



Hiperbarik oksijen tedavisinin sıçanlarda kemik prefabrikasyonu üzerine etkisi

Celalettin SEVER,* Fatih UYGUR,* Yalçın KÜLAHÇI,* Gamze TORUN KÖSE,# Muammer URHAN,†
Zafer KÜÇÜKODACI,§ Günalp UZUN,** Osman İPÇİOĞLU,‡ Tuncer ÇAYCI**

*GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı ve Yanık Ünitesi;

†Yeditepe Üniversitesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü;

†GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Nükleer Tıp Anabilim Dalı;

§GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Patoloji Anabilim Dalı;

**GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Suatlı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı;

‡GATA Haydarpaşa Eğitim Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı;

††GATA, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Amaç: Bu deneysel çalışmanın amacı hidroksiapatit (HA) seramik bloklarına mezenkimal kök hücre, vasküler pedikül ve hiperbarik oksijen tedavisi (HBOT) uygulanarak, sıçanlarda vaskülarize kemik prefabrikasyonunun gerçekleştirilmesidir.

Çalışma planı: Çalışmada 45 adet erkek Sprague-Dawley sıçan, her birinde 15 sıçan olan üç gruba ayrıldı. Tüm gruplarda HA seramikleri yüzeyel inferior epigastrik arter ve ven ile pedikülize edildi. Grup 2’de HA seramiklerinin içine mezenkimal kök hücre implantasyonu yapıldı. Grup 3’te ise hem mezenkimal kök hücre hem de HBOT uygulandı. Yeni kemik oluşumu ve neovaskülarizasyon varlığı ve derecesi radyolojik, mikroanjiyografik, sintigrafik, biyokimyasal ve histomorfometrik yöntemler ile değerlendirildi.

Sonuçlar: Neovaskülarizasyon ve yeni kemik oluşumu en fazla, mezenkimal kök hücre implantasyonu yapılan ve takiben HBOT uygulanan Grup 3’te görüldü.

Çıkarımlar: HBOT, neovaskülarizasyon ve yeni kemik oluşumunu artırır, bu nedenle vaskülarize kemik greftlerinin optimal ve hızlı kemik prefabrikasyonunu sağlayabilir.

Anahtar sözcükler: Hidroksiapatit seramik; hiperbarik oksijen tedavisi; kemik greftleme; sıçan.

Kemik defektleri genellikle şiddetli travmalar sonucu ortaya çıkarken enfeksiyon, tümör ya da konjenital nedenlere bağlı olarak da meydana gelebilmektedir. Kemik defektlerinin tedavisinde günümüzde sıklıkla otojen kemik greftleri ve vaskülarize kemik flepleri kullanılmaktadır.^[1-3]

Kemik defektlerinin onarımında otogreftler etkin bir çözüm olmakla beraber otogreftin elde edilmesi

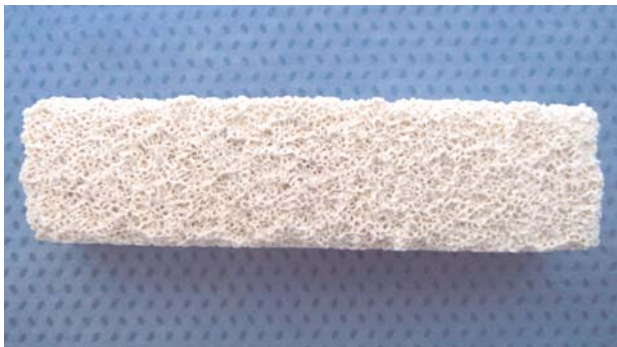
ek morbidite ve komplikasyonlara neden olmaktadır.^[4] Allogreftler ise enfeksiyon hastalıklarını taşıma riskine sahiptir ve bunu önlemek için uygulanan sterilizasyon işlemleri allogreftlerin biyolojik özelliklerini olumsuz yönde etkilemektedir.^[5,6] Bu nedenle günümüzde otogreftlere ve allogreftlere alternatif olarak demineralize kemik matriksleri, biyoaktif camlar ve seramikler gibi ek morbiditeye neden olmayan biyomalzemeler üretilmiştir.^[1,2]

Üç boyutlu kemik dokusunun yapısının sağlanması için osteoblastların üzerine tutunabilecekleri ve proliferere olabilecekleri bir iskelet sistemi yani hücre taşıyıcısı gereklidir. Bu iskelet sistemleri içinde kemik prefabrikasyonu için en popüler olan sistem hidroksiapatit (HA) seramikleridir. HA seramiklerinin biyoyumlu olmaları, kök hücrelerin yapışmasına ve proliferere olmasına olanak sağlamaları ve vasküler yapıların içeriye doğru ilerlemesini sağlayan poröz yapı içermeleri çok önemlidir. HA seramiklerinde porözitenin %90'dan fazla olması ve bu gözeneklerin birbiriyle temas halinde olması, HA seramiklerinin kemik prefabrikasyonu için en çok tercih edilen biyomalzeme olmasını sağlamaktadır.^[7-10] HA bloğundaki porların genişliği 100-500 µm arasında değişmektedir.^[11,12]

Literatürde kemik prefabrikasyonu ve prelaminasyonu ile ilgili birçok deneysel ve klinik çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda kemik prefabrikasyonu için intrinsik faktör olarak büyüme faktörleri ve sitokinler kullanılmıştır.^[13,14] Ekstrensik bir faktör olan hiperbarik oksijen tedavisinin etkilerinin incelendiği deneysel bir çalışma ise mevcut değildir. Bu çalışmanın amacı, hiperbarik oksijen tedavisinin (HBOT) kemik prefabrikasyonu üzerindeki etkilerini incelemektir.

Gereç ve yöntem

Bu çalışmanın birinci aşamasında biyoyumlu ve biyoşeydeğer bir biyomalzeme olan HA seramik bloklarına şekil verilerek (Pro Osteon 500 Porous Bone Graft Substitute, Interpore Cross International, Irvine, CA, ABD) (Şekil 1) 0.8 cm uzunluğunda ve 0.6 cm genişliğinde 45 adet silindirik blok elde edildi

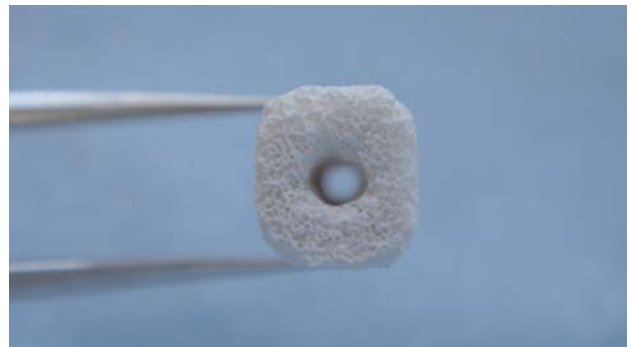


Şekil 1. Hidroksiapatit seramik bloğu.

ve bu blokların içinde 2 mm çapında bir tünel oluşturuldu (Şekil 2).

Çalışmanın ikinci aşamasında ise sıçanların her iki femurundan aspire edilen mezenkimal kök hücreler, 37°C'de 100 µgr/mL penisilin ve 25 µgr/mL gentamisin bulunan ortamda kültüre edildi. Takiben 14. günde kültüre edilmiş olan mezenkimal kök hücreler tripsinojen ile ayrıştırıldı ve mililitrede 3×10^6 kök hücre olacak şekilde resüspanse edildi.^[15]

Çalışmanın üçüncü aşamasında ise bloklar halinde hazırlanmış olan her bir HA bloğunun içine kültüre edilmiş olan mezenkimal kök hücre (5×10^6 hücre/mL) ekimi yapıldı. Mezenkimal kök hücrelerin osteojenik farklılaşması için gerekli olan solüsyon [deksametazon (0.1 µm), sodyum beta gliserofosfat (10 mM), vitamin C fosfat (80 µgr/mL)] hazırlandı.^[16,17] HA blokları bu solüsyon içinde 2 gün bekletildi. Takiben, her birinde 15 adet Sprague-Dawley sıçan olacak şekilde rastgele üç denek grubu oluşturuldu. Tüm gruplarda, HA seramikleri, tünellerinden yüzeyel inferior epigastrik arter ve ven geçirilerek pedikülize edildi. Grup 2'de hidroksiapatit seramiklerinin içine mezenkimal kök hücre implantasyonu yapıldı. Grup 3'te HA seramiklerine mezenkimal kök hücre implantasyonu yapıldıktan sonra, deneysel çalışmalar için tasarlanmış hiperbarik oksijen tankı ile deneklere HBOT uygulaması gerçekleştirildi (Şekil 3). Bu gruptaki sıçanlara operasyon gününden itibaren 2.5 ATA'da (1 ATA=1 Atmosfer absolut=760 mmHg) %100 oksijen, 10 dakikalık iki hava molası ile 90 dakikalık seanslar uygulandı. Bu tedavi protokolü, operasyon günü ve postoperatif 2 gün boyunca günde dört seans olarak uygulandı ve daha sonra günde iki seans halinde 7 gün boyunca uygulandı.



Şekil 2. Hidroksiapatit seramik bloğunda oluşturulan 2 mm çapındaki tünel.



Şekil 3. Hiperbarik oksijen tankı.



Şekil 4. Yüzeysel epigastrik arter ve ven.

Cerrahi işlem

Cerrahi girişim aşamasında sıçanların yüzeysel inferior epigastrik arter ve venine ulaşmak için insizyon yapılacak olan alt ekstremité ön yüzündeki tüyler tıraş makinesi ile kesilerek cerrahi alan hazırlandı. Sol uyluk ön yüzünden yapılan transvers insizyonla eksplorasyon sağlanarak künt ve keskin diseksiyonlarla yüzeysel inferior epigastrik arter ve vene ulaşıldı (Şekil 4). Yüzeysel epigastrik arter ve ven HA bloğunun içindeki tünelden geçirildi (Şekil 5). Takiben pedikülize edilmiş olan HA blokları oluşturulan subkutanöz poş içine yerleştirildi.

Cerrahi işlemin ikinci aşaması ise tüm gruplarda 2 hafta sonra gerçekleştirildi. İnsizyon hattı yeniden açıldıktan sonra HA bloklarına ulaşıldı ve tüm gruplardaki HA bloklarının etrafı, çevre dokudan vasküler invazyonun önlenmesi için silikon ile sarıldı. İnsizyon hattı sütüre edildikten sonra pansuman yapılarak cerrahi işlem sonlandırıldı.

Değerlendirme yöntemleri

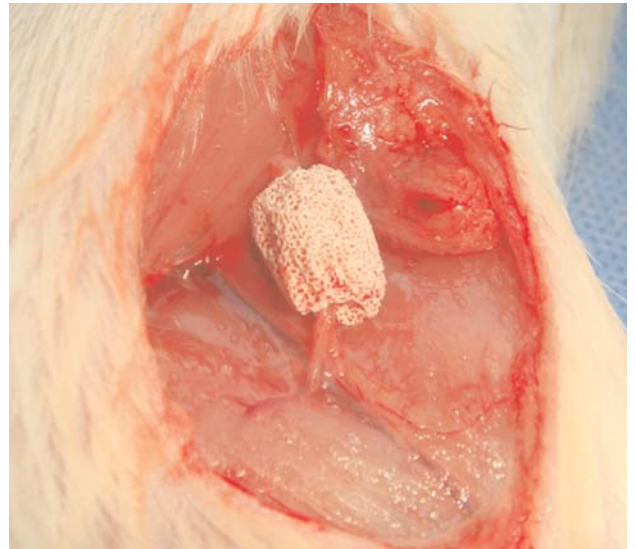
Mikroanjiyografi

Tüm gruplardaki neovaskülarizasyonun değerlendirilmesi için 30. günde her gruptan beş sıçana mikroanjiyografi yapıldı. Oblik sol servikal insizyon ile girilerek, deneklerin sol karotid arterleri açığa çıkarıldı. Distal segmenti bağlanarak, proksimali 20 G epidural kateter ile kanüle edildi ve 1 mL (5000 IU) heparin (Nevparin 5000 IU/mL, Mustafa Nevzat İlaç Sanayii A.Ş., İstanbul, Türkiye) enjekte edildi. Laktatlı ringer (75 mL), baryum sülfat (20 mL) ve sıgır

jelatini (%5) ile hazırlanan solüsyon 36°C'ye kadar ısıtılarak 15 dakika sonra düşük basınç tekniği ile kateterden infüze edildi. İnfüzyonun tamamlanmasından sonra, sıçanlar +4°C'de buzdolabında bekletildi. Oniki saat sonra mamografi cihazında 23 KV, 12 mAS dozunda radyografiler çekildi.

Sintigrafi

Tüm gruplardaki HA bloklarında neovaskülarizasyon ve osteoblastik aktivitenin değerlendirilmesi için kemik sintigrafisi uygulandı. Radyofarmasötik ajan olarak Teknesyum (Tc) 99m ile işaretli metilen



Şekil 5. Yüzeysel epigastrik arter ve venin hidroksiapatit bloğunun içindeki tünelden geçirilmesi.

difosfonat (^{99m}Tc MDP) kullanıldı. Tüm gruplara 30. günde 2 mikroküri ^{99m}Tc MDP sıçanların sol juguler veninden infüze edildi ve takiben 2. saatte spot görüntü alındı. Statik görüntüler 256x256 matriks büyütme ile 5 dakika süreyle çekildi. HA bloklarının blastik aktivitesi ilgi alanı çizilerek ölçüldü ve elde edilen değerler simetrik sağ uyluk bölgesinden elde edilen sayım değerleri ile karşılaştırıldı.

Biyokimyasal analiz

Tüm gruplardaki HA bloklarında 45. günde osteokalsin ve alkalen fosfataz seviyeleri ölçüldü. Alkalen fosfataz aktivitesi p-nitrofenil fosfat kullanılarak, osteokalsin aktivitesi ise Sephadex G-25 kolon (NAP-25 kolon, Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, İsveç) ve %10 formik asit kullanılarak ölçüldü.^[16]

Histolojik inceleme

Tüm gruplardan 45. günde doku örneklerin alınmasını takiben, doku örnekleri %10'luk formalin ile +4°C'de 24 saat bekletilerek fikse edildi. Takiben distile su ile doku örnekleri yıkandı ve nitrik asitte 72 saat bekletilerek dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işleminden sonra alınan kemik örnekleri ayrı ayrı parafin bloğa gömülerek 5 mikrometrelik kesitler alındı. Patolojik kesitler hematoksilin-eozin (H-E) ile boyanarak ışık mikroskobu altında x10 büyütme ile incelendi.

İstatistik değerlendirme

Çalışma gruplarının karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tüm değerler SPSS 10.0

(SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılarak elde edildi. Denek sayısının her grupta sınırlı olması ve hata riskinin mevcut olması nedeniyle, belirlenen ölçüm sonuçları için her grupta ortalama, standart sapma, çarpıklık ve basıklık değerleri hesaplandı. Böylece sınırlı denek sayısı ile yapılan Mann-Whitney U testinin güvenilirliği kontrol edildi.

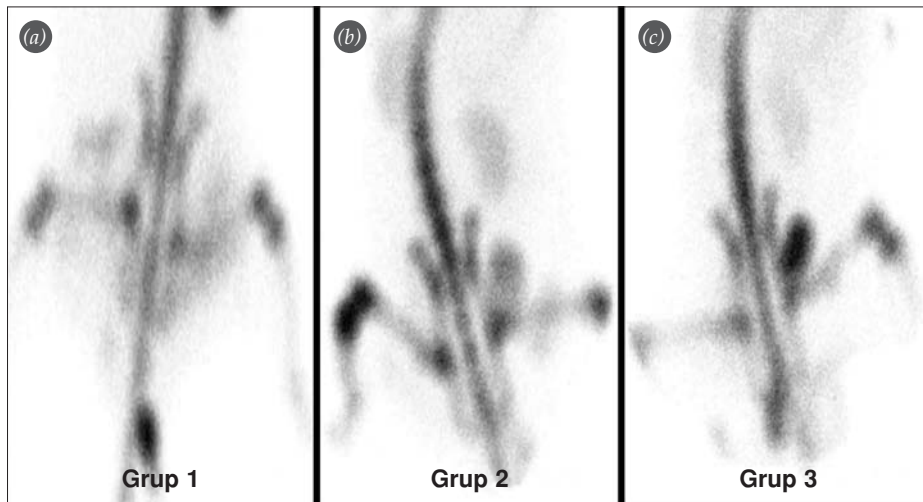
Sonuçlar

Mikroanjiyografi

Yapılan mikroanjiyografi sonucunda tüm gruplardaki neovaskülarizasyonun derecesi değerlendirildi. Grup 1'de bulunan HA seramiklerinde neovaskülarizasyon izlenmezken Grup 2'ye ait HA seramiklerinin sadece merkezinde neovaskülarizasyon olduğu görüldü. Grup 3'e ait HA seramiklerinde ise, HA seramiğinin merkezinden başlayıp seramiğin periferine kadar uzanan neovaskülarizasyonun mevcut olduğu izlendi. Sonuç olarak en fazla neovaskülarizasyonun Grup 3'te gerçekleştiği görüldü (Şekil 6).

Sintigrafi

Kemik sintigrafisinin kantitatif değerlendirilmesinde her gruptaki HA ile simetriği olan yumuşak dokudaki radyoaktivite tutulumu birbiriyle oranlandı ve üç grubun ortalama değerleri alındı. Sintigrafi sonucunda mezenkimal kök hücre ekimi yapılmayan Grup 1'de radyoaktivite saptanmazken, Grup 2 ve 3'te radyoaktivite saptandı. Grup 3'teki radyoaktivite tutulumunun Grup 1 ve 2'ye göre anlamlı olarak yüksek olduğu bulundu ($p<0.05$) (Tablo 1).



Şekil 6. (a-c) Mikroanjiyografide neovaskülarizasyonun derecesi.

Biyokimyasal analiz

HA bloklarında ortalama osteokalsin ve alkalin fosfataz seviyeleri Grup 3'te Grup 1 ve 2'ye göre anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$) (Tablo 2).

Histolojik değerlendirme

Histolojik değerlendirme sonucunda en fazla kemik formasyonunun ve neovaskülarizasyonunun Grup 3'te olduğu görüldü (Şekil 7).

Tartışma

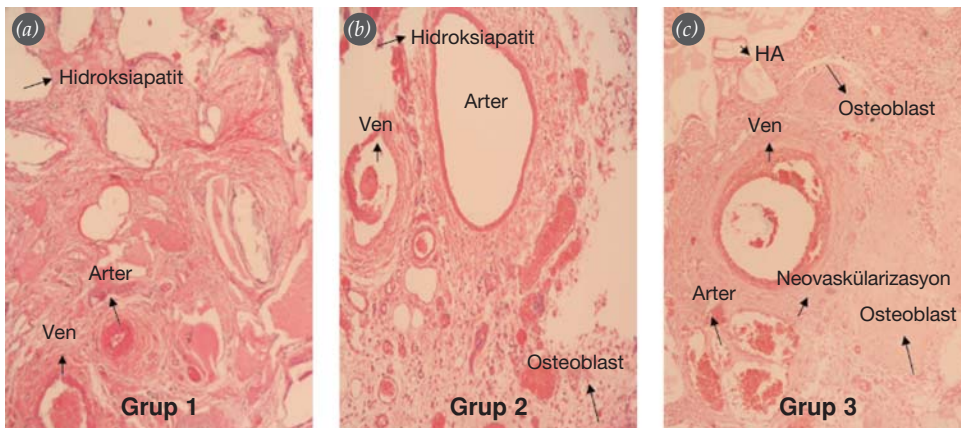
Doku mühendisliği, hasara uğramış dokuların onarılması veya değiştirilmesi amacıyla yeni biyolojik eşdeğerlerin geliştirilmesini sağlayan bir biyoteknoloji alanıdır. Doku mühendisliği konusunda bugüne kadar yapılan çalışmalar gelecek için umut vermektedir. Özellikle organ ya da doku transplantasyonunun tek tedavi seçeneğini oluşturduğu hastalıklarda uygun donörün ya da donör alanının temin edilmesi tedavideki en büyük zorluk olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle doku mühendisliğinde yapılmakta olan doku prefabrikasyonları son yıllarda büyük ilgi çekmektedir.

Doku mühendisliğindeki temel yapı kök hücrelerdir. Kök hücreler, bölünerek kendini yenileyen, özelleşmiş görev yapan dokuları oluşturan ve farklılaşma özelliği taşıyan hücrelerdir. Kemik iliği, tüm kan hücrelerinin gelişimi için kök hücre görevi gören hemopoetik kök hücrelerin yanı sıra, in vivo ve in vitro olarak kas, yağ, kıkırdak, kemik dokuları gibi bağ dokuları oluşturma yeteneği olan ve kemik iliği stromasında bulunan mezenkimal kök hücreleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Radyoaktivite tutulum oranı (pbs)	100	4300	22400
Grup 1 ile Grup 2; Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$); pbs: piksel başına sayım.			

	Grup 1	Grup 2	Grup 3
Alkalin fosfataz (U/L)	0	600	950
Osteokalsin (Ng/mL)	0	34	42
Grup 1 ile Grup 2; Grup 1 ile Grup 3 ve Grup 2 ile Grup 3 arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$).			

içermektedir. Mezenkimal kök hücrelerin ana kaynağı kemik iliği olmakla beraber birçok dokudan izole edilebileceği bilinmektedir. Bu dokuların başlıcaları kas, kemik, kıkırdak, yağ, karaciğer, kordon kanı, periferik kan ve fetal kemik iliğidir. Erişkin kök hücrelerin fizyolojik işlevi doku hemostazını sağlamak ve doku hasarından sonra rejenerasyonu gerçekleştirmektir. Bu hücrelerin buldukları doku ve organlarda küçük hasarların giderilmesinde rol oynadığı ve in vitro koşullarda adipojenik, kondroje-



Şekil 7. (a-c) Kemik oluşumunun ve neovaskülarizasyonun histopatolojik görünümü (H-E x10).

nik, miyojenik ve osteojenik hücreler gibi birçok değişik hücre tiplerine dönüşebileceği gösterilmiştir. Ancak farklı tipteki kök hücrelerin ve progenitör hücrelerin değişimlerinin detayları hala tam olarak bilinmemektedir.^[17-20]

Günümüzde araştırmacılar organ naklinin yerini alabilecek ve organ nakli olanağı olmayan hastalar için kullanılacak kök hücre tedavisi ile ilgili çalışmalar yapmaktadırlar. Yapılan bu çalışmalar sonucunda kök hücrelerinin uygun şartlarda kemik ve sinir dokusu hasarı bulunan alanlara implante edildiğinde, bu hasar alanlarını onarabileceği gösterilmiştir. Ayrıca, deney hayvanlarından elde edilen kemik iliği hücrelerinin in vitro ortamda uygun şartlar sağlandığında proliferasyon ve farklılaşma gösterdiği de ispatlanmıştır.^[21-25] Günümüzde uygulanan birçok cerrahi yöntemle rağmen kemik defektlerinin onarımı bir sorun olarak devam etmektedir. Bu yüzden kemik defektlerinin tedavisinde kültür osteoblast hücrelerinin kullanımı giderek artmaktadır.

Hiperbarik oksijenizasyonun iki temel etkisi vardır. Bunların ilki vücut içindeki gazlar üzerine olan mekanik etkisi, diğeri ise kanda parsiyel oksijen basıncını artırmasıdır. Ancak, HBOT'nin etkilerinden biri de ilk 72 saat süreyle bir vazokonstriksiyona neden olmasıdır.^[26-28] Ancak takip eden saatlerde bu etkiye tepki olarak meydana gelen neovaskülarizasyonun hızı ve miktarı artmaktadır. HBOT uygulaması altında ise vücudun gereksinimlerini tek başına karşılayabilecek miktardaki oksijenin plazmada çözünmesini sağlamak mümkündür. HBOT uygulamasını takiben plazmadaki çözünmüş oksijen oranı %6'yı geçtiğinde oksihemoglobin arteriyel sistemden venöz sisteme değişime uğramadan geçmektedir. Bu sayede plazma normal kanlanan dokuların ihtiyaçlarını fazlasıyla karşıladığı gibi kanlanması azalmış dokular için de yeterli oksijen taşıma kapasitesine ulaşmış olmaktadır.

Alkalen fosfataz aktivitesi ve osteokalsin seviyeleri kemik prefabrikasyonunun değerlendirilmesini sağlayan en önemli iki biyokimyasal komponenttir.^[29] Alkalen fosfataz osteoblastın hücre membranında yer almaktadır ve osteoblastın direkt aktivitesiyle korelasyon göstermektedir. Osteokalsin osteoblastlar tarafından sentez edilmektedir ve kemik dokusunun varlığını gösteren en önemli komponenttir. Çalışma-

mızda en yüksek alkalen fosfataz ve osteokalsin seviyesinin HBOT uygulanan ve pedikülize edilmiş olan denek grubunda olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda kök hücrelerin implante edileceği taşıyıcı iskelet olarak HA seramiklerini seçmemizin nedeni HA seramiklerinin biyouyumlu olması, osteokondüktif olması ve klinik olarak kabul edilebilir bir sürede polimerize olmasıdır. HA seramiklerinin içine implante edilen kök hücrelerinin canlı kalabilmesi ve proliferere olabilmesi için de hücre taşıyıcısı iskeletin vaskülarizasyonu gereklidir. Bu nedenle yeni vasküler yapıların oluşması ve taşıyıcı iskeletin iç tarafına kadar bu vasküler yapıların ulaşabilmesi için vasküler pedikül olarak inferior yüzeyel epigastrik arter ve ven tercih edilmiştir.

Kemik prefabrikasyonunda karşılaşılan sorunlardan en önemlisi, vaskülarizasyonun hem geç dönemde oluşması hem de yetersiz olmasıdır. Biz bu çalışmamızda farklı dokularda neovaskülarizasyon potansiyeli gösterilmiş olan HBOT'nin kemik prefabrikasyonu konusunda ne derece etkili olacağını araştırdık. Mekanik etkisi ve oksijen çözünürlüğünü artırıcı etkisine ek olarak HBOT, kapiller proliferasyonun artırılması ve hızlandırılması gibi ikincil etkilere de sahiptir. Bu deneysel çalışmada HBOT'nin kemik prefabrikasyonunda olumlu etkisi olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, HA seramiklerine mezenkimal kök hücre implantasyonu ve seramiklerin pedikülize edilmesi ile oluşturulan kemik prefabrikasyonunda, HBOT erken ve artmış vaskülarite sağlamaktadır. Bu nedenle, HBOT kemik prefabrikasyonu uygulamalarında olumlu bir uyarıcı faktör olarak tedavi protokolüne eklenebilir.

Kaynaklar

1. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. Clin Orthop Relat Res 1999;(360):71-86.
2. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. J Am Acad Orthop Surg 1995;3:1-8.
3. Horch RE, Kopp J, Kneser U, Beier J, Bach AD. Tissue engineering of cultured skin substitutes. J Cell Mol Med 2005;9:592-608.
4. Banwart JC, Asher MA, Hassanein RS. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. Spine (Phila Pa 1976) 1995;20:1055-60.

5. Weiland AJ, Moore JR, Daniel RK. Vascularized bone autografts. Experience with 41 cases. *Clin Orthop Relat Res* 1983;(174):87-95.
6. Moore JB, Mazur JM, Zehr D, Davis PK, Zook EG. A biomechanical comparison of vascularized and conventional autogenous bone grafts. *Plast Reconstr Surg* 1984;73:382-6.
7. Bercovy M, Goutallier D, Voisin MC, Geiger D, Blankaert D, Gaudichet A, et al. Carbon-PGLA prostheses for ligament reconstruction. Experimental basis and short-term results in man. *Clin Orthop Relat Res* 1985;(196):159-68.
8. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
9. Kaigler D, Wang Z, Horger K, Mooney DJ, Krebsbach PH. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 2006;21:735-44.
10. Tamai N, Myoui A, Tomita T, Nakase T, Tanaka J, Ochi T, et al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnected porous structure exhibit superior osteoconduction in vivo. *J Biomed Mater Res* 2002;59:110-7.
11. Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Shors EC, Caplan AI. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res* 1990;24:1563-70.
12. Tsuruga E, Takita H, Itoh H, Wakisaka Y, Kuboki Y. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. *J Biochem* 1997;121:317-24.
13. Mundy GR. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop Relat Res* 1996;(324):24-8.
14. Terheyden H, Warnke P, Dunsche A, Jepsen S, Brenner W, Palmie S, et al. Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30:469-78.
15. Zhao Z, Yang D, Ma X, Zhao H, Nie C, Si Z. Successful repair of a critical-sized bone defect in the rat femur with a newly developed external fixator. *Tohoku J Exp Med* 2009;219:115-20.
16. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, Abe E, Takahashi N, Ikeda T, et al. Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 1994;127:1755-66.
17. Shimizu K, Ito A, Honda H. Mag-seeding of rat bone marrow stromal cells into porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *J Biosci Bioeng* 2007;104:171-7.
18. Sata M, Tanaka K, Nagai R. Circulating osteoblast-lineage cells. *N Engl J Med* 2005;353:737-8.
19. Roufosse CA, Direkze NC, Otto WR, Wright NA. Circulating mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004;36:585-97.
20. Otsuru S, Tamai K, Yamazaki T, Yoshikawa H, Kaneda Y. Bone marrow-derived osteoblast progenitor cells in circulating blood contribute to ectopic bone formation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;354:453-8.
21. Mareddy S, Broadbent J, Crawford R, Xiao Y. Proteomic profiling of distinct clonal populations of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2009;106:776-86.
22. Zhu Y, Liu T, Song K, Fan X, Ma X, Cui Z. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. *Cell Biochem Funct* 2008;26:664-75.
23. Kassem M, Abdallah BM, Saeed H. Osteoblastic cells: differentiation and trans-differentiation. *Arch Biochem Biophys* 2008;473:183-7.
24. Locke M, Windsor J, Dunbar PR. Human adipose-derived stem cells: isolation, characterization and applications in surgery. *ANZ J Surg* 2009;79:235-44.
25. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H, et al. Cell-assisted lipotransfer for facial lipoatrophy: efficacy of clinical use of adipose-derived stem cells. *Dermatol Surg* 2008;34:1178-85.
26. Leach RM, Rees PJ, Wilmshurst P. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ* 1998;317:1140-3.
27. Fontaine JA. Emploi chirurgical de l'air comprime. [Article in French] *Union Med* 1879;28:445.
28. Corning JL. The use of compressed air in conjunction with medicinal solutions in the treatment of nervous and mental affections, being a new system of cerebrospinal therapeutics. *Med Record* 1891;40:225.
29. Mark MP, Butler WT, Prince CW, Finkelman RD, Ruch JV. Developmental expression of 44-kDa bone phosphoprotein (osteopontin) and bone gamma-carboxyglutamic acid (Gla)-containing protein (osteocalcin) in calcifying tissues of rat. *Differentiation* 1988;37:123-36.