. Chondrogenic potential of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and in vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2002(290); 763–769
6. Koga H, Muneta T, Nagase T, Nimura A, et al. Comparison of mesenchymal tissues-derived stem cells for in vivo chondrogenesis: suitable conditions for cell therapy of cartilage defects in rabbit. *Cell Tissue Res* 2008(333):207–215
7. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 2001(7): 211–228.
8. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, et al; Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002(13(12)): 4279–4295
9. Halvorsen YD, Franklin D, Bond AL, et al. Extracellular matrix mineralization and osteoblast gene expression by human adipose tissue-derived stromal cells. *Tissue Eng* 2001(7(6)): 729–741
10. Huang JI, Zuk PA, Jones NF, et al. Chondrogenic potential of multipotential cells from human adipose tissue. *Plast Reconstr Surg* 2004(13(2)): 585–594.
11. Seo MJ, Suh SY, Bae YC, et al. Differentiation of human adipose stromal cells into hepatic lineage in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2005(328(1)): 258–264
12. Safford KM, Hicok KC, Safford SD, et al. Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002(294(2)): 371–379.

13. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000(287): 1427–1430
14. O’Driscoll SW, Fitzimmons JS, Commisso CN. Role of oxygen tension during cartilage formation by periosteum. *J Orthop Res* 1997(15):682-687
15. Ulutas K, Menderes A, Karaca C, Ozkal S. Repair of cartilage defects with periosteal grafts. *The British Association of Plastic Surgeons* 2005(58):65–72.
16. Sari A, Tuncer S, Ayhan S, Elmas C, et al. What wrapped perichondrial and periosteal grafts offer as regenerators of new tissue. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 2006(17(6));1137-1143
17. Pribitkin EA, Ambro BT, et al. Rabbit ear cartilage regeneration with a small intestinal submucosa graft. *Laryngoscope*, 2004(114(Suppl. 102)):1–20
18. Ozbek S, Kahveci R, Kahveci Z, Filiz G, et al. Effect of lyophilized heterologous collagen on new cartilage formation from perichondrial flaps in rabbits: an experimental study. *Ann Plast Surg.* 2003(50):528–534.
19. Duynstee MLG, Vervoerd-Verhoef H, Vervoerd CDA, et al. The dual role of perichondrium in cartilage wound healing. *Plast Reconstr Surg* 2002(110):1073-107
20. Brent B. Repair and grafting of cartilage and perichondrium. In: McCarthy JG, editor. *Plastic Surgery*. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p. 559—82.
21. Soames RW. Skeletal system. In: Williams PL, Lawrence HB, Berry MM, Collins P, Dyson M, Dussek JE, Ferguson MWJ, editors. *Gray’s Anatomy*. London: Churchill Livingstone; 1995. p. 443—52.
22. Ross MH, Ramrell LJ, Kaye GI. *Histology A Text and Atlas*. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995. p. 132—8.
23. Bloom W, Fawcett DW. *A Textbook of Histology*. Philadelphia: WB Saunders; 1986. p. 188—98.
24. Bunnell BA, Flaat M, Gagliardi C, Patel B, et al. Adipose-derived stem cells: Isolation, expansion and differentiation. *Methods* 2008(45) 115–120
25. Wei Y, Sun X, Wang W, Hu Y. Review. Adipose-derived stem cells and chondrogenesis. *Cytotherapy* 2007(9(8)); 712-716
26. Agneskirchner, J. D. Brucker, P. Burkart, A. Imhoff, A. B. Large osteochondral defects of the femoral condyle: press-fit transplantation of the posterior femoral condyle (MEGA-OATS). *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2002(10); 160–168.
27. Burkart, A. Imhoff, A. B. Therapy of cartilage damage—more current than ever. *Unfallchirurg* 2001(104), 797.
28. Steadman JR, Rodkey WG, Rodrigo JJ. Microfracture: surgical technique and rehabilitation to treat chondral defects. *Clin Orthop Relat Res* 2001(391):362–369.
29. Müller B, Kohn D. Indication for and performance of articular cartilage drilling using the Pridie method. *Orthopade* 1999(28):4–10

30. Elahi MM, Jackson IT, Moreira-Gonzalez A, Yamini D. Nasal augmentation with Surgicel wrapped diced cartilage: A review of 67 consecutive cases. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003(111): 1309
31. Gurley JM, Pilgram T, Perlyn CA, Marsh JL. Long-term outcome of autogenous rib graft nasal reconstruction. *Plast. Reconstr. Surg.* 2001(108): 1895
32. Acarturk S, Gencil E. The spreader-splay graft combination: a treatment approach for the osseocartilaginous vault deformities following rhinoplasty. *Aesthetic Plast Surg* 2003(27):275-280
33. Erol O. The Turkish delight: a pliable graft for rhinoplasty. *Plast Reconstr Surg* 2000(105); 2229-2241
34. Raghavan U, Jones NS, Romo T III. Immediate autogenous cartilage grafts in rhinoplasty after alloplastic implant rejection. *Arch Facial Plast Surg* 2004(6):192-196
35. Velidedeoglu H, Demir Z, Sahin U, Kurtay A, et al. Block and surgicel-wrapped diced solvent-preserved costal cartilage homograft application for nasal augmentation *Plast. Reconstr. Surg.* 2005(115); 2081,
36. Vander Kooy D, Weiss S. Why stem cells? *Science* 2000(287); 1439–1441.
37. Demir Z, Velidedeoglu, H, Sahin, U, Kurtay, A, et al. Preserved costal cartilage homograft application for the treatment of temporomandibular joint ankylosis. *Plast. Reconstr. Surg.* 2001(108): 44,
38. Clark JM, Cook TA. Immediate reconstruction of extruded alloplastic nasal implants with irradiated homograft costal cartilage. *Laryngoscope* 2002(112): 968
39. Welling DB, Maves MD, Schuller DE, Bardach J. Irradiated homologous cartilage grafts: Long-term results. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 1988(114): 291
40. Bouwmeester SJM, Beckers JMH, Kuijer R, et al. Long-term results of rib perichondrial grafts for repair of cartilage defects in the human knee. *Int Orthop* 1997(21):313-317
41. Upton J, Sohn SA, Glowacki J. Neo-cartilage derived from transplanted perichondrium: what is it? *Plast Reconstr Surg* 1981(68):166-174
42. Podskubka A, Povysil C, Kubes R, Sprindrich J, et al. Treatment of deep cartilage defects of the knee with autologous chondrocyte transplantation on a hyaluronic acid ester scaffolds (Hyalograft C). *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* 2006(73):251–263.
43. Baums MH, Heidrich G, SchultzW, Steckel H, et al. Autologous chondrocyte transplantation for treating cartilage defects of the talus. *J Bone Joint Surg Am* 2006(88):303–308.
44. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, et al. Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N. Engl. J. Med.* 1994(331); 889–895.
45. Grande DA, Breitbart AS, Mason J, Paulino C, et al. Cartilage tissue engineering: current limitations and solutions. *Clin Orthop Relat Res* 1999(367); Suppl, 176
46. Dozin B, Malpeli M, Camardella L, Cancedda R, et al. Response of young, aged and osteoarthritic human articular chondrocytes to inflammatory cytokines: Molecular and cellular aspects. *Matrix Biol* 2002(21):449–459.
47. Nixon AJ, Lust G, Vernier-Singer M. Isolation, propagation, and cryopreservation of equine articular chondrocytes. *Am J Vet Res* 1992(53):2364–2370

48. Lee CR, Grodzinsky AJ, Hsu HP, Martin SD, et al. Effects of harvest and selected cartilage repair procedures on the physical and biochemical properties of articular cartilage in the canine knee. *J Orthop Res* 2000(18):790–799.
49. Daar AS, Greenwood HL. A proposed definition of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2007(1): 179–184.
50. Bajada S, Mazakova I, Richardson JB, Ashammakhi N. Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2008(2): 169–183
51. Barry FP, Murphy JM. Review Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2004(36); 568–584
52. Lin Y, Luo E, Chen X, Liu L, et al. Molecular and cellular characterization during chondrogenic differentiation of adipose tissue-derived stromal cells in vitro and cartilage formation in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* 2005(9(4)); 929-939
53. Galli R, Borello U, Gritti A, et al. Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurol* 2000(3): 986–991
54. Zhao LR, Duran WM, Reyes M, et al. Human bone marrow stem cells exhibit neural phenotypes and ameliorate neurological deficits after grafting into the ischaemic brain of rats. *Exp Neurol* 2002(174): 11–20.
55. Mezek E, Key S, Vogelsang G, et al. Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000(100): 1364–1369.
56. Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng* 2006(12(5)): 1137–1142.
57. Griffith CK, Miller C, Sainson RC, et al. Diffusion limits of an in vitro thick prevascularized tissue. *Tissue Eng* 2005(11(1–2)): 257–266.
58. Feng G, Wan Y, Balian G, Laurencin GT, et al. Adenovirus-mediated expression of growth and differentiation factor-5 promotes chondrogenesis of adipose stem cells. *Growth Factors*, 2008(26(3)): 132–142
59. Thompson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 1998(282): 1145–1147.
60. Lee EH, Hui JHP. The potential of stem cells in orthopaedic surgery. *J Bone Jt Surg* 2006(88(7)): 841–853
61. Nathan S, Das De S, Thambyah A, Fen C, et al. Cell-based therapy in the repair of osteochondral defects: a novel use for adipose tissue *Tissue Eng* 2003(9(4)); 733-744
62. Cowan C, Shi YY, Aalami OO, Chou YF, et al. Adipose derived adult stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *Nature Biotechnology* 2004(22(5)); 560-567
63. Soria B, Roche E, Berna G, et al. Insulin-secreting cell derived from embryonic stem cells normalize glycemia in streptozotocin-induced diabetic mice. *Diabetes* 2000(49(2)): 157–162
64. Hendricks WA, Pak ES, Owensby JP, et al. Predifferentiated embryonic stem cells prevent chronic pain behaviors and restore sensory function following spinal cord injury in mice. *Mol Med* 2006(12(1–3)): 34–46.

65. Duan Y, Catana A, Meng Y, et al. Differentiation and enrichment of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cells* 2007(25(12)): 3058–3068.
66. Kofidis T, de Bruin JL, Hoyt G, et al. Myocardial restoration with embryonic stem cell bioartificial tissue transplantation. *J Heart Lung Transpl* 2005(24(6)): 737–744.
67. Becker AJ, McCulloch EA, Till JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature* 1963(197): 452–454.
68. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, et al. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968(6(2)): 230–247
69. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999(284(5411)): 143–147.
70. Mizuno S, Glowacki J. Three-dimensional composite of mineralized bone powder and collagen for in vitro analysis of chondroinduction of human dermal fibroblasts. *Biomaterials* 1996(17); 1819–1825
71. Doherty MJ, Ashton BA, Walsh S, Beresford JN, et al. Vascular pericytes express osteogenic potential in vitro and in vivo. *J. Bone Miner. Res.* 1998(13); 828–838
72. Bosch P, Musgrave DS, Lee JY, et al. Osteoprogenitor cells within skeletal muscle. *J. Orthop. Res.* 2000(18); 933–944
73. Levy MM, Joyner CJ, Viridi AS, et al. Osteoprogenitor cells of mature humanketelal muscle tissue: an in vitro study. *Bone* 2001(29); 317–322
74. Huang JI, Beanes SR, Zhu M, Lorenz HP, et al. Rat extramedullary adipose tissue as a source of osteochondrogenic progenitor cells. *Plast. Reconstr. Surg.* 2002(109); 1033–1041 discussion1042-3
75. De Coppi P, Bartsch G Jr, Siddiqui MM, et al. Isolation of amniotic stem cell lines with potential for therapy. *Nat Biotechnol* 2007(25(1)): 100–106
76. Wang HS, Hung SC, Peng ST, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* 2004(22(7)): 1330–1337
77. Gage FH. Mammalian neural stem cells. *Science* 2000(287(5457)): 1433–1438.
78. Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. *Science* 2000(287(5460)): 2032–2036
79. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early Mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981(78): 7634–7638.
80. Watt FM, Hogan BL. Out of Eden: stem cells and their niches. *Science* 2000(287): 1427–1430
81. Alam T, Sollinger HW. Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation* 2002(74(12)): 1781–1787
82. Wurmser AE, Gage FH. Stem cells: cell fusion causes confusion. *Nature* 2002(416(6880)): 485–487

83. Ying QL, Nichols J, Evans EP, et al. Changing potency by spontaneous fusion. *Nature* 2002(416(6880)): 545–548.
84. Terada N, Hamazaki T, Oka M, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002(416(6880)): 542–545.
85. Alvarez-Dolado M, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, et al. Fusion of bone marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature* 2003(425(6961)): 968–973.
86. Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002(91(12)): 1092–1102.
87. Tavassoli M, Friedenstein A. Hemopoietic stromal microenvironment. *Am J Hematol* 1983(15(2)): 195–203.
88. Caplan AI. Review: mesenchymal stem cells: cell-based reconstructive therapy in orthopedics. *Tissue Eng* 2005(11(7–8)): 1198–1211
89. Ouyang HW, Goh JC, Lee EH. Viability of allogeneic bone marrow stromal cells following local delivery into patellar tendon in rabbit model. *Cell Transpl* 2004(13(6)): 649–657
90. Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, et al. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001(19(3)): 180–192
91. Beresford JN, Bennett JH, Devlin C, et al. Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *J Cell Sci* 1992(102(2)): 341–351
92. Altman GH, Horan RL, Martin I, et al. Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB J* 2002(16(2)): 270–272.
93. Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, et al. In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Exp Cell Res* 1998(238(1)): 265–272
94. Wakitani S, Saito T, Caplan AI. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5- azacytidine. *Muscle Nerve* 1995(18(12)): 1417–1426
95. Toma JG, McKenzie IA, Bagli D, et al. Isolation and characterization of multipotent skin-derived precursors from human skin. *Stem Cells* 2005(23(6)): 727–737
96. Buranasinsup S, Sila-Asna M, Bunyaratvej N, et al. In vitro osteogenesis from human skin-derived precursor cells. *Dev Growth Differ* 2006(48(4)): 263–269
97. Kogler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004(200(2)): 123–135
98. Rodriguez AM, Elabd C, Amri EZ, Ailhaud G, et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie* 2005(87):125–128.
99. Strem BM, Hicok KC, Zhu M, et al. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells. *Keio J. Med.* 2005(54): 132
100. Wolter TP, Von Heimburg D, Stoffels I, et al. Cryopreservation of mature human adipocytes: In vitro measurement of viability. *Ann. Plast. Surg.* 2005(55): 408
101. Justesen, J. Pedersen, S. B. Stenderup, K. et al. Subcutaneous adipocytes can differentiate into bone-forming cells in vitro and in vivo. *Tissue Eng.* 2004(10): 381