

T. C.  
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DİŞ HEKİMLİĞİ BİLİMLERİ MERKEZİ  
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DOMUZLARDA OLUŞTURULAN KEMİK DEFEKTLERİNDE  
TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN İLE TRİKALSİYUM  
FOSFATIN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
HİSTOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Dinçer YILMAZ**  
Diş Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü  
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Doktora Programı  
Doktora Tezi

**ANKARA**  
**2009**



T. C.  
GENELKURMAY BAŐKANLIĐI  
GÜLHANE ASKERİ TIP AKADEMİSİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
DİŞ HEKİMLİĞİ BİLİMLERİ MERKEZİ  
AĞIZ, DİŞ, ÇENE HASTALIKLARI VE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**DOMUZLARDA OLUŞTURULAN KEMİK DEFECTLERİNDE  
TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN İLE TRİKALSİYUM  
FOSFATIN YARA İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİLERİNİN  
HİSTOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dinçer YILMAZ  
Diş Tbp. Yzb.

Gülhane Askeri Tıp Akademisi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'nün  
Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Doktora Programı

İçin Öngördüğü  
**DOKTORA TEZİ**  
Olarak Hazırlanmıştır

TEZ DANIŞMANI  
Necdet DOĞAN  
Doç. Diş Tbp. Kd. Alb.

**Ankara**  
**2009**

GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne:

“Domuzlarda Oluşturulan Kemik Defektlerinde Trombositten Zengin Fibrin ile Trikalsiyum Fosfatın Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : Doç. Diş Tbp. Kd. Alb. Necdet DOĞAN  
GATA Ağız, Diş, Çene Hast. ve Cerr. A.D.

ÜYE : Prof. Diş Tbp. Kd. Alb. Yılmaz GÜNAYDIN  
GATA Ağız, Diş, Çene Hast. ve Cerr. A.D.

ÜYE : Prof. Hv. Diş Tbp. Kd. Alb. Yavuz Sinan AYDINTUĞ  
GATA Ağız, Diş, Çene Hast. ve Cerr. A.D.

ÜYE : Doç. Diş Tbp. Kd. Alb. Tuncer ÖZEN  
GATA Oral Diagnoz ve Radyoloji A.D.

ÜYE : Doç. Dr. Mustafa ÖZTÜRK  
Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Ağız, Diş Çene, Hast. ve Cerr. A.D.

ONAY:

Diş Tbp. Yzb. Dinçer YILMAZ'ın 22.06.2009 tarihinde savunduğu bu tez Akademi Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

M. Tahir ÜNAL

Prof. Tbp. Tuğg.

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca yardımlarını gördüğüm, engin bilgi deniziyle her zaman yanımda olan, tez konumun şekillenmesinde ve çalışmalarında büyük emeği geçen tez danışmanım Doç. Diş Tbp. Kd. Alb. Necdet DOĞAN'a,

Hiçbir zaman desteğini esirgemeyen, bizi daima cesaretlendiren Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Hv. Diş Tbp. Kd. Alb. Yavuz Sinan AYDINTUĞ'a, doktora eğitimi süresince bilgi ve deneyimlerinden son derece yararlandığım Prof. Diş Tbp. Kd. Alb. Yılmaz GÜNAYDIN ve Yrd. Doç. Dz. Diş Tbp. Yb. Kemal Murat OKÇU'ya,

Doktora eğitimimizi omuz omuza tamamladığım ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım Hv. Diş Tbp. Bnb. Can Engin DURMAZ ve J. Diş Tbp. Yzb Barışeren ORAL'a,

Deney düzeneğinin hazırlanmasında bana destek olan Sayın Vet. Dr. Kd. Alb. Tayfun İDE ve GATA Araştırma ve Geliştirme Cerrahi kısmındaki bütün çalışanlarına; deney örneklerinin hazırlanması ve değerlendirilmesinde bilgisini, emeğini ve fakültelerinin imkanlarını paylaşmaktan çekinmeyen Doç. Dr. Mehmet KÜRKCÜ'ye, histolojik değerlendirmesinde yardımlarını esirgemeyen Dr. Kanat GÜLLE ve Doç. Dr. A. C. Sinan YÜRÜKER'e, tezin istatistiksel analizlerinin yapılmasındaki katkılarından dolayı Öğr. Kd. Bnb. Mesut AKYOL'a,

Doktora eğitimim süresince klinikte yokluğumu hissettirmeyen ve desteklerini her zaman hissettiğim isimlerini burada saymadığım hocalarım, asistan arkadaşlarım ve personelimize teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Her zaman yanımda olan, destek ve sevgilerini benden asla esirgemeyen sevgili eşim Semra ile çocuklarım Begüm ve Barış YILMAZ'a; hayatları boyunca bana örnek olan annem Gilman, babam Nufel ve ağabeyim Recep YILMAZ'a sonsuz şükranlarımı sunuyorum.

**Dinçer YILMAZ**

## ÖZET

### **Domuzlarda Oluşturulan Kemik Defektlerinde Trombositten Zengin Fibrin ile Trikalsiyum Fosfatın Yara İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Histolojik Olarak Değerlendirilmesi,**

Çalışmamızda, oluşturulan kemik defektleri Trombositten Zengin Fibrin (TZF) ve Trikalsiyum Fosfat (TCP) greft materyalleri ile doldurulmuştur. Amacımız, bu materyallerin oluşturduğu çatı etrafında yeni kemik oluşumunu incelemektir.

Araştırmamızda üç adet erkek domuz denek hayvanı olarak kullanılmıştır. Deneklerin her iki tibiasında da dört adet defekt oluşturulmuştur. Bu defektlerin içine sırası ile ilk kavite kontrol amaçlı boş bırakılmış, ikincisine TZF, üçüncüsüne Trikalsiyum Fosfat (TCP) ve son kaviteye de TZF ile TCP karıştırılarak uygulanmıştır. Bütün denekler çalışmanın 12. haftasında sakrifiye edilerek tibialar ampüte edilmiş ve kesme inceltme sistemi kullanılarak histolojik kesitler hazırlanmıştır.

Histolojik incelemeye elde edilen verilere göre en iyi iyileşmenin TZF ve TCP'ın karıştırılarak kullanıldığı grup olduğu tespit edilmiş, bunu takiben sırası ile TCP, TZF ve kontrol kaviteleri takip etmiştir.

Sonuç olarak her iki maddenin de (TZF ve TCP) biyouyumlu, yeni kemik yapımını aktive eden ve kemik rekonstrüksiyonlarında kullanılabilir yararlı greft materyalleri olduğu sonucuna varılmıştır.

<b>Anahtar kelimeler</b>	<b>:Trombositten Zengin Fibrin, Trikalsiyum Fosfat Greft, Kemik İyileşmesi</b>
<b>Destekleyen kurumlar</b>	<b>:Gülhane Askeri Tıp Akademisi</b>
<b>Yazar Adı</b>	<b>:Dinçer YILMAZ</b>
<b>Danışman</b>	<b>:Necdet DOĞAN</b>

## **SUMMARY**

### **Histologic Comparison of the Effects of Platelet Rich Fibrin and Tricalcium Phosphate Graft Material on Bone Healing in Experimentally Constituted Defects in Pigs,**

In this study bone defects was filled with Platelet Rich Fibrin (PRF) and Tricalcium Phosphate (TCP) graft material. The aim was to induced new bone formation around those artificial scaffolds.

In this research three male porcine were used as experimental subjects. Four artificial defects were created on both tibia bones of the subjects. First defect was left unfilled as a control, second was filled with PRF, third with Tricalcium Phosphate (TCP) graft material and finally defect was filled from PRF mixed with TCP graft. All subjects were sacrificed on the 12th week of the experiment and tibia bones were amputated, subsequently histologic sections were prepared using the cutting and grinding technique.

According to the data acquired via histologic examination, the best results were seen in the PRF mixed with TCP graft group, TCP graft group, PRF group and control group.

In conclusion, this study has shown that both materials (PRF and TCP) are biocompatible, induce new bone formation and can be used for unimpeded bone healing reconstructions.

**Keywords** :Platelet Rich Fibrin, Tricalcium Phosphate  
Graft, Bone Healing

**Supported by** :Gülhane Askeri Tıp Akademisi

**Author** :Dinçer YILMAZ

**Counsellor** :Necdet DOĞAN

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
İNGİLİZCE ÖZET	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokusu	3
2.2. Greft Materyalleri	12
2.3. Trombositten Zengin Fibrin	17
GEREÇ VE YÖNTEM	25
3.1. Trombositten Zengin Fibrinin Elde Edilmesi	27
3.2. Trikalsiyum Fosfat Greft Materyalinin Hazırlanması	27
3.3. Cerrahi İşlemler	29
3.4. Defekt Alanlarının Tespiti	32
3.5. Örneklerin Hazırlanması	34
3.6. Histolojik İnceleme	38
3.7. İstatistiksel İnceleme	39
BULGULAR	40
TARTIŞMA	56
SONUÇ VE ÖNERİLER	64
KAYNAKLAR	66

## SİMGELER VE KISALTMALAR

µm	: Mikron
AIDS	: Acquired immunodeficiency syndrome
BMP	: Kemik morfogenik protein
DA	: Defekt alanı
DBM	: Demineralize kemik matriksi
ER	: Endoplazmik retikulum
FBD	: Fibröz bağ dokusu
GATA	: Gülhane Askeri Tıp Akademisi
GMA	: Glikolmetakrilat
HA	: Hidroksilapatit
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IKD	: İmmatür kemik dokusu
IL	: İnterlökin
KD	: Kan damarları
KK	: Kortikal kemik
MKB	: Kemğin medullasında meydana gelen kemik büyümesi
O	: Osteon
PAS	: Periodic Acid/Schiff
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
RKD	: Rezidüel kemik dokusu
RN	: Rehber nokta
TB	: Toluidin mavisi
TCP	: Trikalsiyum fosfat
TGF	: Transforme edici büyüme faktörü
TNF	: Tümör nekroze edici faktör
TZF	: Trombositten Zengin Fibrin
TZP	: Trombositten Zengin Plazma
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
YK	: Yeni Kemik

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
3.1. TZF ve TCP'nin hazırlanması	28
3.2. Cerrahi aşamalar	31
3.3. Defekt alanlarının tespiti	33
3.4. Kesme-İnceltme yönteminde kullanılan cihazlar	37
4.1. Kontrol grubu	43
4.2. Kontrol grubunda plenimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar	43
4.3. TZF grubu	44
4.4. TZF grubunda plenimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar	44
4.5. TCP grubu	45
4.6. TCP grubunda 4x objektif ile alınan fotoğraftaki oluşumlar	45
4.7. TCP grubunda plenimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar.	46
4.8. TCP+TZF grubu	46
4.9. TCP+TZF grubunda 4x objektif ile alınan fotoğraftaki oluşumlar	47
4.10. TCP+TZF grubunda plenimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar	47
4.11. Plenimetrik ölçüm ile alınan fotoğrafta Cavalieri metodu ile alan sayımı	48
4.12. Kavitelere konulan greft materyallerinin ortalama alanları (standart sapmalar ile birlikte)	53

## TABLolar DİZİNİ

Tablo		Sayfa
3.1.	Oluşturulan defektler ve ilerine konulan maddeler	26
4.1.	Defektlerin $\mu\text{m}^2$ cinsinden alan miktarları	49
4.2.	Defektlerin sayılan Cavalieri noktası cinsinden alan miktarları	50
4.3.	Defektlerin % cinsinden alan miktarları	51
4.4.	Defektlerin alan miktarlarınının % cinsinden ortalamaları	52
4.5.	Kavitelere konulan greft materyallerinin ortalama alanları	53

## 1 GİRİŞ

Kemik, vücut iskeletini oluşturan yüksek oranda özelleşmiş bir dokudur. Kemik doku, vücuda mekanik destek sağlamanın yanı sıra kalsiyum ve fosfor gibi mineraller için depo vazifesi de görür. Kemikte çeşitli nedenlerle oluşan küçük defektlerde kemik dokunun rejenerasyon kapasitesinin yüksekliği nedeniyle herhangi bir sorun yaratmaksızın, özgün yapısı ile fonksiyonunu tamamen eski haline getirebilir. Ancak travma, enfeksiyon, kist ve tümör gibi patolojiler nedeniyle oluşan büyük kemik defektleri, yeni kemik dokusu oluşumunun azlığı yada yokluğu nedeniyle iyileşemeyebilir. Bu tür büyük kemik defektlerinde, iyileşmeyi kolaylaştırmak, başlatmak, kemik oluşumunu hızlandırmak veya oluşan kemik dokusunun kalitesini yükseltmek için kemik greft materyallerine ihtiyaç vardır.

Kemik defektlerinde greft kullanımında amaç canlı dokularının rejenerasyonu ile mevcut defektlerin onarımıdır. Kemik greftinin temel görevi, yeni kemik dokusu, yumuşak dokular, vasküler ve diğer metabolik bileşenlerin yeniden oluşumu için bir çatı oluşturmaktır.

Kemik defektlerin onarımı için kullanılan dört temel kemik greft materyali mevcuttur. Bunlar otogreft, allogreft, heterogreft ve alloplastik materyallerdir. Otojen kemik greftlerinin kullanımda birçok avantajları olmasına karşın, ikinci bir cerrahi işlem gerektirmesi, donör sahada kemik dokusunun zayıflaması, postoperatif morbiditenin yüksekliği, büyük defektlerde doku hacminin yetersizliği gibi dezavantajları da vardır. Otojen greftlere alternatif olarak geliştirilen allogreftler ve heterogreftler yeterli miktarda temin edilebilmesi, uzun süre saklanabilmesi ve ikinci bir operasyon gerektirmemesi gibi avantajlara sahip olmakla beraber, oluşabilecek olumsuz immünolojik cevaplar ile komplikasyonlara da yol açabilmektedirler. Ayrıca, bu greft materyallerinin uygulandığı bireylerde hepatit, AIDS gibi virüslerle, çeşitli bakteri kontaminasyon riski mevcuttur.

Heterojenik kemik greftlerinin insanlarda kullanılması ile ilgili çalışmalar uzun süreden beri devam etmektedir. Bu amaçla kullanılan greft materyali çoğunlukla sığır kemiğidir. Heterogreftlerin kullanımının 1960'lı

yıllarda yaygın olmasına rağmen sığır kemiğinden elde edilen greftlerin transplantasyonundan sonra gelişen otoimmün hastalık raporları nedeniyle kullanımı azalmıştır. Allojenik veya heterojenik greft materyallerinin kullanılmasında aşılması gerekli temel güçlük immünolojik cevaptır.

Son yıllarda toksik ve immünolojik reaksiyon oluşturmayacak, kemik dokuya kolaylıkla uygulanabilecek alloplastik greft materyalleri geliştirilmeye başlanmıştır. Osteokondüktif özelliğe sahip bu materyaller pasif bir çatı görevi ile kemik defektini doldurmaktadırlar. Bu materyaller arasında günümüzde en yaygın kullanılanlardan biri Trikalsiyum fosfat (TCP) greft materyalidir.

Güncel araştırmalar kemik greftleme tekniklerini geliştirmek, daha hızlı ve daha yoğun kemik rejenerasyonu elde edecek bir yöntem geliştirmek yönünde yoğunlaşmaktadır. Büyüme faktörleri, Kemik Morfogenetik Protein (BMP), Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Zengin Fibrin (TZF) bu amaçla kullanılan yöntemlerden bazılarıdır.

TZF ikinci kuşak bir fibrin konsantrasyonudur. Donörden alınan venöz kanın santrifüj işlemine tabi tutulması sonucunda trombositlerin kan elemanlarından ayrıştırılması esasına dayanan, yumuşak ve sert doku iyileşmesinde avantaj sağladığı düşünülen ve büyüme faktörleri içeren bir ajandır.

Bu çalışmada, domuz tibia kemiğinde oluşturulan defektlerde TZF ile TCP greft materyallerinin iyileşme üzerine etkilerinin histolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu şekilde mevcut yöntemlere alternatif, biyouyumlu ve daha ucuz bir uygulamanın greftleme yöntemlerine yardımcı olması hedeflenmiştir.

## 2 GENEL BİLGİLER

İnsan iskeletini oluşturan kemik dokusu, oral ve maksillofasiyal cerrahideki uygulamaların çok büyük bir kısmının üzerinde gerçekleştirildiği ve önemli fonksiyonları olan bir dokudur. Kemik dokusunda çeşitli nedenlerle oluşan defekt ve patolojilerin başarılı bir şekilde tedavi edilebilmesi için her şeyden önce özelliklerinin ve iyileşme mekanizmalarının iyi bilinmesi önemlidir.

### 2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokusu, destek dokuları arasında gerçek anlamda destekleme görevi yapan dokudur. Diğer destek dokularında olduğu gibi bu doku da hücreler, ara madde (matriks) ve fibrillerden oluşmaktadır. Diğerlerinden farklı olarak hücre dışı elamanları kalsifiye bir yapıda olup iskelette destekleyici ve koruyucu bir işleve sahiptir. Kemik dokusu; baş ve göğüs boşluğundaki organların ve kemik iliğindeki hemopoetik hücrelerin korunmasından, kendilerine iletilen kuvveti emerek dağıtılmasından sorumludur. Ayrıca kas ve tendonların tutunma yerleri olup, hareket etmeye yardımcı olur. Bu mekanik işlevlerinden başka, organizmanın kalsiyum ve fosfor deposu olarak metabolizmada önemli rol oynar (1-6).

Oldukça hafif bir materyalden oluşmuş olmasına rağmen, kemik basınç, çekilme, eğilme ve bükülmelere karşı yüksek derecede dayanıklıdır. Dayanıklılığına ve sertliğine karşın, bireyin ömrü boyunca yıkıma uğrayarak yeniden yapılan, canlı ve dinamik bir dokudur (1, 3, 6).

#### 2.1.1. Kemiğin Makroskobik Yapısı

Kemikler, makroskobik olarak süngerimsi kemik (spongiyöz kemik) ve sert kemik (kompakt kemik) olmak üzere ikiye ayrılır. Süngerimsi kemik birbirleriyle anastomoz yapan kemik trabeküllerinden oluşmuştur. Trabeküllerin aralarında, birbiriyle ilişkili düzensiz kaviteler vardır. Bunların içleri kemik iliğiyle doludur. Sert kemikte ise benzeri boşluklar yoktur. Kompakt kemikte ancak mikroskopla görülebilen ve kan damarlarını taşıyan

kanallar bulunur. Bu kanallar lakünlerden çıkan kanaliküli kanalcıklarından çok daha kalındır (1-4, 6, 7).

Sert kemik mekanik güçlere karşı daha dayanıklıdır. Süngerimsi kemik trabeküllerle ayrılmış kaviteler içermesinden dolayı daha yumuşak olup mekanik güçlere dayanıksızdır. Bu iki tip kemik birinden diğerine keskin bir hatla ayrılmadan geçiş yapar (1, 3, 8).

Kemiklerin iç ve dış yüzeyleri osteojenik potansiyele sahip, özel bağ dokusu tabakalarla örtülüdür. Bunlardan dış yüzde olanına periosteum, iç yüzde olanına ise endosteum denir. Periosteum birkaç istisna dışında tüm kemiklerde görülmektedir. Bu tabakanın kemik oluşturma özelliği vardır. Eklem kıkırdaklarıyla örtülü olan kemiklerin uç kısımlarında, tendon ve ligamentlerin kemiğe bağlantı bölgelerinde periosteum örtüsü bulunmaz. Periosteumun bulunmadığı yerlerde, kemik yüzeyi ile ilişkili bağ dokusu osteojenik potansiyelini yitirerek kemik kırık veya defektlerinin iyileşmesine de katkıda bulunmaz. Endosteum osteojenik hücrelerin oluşturduğu ince bir tabaka şeklinde olup, kemik iliği bulduran kemik boşluklarının duvarlarını döşemektedir (1-6).

### **2.1.2. Kemiğin Mikroskopik Yapısı**

Kemik dokusunun mikroskopik olarak incelenmesinde, primer (immature, nonlamellar veya woven) kemik ve sekonder (mature veya lamellar) kemik olmak üzere iki farklı kemik türü olduğu görülmektedir. Primer kemik embriyolojik gelişimde, kırık ve diğer tamir olaylarında görülen ilk kemik dokusudur. Bu kemik dokusu geçici olup yetişkinlerde yerini sekonder kemiğe bırakır (2, 4, 7, 9, 10).

Makroskopik olarak sert ve süngerimsi kemik olarak ikiye ayrılan kemiğin mikroskopik özellikleri de birbirinden farklıdır. Sert kemik fazla miktarda kemik matriksinden oluşmuş olup, matriks üzerinde kemik hücrelerinin (osteositlerin) yer aldığı lakün denilen boşluklar vardır. Lakünler birbirleriyle kanaliküli adı verilen ince kanalcıklarla ilişki kurarlar. Kanaliküliller, ara madde içinde komşu lakünlerin kanalikülilleriyle anastomoz yaparlar. Böylece birbirlerinden ayrı olan lakünler bu kanalcıkların oluşturduğu ağ ile

sürekli ilişki halinde bulunurlar. Bu dar geçitler kemik hücrelerinin beslenmesinde görev yapmaktadır.

Sert kemikte iki tip damar kanalı (Havers ve Volkmann kanalları) vardır. Havers kanalları, kemik dokusu içinde uzunlamasına yer alan kanallardır. Bunlarda yer alan damarlar çoğunlukla kapillerler ve postkapiller venüller olup, nadiren arterioller de bulunabilir. Havers kanalları hem birbirleriyle, hem de Havers kanallarına dikey veya eğri yönde seyreden Volkmann kanalları denilen kanallar aracılığıyla birbirleriyle sürekli ilişki kurarlar. Volkmann kanalları kemiğin periosteumundan endosteumuna kadar uzanır. Periosteum ve endosteumdan gelen kan damarları Volkmann kanalları aracılığıyla Havers kanallarındakiyle ilişki kurar (1, 3, 5, 6).

Kemik dokusu kemik lamellerinden oluşmaktadır. Bu lameller paralel olarak birbiri üzerine dizilmiş 3-7 mikron kalınlığındadır. Kemik lamellerinin dizilişi sert ve süngerimsi kemikte farklıdır (2, 4, 8).

Sert kemikte kemik lamelleri üç ayrı şekilde görülmektedir. Bunların büyük kısmı uzunlamasına konumlanan damar kanalları (Havers kanalları) etrafında iç içe yerleşmiş halkalar şeklindedir. Bir Havers kanalı ve bunun etrafındaki 4-20 adet lamelin oluşturduğu silindirik yapıya Havers sistemi veya osteon denir. Bu sistem, sert kemik yapısının temel birimidir. Havers sistemleri aralarında bulunan alanlara ara lamel sistemi (interstisiyel sistem) adı verilir. Bu lameller değişik büyüklükte, düzensiz şekilli ve köşeli kemik alanları şeklindedir. Havers sistemi ve ara lamel sisteminin sınırları yapıştırıcı çizgi denilen keskin bir hat ile birbirinden ayrılır. Sert kemiklerin dış ve iç yüzleri (periosteumun ve endosteumun hemen altı) üçüncü tür lamellerle çevrilidir. Bu lamellere dış ve iç çembersel lameller adı verilir. Bunlar kemiğin gövdesinin dışında ve içinde iç içe daireler şeklinde uzanır (1-3, 11).

Süngerimsi kemikteki lameller sert kemik dokusunda olduğu gibi düzenli bir yapı göstermez. Süngerimsi kemik ince trabeküllerden oluşmaktadır. Bunların içinde Havers ve Volkmann kanalları, dolayısıyla da damarlar hemen hemen hiç bulunmaz. Süngerimsi kemikteki kemik hücreleri, besin maddelerini kanaliküliler aracılığı ile endosteumdan temin eder (1, 2, 5).

Mikroskopik incelemelerde periosteumun iki tabakadan oluştuğu görülmektedir. Dış tabaka nispeten hücreli sıkı bir bağ dokusundan oluşmuştur. Bu tabaka çok sayıda kan damarları içerir. Bunlar; periosteum ile alttaki kemik dokusu arasındaki ilişkinin sürdürülmesine yardımcı olur. Periosteumun dış tabakasından çıkan kalın kollajen liflere Sharpey lifleri denilmektedir. Bunlar içeride kemiğin dış çembersel lamellerine ve ara lamel sistemine kadar girerler ve periosteumu kemik matrisine bağlarlar. Periosteumun daha gevşek ve hücreli yönden zengin iç tabakası Osteoprogenitör hücrelerinden oluşur. Bunlar mitozla bölünebilme ve osteoblastlara dönüşebilme potansiyeline sahip hücreler olup, kemik gelişmesi ve tamirinde önemli bir rol oynarlar (1-4, 8, 12).

Endosteum, kemik iliği stromasının periferik tabakasıdır. Osteojenik potansiyel açısından periosteuma benzemektedir olup, ondan biraz daha incedir. Genellikle tek kat yassı hücrelerden oluşur ve bağ dokusu fibrilleriyle ilişkilidir. Endosteum; kemikte bulunan tüm boşlukları, Havers kanalları, Volkmann kanalları ve süngerimsi kemiğin ilik boşluklarını tamamen örtmektedir (1, 3, 5).

### **2.1.3. Kemik Matrisi**

Kemiğin ara maddesi iki esas unsurdan oluşmuştur, organik matris ve inorganik bileşenler. Kemiğin %33'ünü organik bileşenler, % 67'sini de inorganik tuzlar (kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum, karbonat ve fosfat) oluşturur (3, 5, 6).

Kemik dokusunun organik matrisi kollajen, glikozaminoglikanlar ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Organik matristeki glikozaminoglikanlar kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asittir. Erişkinlerde organik bileşenlerin % 95'i kollajendir. Kemikteki kollajen bağ dokusundakine benzer ve çoğunlukla Tip I kollajendir (1, 3, 5, 13).

Kemiğin çok sert olmasına karşın, kolay kırılmamasını sağlayan olay kollajen fibrilleridir. Bu fibriller ayrıca hidroksilapatit kristallerinin oluşumu için organik bir çerçeve görevi de görür. Bu kristaller, kollajen fibriller üzerinde minik tabakalar ve çubukçuklar oluşturacak şekilde birikir. Meydana gelen bu

protein-kristal kombinasyonu kemiğin güçlü, esnek ve kırılmaya çok dayanıklı sağlam bir doku olmasını sağlar.

İnorganik maddeler kemik dokusuna sertlik kazandırır. Bunlar % 85 oranında kalsiyum fosfat, % 10 oranında kalsiyum karbonat, daha az miktarlarda kalsiyum florid, magnezyum florid, magnezyum hidroksit ve magnezyum sülfat bileşikleri ile sitrat iyonları ve karbonat iyonlarıdır. Kalsiyum fosfat kemikte ilk olarak şekilsiz olarak depolanır, daha sonra hidroksilapatit kristalleri  $[Ca_{10} (PO_4)_6 (OH)_2]$  halinde yeniden şekillenir. En son evrede kalsiyum fosfat ya çok ince plakalar ya da çubuk şekilli kristaller halinde depolanır.

Kemiğin sertliği inorganik bileşenlerine, dayanıklılığı ve esnekliği ise başta kollajen olmak üzere organik matrikse bağlıdır. Her ikisinin katkısıyla, kimyasal ve mekanik işlevlerini düzenli bir şekilde yerine getiren, yüksek organizasyon seviyesinde dayanıklı bir doku olan kemik dokusu meydana gelir (1, 3, 6).

#### **2.1.4. Kemik Hücreleri**

Kemik dokusu dört çeşit kemik hücresinden oluşmaktadır. Bunlar osteoprogenitor hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır. Bunlardan ilk üç hücre, osteoklastlardan birçok bakımdan farklılık gösterir. Bu hücreler mezenkimden gelişir ve hücrelerin biri diğerine dönüşebilir. Bu yüzden bunlar, aynı hücre tipinin farklı işlevsel evreleri olarak tanımlanabilir. Osteoklastlar ise kemik iliğinden oluşan ve dolaşım kanında bulunan monositlerden köken alır. Böylece köken ve işlevine bağlı olarak sahip olduğu yapısıyla da ilk üç hücre tipinden oldukça farklıdır (3, 5).

##### **2.1.4.1. Osteoprogenitör Hücreler**

Diğer destek dokular gibi, kemik dokusu da embriyonik mezenkimden gelişir. Osteoprogenitör (osteojenik) hücreler, kemik hücresi olma yönünde koşullanmış mezenkim hücreleridir. Bu hücreler sekonder kemiklerin zarlarında (periosteum ve endosteum), bu kemiklerin içerdikleri Havers ve Volkmann kanallarının örtüsünde ve büyüyen kemiklerin metafizindeki

kıkırdak matriksinin trabeküllerinde bulunurlar.

Kemiklerin normal büyümesi sırasında Osteoprogenitör hücreler aktiftirler. Erişkinlerde buldukları bölgelerde inaktif dururken; kemikte yaralanma, kırık gibi durumlarda, kırıkların iyileşme bölgelerinde ve kemiğin içten yeniden düzenlenmesi sırasında etkin hale gelerek mitozla bölünüp çoğalırlar. Çoğalan bu hücrelerin bir bölümü kemiği oluşturan osteoblastlara dönüşür. Osteogenez durduğunda osteoblastlar da morfolojik olarak osteoprogenitor hücrelerden ayırt edilemeyen kemik hücrelerine dönüşürler (1, 3, 6).

#### **2.1.4.2. Osteoblastlar**

Osteoblastlar kemik oluşumundan sorumlu olan esas hücrelerdir. Kemikleşme bölgelerinde, gelişmekte olan kemiklerin periosteumunun kemiğe temas eden derin bölgelerinde diziler halinde bulunurlar. Kemikte yeni matriks oluşumu sırasında kübik veya kısa silindirik epitel hücreleri şeklinde yan yana gelerek tabaka oluştururlar ve kısa uzantılarıyla birbirlerine tutunurlar.

Çekirdekleri ökromatin özellikte ve büyük olup, genellikle hücrenin kemik yüzeyinden uzak olan kısmında yer alır. Çok iyi gelişmiş Golgi kompleksi çekirdek ile hücrenin tabanı arasında yer alır. Sitoplazmaları granüllü endoplazmik retikulum (ER) bakımından zengindir. Mitokondrileri uzun ve oldukça fazla sayıdadır (3, 5, 11, 14).

Osteoblastlar yüksek metabolik etkinliğe sahip, hızlı protein sentezi yapan hücrelerdir. Yüksek seviyede alkalin fosfataz aktivitesi ile kemik matriksinde kalsiyum depolanmasını düzenlerler. Bu hücreler kemik matriksinin organik kısmını salgırlar. Henüz kireçleşmemiş olan bu tür organik maddeye osteoid denir. Osteoblastlar zamanla salgıladıkları osteoid içinde gömülü kalır. Etkin kemik oluşumu durduğunda, osteoblastların faaliyetleri önce yavaşlar sonra durur. Şekilleri de yavaş yavaş değişmeye başlar; iğ veya mekik şeklindeki hücrelere dönüşür. Periodic Acid/Schiff (PAS) pozitif granülleri sitoplazmalarından yavaş yavaş kaybolur ve hücrelerin fosfataz tepkimeleri de hızlı bir şekilde düşer. Sonunda osteosit

hücrelerine dönüşürler.

Kemik oluşumu esnasında, şekillenmekte olan kemik trabekül ve lamellerinin yüzeylerinde devamlı olarak bir osteoblast sırası bulunur. Bunlar osteoprogenitör hücrelerden farklılaşır. Osteoblastlar bölünmeyen hücrelerdir (1, 3, 5).

#### **2.1.4.3. Osteositler**

Osteositler, kalsiyum tuzlarının birikmesiyle kireçleşmiş kemik matriksi içinde gömülü kalan osteoblast hücreleridir. Dolayısıyla osteositler, tamamen oluşmuş kemikteki esas hücrelerdir. Osteositler lakün adı verilen boşluklarda bulunurlar ve hücrelerinin gövdesi içinde buldukları lakün boşluğunun şekline uyar. Hücrelerin ince sitoplazmik uzantıları kanalikülilerden geçerek komşu osteositlerle ilişki kurar.

Osteositlerde Golgi bölgesi osteoblastlara göre daha az belirgin olup, sitoplazma bazik boyalarla daha hafif boyanır. Kemik matriksinde oldukça derinlerde yer alan osteositlerde Golgi, ER ve mitokondri gibi organellerde belirgin bir gerileme görülür.

Osteositler de, osteoblastlar gibi bölünme gücünü kaybetmiş olan hücrelerdir. Osteositler kemik matriksinin aynı durumda kalmasının sağlanmasında etkin rol oynamakta olup, bu hücrelerin ölmesini matriksin rezorpsiyonu izler (1, 3, 5, 11).

#### **2.1.4.4. Osteoklastlar**

Osteoklastlar, özellikle kemik yıkımının olduğu bölgelere yakın bulunan 5-50 arasında çekirdek içeren dev hücrelerdir. Kemiğin yeniden biçimlenme süresince çözünüp çevre dokularca emilmesinden sorumludurlar. Osteoklastların yer aldığı kemik yüzeyindeki sığ çukurlara Howship çukurları (Howship's lacunae) adı verilir. Kemik yıkımından aktif olarak sorumlu olan osteoklastlarda çok belirgin bir kutuplaşma göze çarpar. Çekirdekler daha çok hücrenin dış yüzeyine yakın düzgün hatlı kısmına yer alırken, kemiğin yıkımından sorumlu olan tarafta hücre zarı girintili ve çıkıntılı bir hal alır. Buraya dantel kenar adı verilir (1, 5, 15-17).

Osteoklastların çekirdeği, osteoblastların çekirdeğini andırır. Sitoplazmaları, kontrollü pH'da bazik boyalarla boyandığında hafif bazofilik bir özellik gösterir. Ancak rutin histolojik kesitlerde genellikle eozinofilik karakterdedir ve bol vakuollü görünür. Çekirdekler arasında dağılmış halde çok sayıda Golgi bulunur. Mitokondrileri daha çok dantel kenar civarında bulunur. Sayıları oldukça fazladır ve çubuk şeklinde veya kısa ipliksi yapıdadır. Osteoklastlar, osteolitik osteolizis süresince matrikste enzimatik yıkımlara neden olurlar. Rezorpsiyon olayında osteoklastlardan kemik matriksi bozan ve kalsifiye ana maddeyi serbestleştiren asit, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgılanmaktadır. Bu hücreler sadece rezorpsiyondan sorumlu olmayıp, aynı esnada rezorpsiyon sonucu ortaya çıkan artıkların uzaklaştırılmasında da etkin rol alırlar (3, 5, 7, 17).

#### **2.1.5. Kemik Oluşumu**

Kemik oluşumu iki şekilde meydana gelmektedir. Osteoblastlar tarafından salgılanan matriksin mineralizasyonu ile oluşuyorsa buna zarlar arası kemikleşme (intramembranöz ossifikasyon), daha önceden bulunan kıkırdak matriksi üzerine kemik matriksinin birikmesi ile oluşuyorsa buna da kıkırdak içi kemikleşme (endokondral ossifikasyon) adı verilir (1, 5, 6).

Intramembranöz kemikleşme frontal, parietal, oksipital ve temporal kemikler gibi kafatasının bazı yassı kemikleri ile maksilla ve mandibulanın bazı kısımlarında görülmektedir. Kıkırdak safhasını geçirmeden mezenkimal membranlar içinde zarlar arası kemikleşme ile oluşan kemiklerin bu şekilde anılmasının nedeni mezenkimal doku yapılarının içinde yer almasıdır.

Kıkırdak içi kemikleşme kafatasının alt kısmı, omurga, pelvis, kol ve bacaklardaki kemikler ile mandibulanın bazı kısımlarında görülmektedir. Kıkırdak yapı iskeleti içinde oluşan kıkırdak içi kemikleşme, temel olarak iki aşamadan meydana gelir. Birinci aşamada, hyalin kıkırdak iskeletindeki kondrositlerin kalsifiye kıkırdak matriksin septumları tarafından ayrılan geniş lakünalar meydana getirdikten sonra bunların hipertrofiye olması ve yıkıma uğraması izlenmektedir. İkinci aşamada ise dejenere olan kondrositler tarafından bırakılan lakünelara osteoprogenitör hücrelerin ve kan

kapillerlerinin penetrasyonu görülmekte. Osteoprogenitör hücreler kıkırdak septumlarını kemik matriksi ile kaplayan osteoblastlara dönüşürler (2, 3, 5).

İntramembranöz veya endokondral her iki kemikleşme ile oluşan kemik dokusu başlangıçta nonlameller yani primer kemiktir. Özellikle mekanik faktörlerin etkisi ile bir süre sonra sekonder kemik dokusu oluşmaya başlar. Kemiğin lamelli yapıya geçiş yaptığı belirlenmesi, hücreler arası maddedeki kollajen liflerin kemiğe etki yapan güçlere paralel yönde düzenlenmeleri ile anlaşılmakta (2, 5).

### **2.1.6. Kemik İyileşmesi**

Kemik sürekli olarak yıkılan, yapısal gerilim ve vücudun kalsiyum gereksinimi gibi etkenlerle yeniden yapılanan dinamik bir dokudur. Kemik iyileşmesi, yaralanmayı takiben skar bırakmaksızın rejenerasyon yeteneği bulunan osseöz dokuda gelişen dinamik ve önemli bir süreçtir.

Kemikte oluşan travmanın sonucunda, yaralı bölgede genel doku tepkimeleri görülür. İyileşme bölgesindeki kanamayı takiben granülasyon dokusunun oluşturduğu pıhtılaşma meydana gelir. Granülasyon dokusu vücutta bir yabancı cisme, harabiyete, yaralanmaya veya enfeksiyonlara karşı savunma tepkimesi esnasında oluşan özellikle makrofaj ve lenfositlerden meydana gelen bir dokudur. Periosttan gelen kan damarları, çevrelerinde bağ dokusu ile birlikte defekt bölgesine sokularak burayı bol damarlı ve bol hücreli bir bağ dokusu ile doldururlar (1, 3, 18).

Kemik fraktürü söz konusu ise endosteum da bu olayda rol alır. Bu bağ dokusu içinde kemik yapımı; ya bağ dokusu fibroblastlarının osteoblastlara farklılaşmaları, bunların da kemik dokusunu oluşturmaları yoluyla dolaysız yani intramembranöz ossifikasyon ile olur veya endokondral ossifikasyonla meydana gelir. Bu durumda defekt yerini dolduran bol damarlı bağ dokusu içinde önce kıkırdak dokusu gelişir, sonra bu kıkırdak yavaş yavaş rezorpsiyona uğrayarak yerini yine bağ dokusu tarafından yapılan kemik dokusuna bırakır. İster intramembranöz ister endokondral ossifikasyonla olsun defekt yerinde ilk oluşan kemik dokusu lamelsiz yapıdadır. Daha sonra bu kemik dokusu da rezorbe olarak onun yerine

sağlıklı kemiğin genel düzenine ve fonksiyonel ihtiyacına uygun lamelli kemik dokusu oluşur (1-7, 10).

Kemiğin içinde veya kenarında bulunan kemik defektlerinin yeni kemikle dolması beklenmektedir. Ancak iyileşme mekanizmalarının yetersiz kaldığı konjenital veya travmaya bağlı olarak ortaya çıkan deformitelerin ve kemik patolojilerinin cerrahi eksizyonu sebebiyle meydana gelen geniş kemik defektlerinin tedavisinde, yeni kontur sağlanması ve kemik iyileşmesinin desteklenmesi amacıyla çeşitli kemik greft materyallerin kullanımı gerekmektedir (6, 8, 19, 20).

## **2.2. Greft Materyalleri**

Vücuda tedavi amaçlı yerleştirilen yabancı maddelere greft; kemik dokudaki defektlerin doldurulması, kemik oluşumunu stimule etmek için kullanılan materyallere de kemik grefti denilmektedir (21).

İlk kemik grefti uygulaması, Job van Meek'ren (22-24) tarafından 1668'de köpek kafatasından bir parça kemiğin bir insanın kafatasındaki defekte nakli ile gerçekleştirilmiştir. Duhamel (7, 24, 25) 1739 yılında, bir deney sonrasında subperiosteal olarak yerleştirilen tellerin daha sonra kemik ile örtüldüğünü saptayarak periostun kemik yapma özelliğini belirlemiştir. Haller (25) 1864 yılında büyüyen kemiğin özellikle epifiziyal tabakasında bulunan hücrelerin kemik oluşumunda rol aldıklarını göstermiştir. Gegenbauer (7, 25) 1864'te kemik dokunun oluşması ve şekillenmesi ile ilgili olarak ilk kez osteoblast hücresini tanımlamıştır. Nussbaum (25) 1864 yılında insanda ilk başarılı otogreft uygulamasını, Macewen (24, 26) ise 1881'de başarılı ilk allogreft uygulamasını gerçekleştirmişlerdir.

Kemik dokusunun geniş bir rejenerasyon kapasitesi nedeniyle orijinal yapısını ve fonksiyonunu tamamen eski haline getirebilir. Ancak bazen kemik defektleri kemik dokusu ile iyileşemeyebilir. Böyle durumlarda iyileşmeyi kolaylaştırmak, başlatmak veya hızlandırmak için kemik defektlerini kemik greft materyalleri ile doldurulması gerekebilir. Greft materyalinin kemikle bağlanmasında kemiğin osteogenez, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon gibi üç cevabı vardır (27, 28).

Osteogenez, canlı osteoblastların ve öncü osteoblastların greft materyali ile birlikte defekt içine transplante edildikleri durumlarda gerçekleşir. Bu bölgeler de kemik oluşum merkezlerini oluşturur. Sıklıkla otogreftlerde bulunan bir özelliktir.

Osteokondüksiyon; non-vital greft materyallerinin, öncü osteoblast hücrelerinin içine doğru büyümesi için bir çatı olarak vazife gördüğü durumlarda gerçekleşir. Bu süreci sıklıkla greft materyalinin dereceli bir şekilde rezorbsiyonu izler. Otojen kortikal kemikler veya otojen kemik yığıntıları osteokondüktif özellikleri olan greft materyalleridir. Bu tür greft materyallerinin gerek kemik kaynaklı, gerekse sentetik kemik materyallerinin benzer osteokondüktif özellikleri vardır. Ancak yıkımları ve canlı kemik dokusu ile yer değiştirme özellikleri zayıftır. Eğer yerleştirilen materyal rezorbe olmayan bir materyal ise birleşme, materyal yüzeyine kemik apozisyonu ile sınırlıdır. Remodeling sırasında hiçbir yer değiştirme gerçekleşmez.

Osteoindüksiyon, bir veya daha fazla indükleyici ajanın etkisi ile farklılaşmamış yerel bağ dokusu hücrelerinin kemik hücrelerine farklılaşması neticesinde yeni kemik dokusu oluşumunu tanımlar. Demineralize kemik matriksi (DBM) veya BMP bu tür greft materyallerine örnektir (27-29).

### **2.2.1. Greft Materyallerinin Sınıflandırılması**

Günümüzde kemik defektlerinin doldurulması amacıyla çeşitli greft materyalleri kullanılmaktadır. Bu kemik greftleri otogreft, allogreft (homogreft), heterogreft (ksenogreft) ve alloplastik materyaller olmak üzere dört temel grupta değerlendirilmektedir (27-29).

#### **2.2.1.1. Otojen Greftler**

Bireyin bir bölgesinden alınıp başka bir bölgesine yerleştirilen, canlı osteoblast ve osteoprogenitör hücreleri içeren grefttir. Klinik kullanmaya uygun yegane osteojenik greft olması nedeniyle otojen kemik greftleri greft materyallerinin altın standardı olarak kabul edilir. Greft materyali olarak otojen kemik kullanıldığında kemik iyileşmesi osteogenez, osteoindüksiyon ve

osteokondüksiyon yoluyla olur. Otojen kemik grefti kaynakları ağız içi ve ağız dışı olmak üzere ikiye ayrılır (27, 30).

Ağız içinden alıcı olarak kullanılan sahalara çene ucu, lateral ramus bölgesi, tüber bölgesi ve koronoid çıkıntısıdır. Ayrıca aspirasyon esnasında, operasyon ortamındaki kemik parçalarını toplamak amacıyla, aspiratöre takılan *bone collector* adı verilen özel aletlerle de az miktarlarda greft toplanabilmesi mümkündür. Alıcı ve verici sahalara ağız içinde olması, operasyon sonrası hızlı iyileşme ve operasyonun lokal anestezi ile yapılması gibi avantajlarının yanında anatomik sınırlamalar ve sınırlı hacimde kemik kullanımı gibi dezavantajları da vardır (27, 30, 31).

Ağız dışı otojen kemik için alıcı sahalara iliak kemik, kaburga, tibia veya kalvaria'dır. Bu alıcı sahalara büyük kemik kayıplarında tercih edilmektedir. Ağız dışı otojen greftlerin geniş hacimde elde edilip istenilen form ve şekilde uygulanması ve yüksek osteojenik aktivitesinin olması gibi avantajları vardır. Ancak iki ayrı cerrahi girişim yapılması ve genel anestezi gerektirmesi gibi dezavantajlar söz konusudur.

Otojen greftlerin genel olarak, yüksek osteojenik ve osteoindüktif etki ile hızlı iyileşme ve canlı kemiğe dönüşüm gibi özellikleri vardır. Ayrıca, erken vaskülarizasyon ile antijenik özellik göstermeyerek histolojik ve immünolojik uyumluluğun yüksek olması gibi avantajları mevcuttur. Otojen greftlerin alıcı sahada oluşabilecek komplikasyonlar, cerrahi girişim süresinin uzaması gibi dezavantajları da vardır (27, 28, 32-35).

#### **2.2.1.2. Homojen Greftler**

Otojen kemik greftlerinin belirtilen dezavantajları, başka yöntemlerin araştırılmasına ve geliştirilmesine yol açmıştır. Homojen greftler aynı türün genetik olarak benzer bireyleri arasında taşınan greft tipidir. Allogreft ve izogreft olarak iki alt gruba ayrılabilirler. Allogreftler, genetik olarak farklı aynı canlı türünden elde edilen greft tipidir. Kadavradan veya canlı insanlardan (kalça kırığı gibi durumlarda) çıkarılan kemiklerden elde edilirler. İzogreftler, genetik olarak aynı özellikleri taşıyan (ikizler) bir bireyden diğerine taşınan greft türüdür.

Otojen kemik greftlerine göre avantajları olmasına karşın, dokunun alıcı immünogenetiğine bağlı kabul edilmeme riski ve vericiden alıcıya hastalık geçiş riski söz konusudur (27, 28, 31, 33).

### **2.2.1.3. Heterojen Greftler (Ksenogreftler)**

Farklı türde canlı dokularından elde edilen grefttir. Günümüzde sığır kemiği ve doğal mercandan elde edilen iki tip ksenogreft mevcuttur. Her ikisi de insan kemiğine benzer yapıda, biyolojik olarak uyumlu ve osteokondüktiftirler.

Heterojenik kemik greftlerinin insanlarda kullanılması ile ilgili çalışmalar uzun süreden beri devam etmektedir. Bu amaçla kullanılan greft materyali çoğunlukla sığır kemiğidir. Heterogreftlerin kullanımının 1960'lı yıllarda yaygın olmasına rağmen sığır kemiğinden elde edilen greftlerin transplantasyonundan sonra otoimmün hastalık gelişen hastaların rapor edilmesi nedeniyle kullanımı azalmıştır. Allojenik veya heterojenik greft materyallerinin kullanılmasında aşılması gereken güçlük immünolojik reaksiyonlardır (27, 28, 36).

### **2.2.1.4. Alloplastik Materyaller**

Canlı doku içine implante edilen sentetik veya deorganifiye olmuş materyallerden oluşturulan biyoseramikler veya metaller, seramikler, karbonlar ve kalsiyum fosfatlar gibi inert maddelerdir. İmplant materyali olarak da tanımlanan greft materyali sentetik yoldan elde edilmiştir. Ağız cerrahisinde kullanılan biyomateryaller; metal ve metal alaşımları, seramikler, karbonlar ve polimerlerdir (37).

İdeal bir biyomateryalin, immünolojik ve toksik reaksiyon göstermemesi, kolay uygulanması, doku dostu olması ve uygulandığı dokuya fiziksel özellikleri ile benzemesi beklenmektedir. Biyomateryaller defekt bölgesinin iyileşmesinde indüktif etki gösteren maddelerdir. İndüktif etkisi gösteren biyomateryaller, biyotolere, biyo inert ve biyoaktif maddeler olarak üç temel grupta toplanır.

Biyotolere maddeler, kemik dokusu içerisine yerleştirildiklerinde, iyileşme süreci içerisinde etrafında fibröz bir bağ dokusu oluştururlar. Bu tür maddeler doğrudan kemikle temas halinde değildirler. Burada osteojenez oluşumu söz konusudur. Fraktürlerin fiksasyonunda kullanılan Kobalt-Krom esaslı mini plaklar ve vidalar bu sınıfa girerler.

Biyoinert maddeler, kemik doku içine yerleştirildiklerinde iyileşme süreci içerisinde etraflarında fibröz bağ dokusu oluşmadan materyal ile kemik dokusu arasında doğrudan temas meydana gelir. Burada temas osteojenezi söz konusu olur. Titanyum ve alüminyum oksit seramikler bu gruba örnektir (27, 28, 38).

Biyoaktif maddeler, kemik doku içerisine yerleştirildiklerinde iyileşme süresi içinde doku ile kimyasal olarak bağlanırlar. Burada birleşme osteojenezi söz konusu olur. Bu maddelerin temel amacı yerleştirildikleri defekt alanında kemik hücrelerinin mitotik aktivitesini arttırarak yeni kemik oluşumunu hızlandırmaktır. Hidroksil Apatit (HA) ve Trikalsiyum Fosfat (TCP) bu gruba dahildir (27, 31).

#### **2.2.1.4.1. Biyoaktif Seramikler**

Seramik grubundaki greft materyaller biyoaktif özellikler gösteren ve en geniş kullanımı olan alloplastik kemik greft materyalleridir. Kalsiyum fosfat ihtiva ederler. Bu grupta HA, TCP gibi sentetik kalsiyum fosfat materyalleri ve bunların doğal kaynaklardan elde edilenleri (coralline) vardır. Bu materyaller, kemik gibi baskı kuvvetlerine dayanıklı, çekme kuvvetine karşı ise zayıftırlar. Biyoaktif seramikler, rezorbsiyon özelliklerine göre değişiklik gösterirler. Biyolojik farklılıklar göstermelerine rağmen, kemik ogmentasyonu için önerilirler. Bu maddeler kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu, rezorbe alveoler kretlerin ogmentasyonunda, implant çevresi fenestrasyon ve dehisenslerde kullanılmaktadırlar (27, 31).

##### **2.2.1.4.1.1. Trikalsiyum Fosfat (TCP)**

Bu materyal HA'e çok benzer, ancak kemiğin doğal bir bileşeni değildir.  $\beta$ -TCP olarak da adlandırılır. Kalsiyum fosfatın poröz formu olup,

kalsiyum fosfata oranı 3/2'dir. Diğer kalsiyum fosfat preparatları gibi TCP de kırılğan olup, gerilme ve kopmaya karşı zayıftır. Ancak sıkıştırma kuvvetlerine karşı dirençlidir. Kısmen rezorbe olan ve greftin kemikle yer değiştirmesine izin veren biyolojik doldurucu olarak görev yapar. Kemik oluşumu için bir çatı oluşturarak yeni kemikle yer değiştirir. TCP kısa dönemli biyolojik bir dolgu maddesi olup, enkapsülasyon olmadan zamanla osteoblastlar tarafından rezorbe edilmektedir. TCP 6-18 ay sürecinde çözülme yoluyla rezorbe olmaktadır. Materyalin rezorbsiyonu ve kemik tarafından doldurulması, farklı mekanizmalarla oluşabilir. TCP'ın rezorbsiyon oranındaki değişikliler yüksek oranda materyalin kimyasal özelliğine, porözitesine ve partikül büyüklüğüne göre değişmektedir. Bu özellikler ise ürünün fabrikasyonu ile ilgilidir. TCP osteokondüktif bir sentetik seramik olup sıkıştırma işlemleriyle hazırlanır. Isıya ve sterilizasyona karşı çok duyarlıdır. Greftin yerleştirilmesi aşamasında, materyalin tutunma ve başarısını arttırabilmek için osteokondüktif veya osteojenik materyaller ile birlikte kullanılabilir.

TCP greft materyali güvenli ve doku uyumu mükemmeldir. İnflamasyon ve yabancı cisim reaksiyonu oluşturmaz. Osteokondüktiftir, osteoindüktif etkisi yoktur. Canlı kemiğe yakın bir yere yerleştirildiğinde kemik oluşumuna rehberlik eder, ancak deri gibi kemik oluşturmayan bir dokuyla çevrelenen bir bölgeye yerleştirildiğinde kemik oluşumunu indüklemeyiz (27, 31, 39).

Kemik greft tekniklerinde ayrıca greft materyallerin kombine kullanımı veya greft materyallerinin çeşitli büyüme faktörleri, Kemik Morfogenetik Protein (BMP), Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Zengin Fibrin (TZF) gibi materyaller ile birlikte kullanımı gibi teknikler de kullanılmaktadır.

### **2.3. Trombositten Zengin Fibrin**

#### **2.3.1. Fibrin**

Fibrin, plazma ve trombositlerin  $\alpha$  (alfa) granüllerinde yoğun şekilde bulunur. Fibrinojenin aktive edilmiş formudur. Pıhtılaşmada, trombosit agregasyonunda önemli görevler yapmaktadır. Bu aşamada bir çeşit biyolojik

yapıştırıcıya dönüşüp vasküler kanamayı kontrol altına alır. Çözülebilir bir protein olan fibrinojen, trombin tarafından çözülmemeyen bir molekül olan fibrine dönüşerek kanama bölgesinde fibrin jeli oluşturur. Pıhtılaşma esnasında bu fibrin matriks içerisine yara iyileşmesini kontrol eden çeşitli büyüme faktörleri salgılanmaktadır. Bu özelliklerinden yola çıkılarak Fibrin Yapıştırıcılar, Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve son olarak da Trombositten Zengin Fibrin (TZF) uygulamaları geliştirilmiştir. TZF geliştirilen ikinci kuşak trombosit konsantrasyonudur.

Trombositler, pıhtı oluşumu için gerekli olup yara iyileşmesini başlatmak ve desteklemek için büyüme faktörlerinin salınmasından sorumludur. Cerrahiden sonra, trombositler bölgede kalıcı bir kan pıhtısı oluştururlar. Doku oluşumu, iyileşmenin desteklenmesi ve artırılması için büyüme faktörlerinin salınımı başlar. Diğer kemiklerde olduğu gibi maksillofasiyal bölgenin gelişmesinde de hormonların ve büyüme faktörlerinin çok önemli rolleri vardır. Kemik ve yumuşak doku metabolizması üzerinde sistemik hormonların ve büyüme faktörlerinin etkilerini gösteren pek çok çalışma mevcuttur.

Trombositlerdeki büyüme faktörleri etkilerini spesifik hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak göstermektedir. TZF'nin osteojenik hücrelerin proliferasyonunu artırarak kemik formasyonu ve rejenerasyonu üzerinde güçlü bir stimülatör olabileceği düşünülmektedir (40-41).

### **2.3.2. Trombositten Zengin Fibrinin Hazırlanması**

Trombositten Zengin Fibrin Fransa'da Choukroun ve arkadaşları tarafından oral ve maksillofasiyal uygulamalar için geliştirilmiş, yumuşak ve sert dokularda hemostaz ve yara iyileşmesinde belirli avantajlar sağlayan bir ajandır. Fibrin yapıştırıcılar, Trombositten Zengin Plazma gibi maddelerden farklı olarak bu materyalin hazırlanmasında herhangi bir antikoagülan, sığır kaynaklı trombin veya başka jelleştirici ajan kullanılması gerekmemektedir. Hazırlanmasında 10 cc'lik otojen kan alınıp antikoagülan madde içermeyen steril cam tüpte 10 dk 400 g'de santrifüje edilir. Bu işlem sonunda cam tüpte üç tabaka oluşmakta, altta kırmızı kan hücrelerini içeren tabaka, ortada TZF

ve üstte de hücre içermeyen plazma tabakalarıdır. Trombositler oluşan fibrin tabakasında yoğun bir şekilde bulunmaktadır. Diğer fibrin uygulamalarından farklı olarak TZF'de kan cam tüp yüzeyine değdiği anda pıhtılaşma olayı başlamaktadır. Düşük hızda santrifüj işleminin yapılması meydana gelen fibrin ağın doğal fibrin ağına çok benzemesi nedeniyle bu ağ içine trombosit ve bunların salgıladığı sitokinlerin daha rahat migrasyonuna yardımcı olmaktadır. Bu bilgiler ışığında TZF materyali biyolojik bir fibrin yapıştırıcıdan çok, yara iyileşmesini hızlandıran bir ajan olarak nitelendirilmesine sebep olmaktadır (40, 44).

TZF matriksi içerisinde sadece trombositlerden salınan sitokinler değil, lökositler tarafından salgılanıp enflamasyon kontrolünde görev alan sitokinler de tespit edilmiştir. Bunların TZF'deki sitokinlerin savunma mekanizmasını güçlendirdiğini göstermiştir. Bu sitokinler ile polimorfonükleer lökosit, makrofaj gibi hücreler aktive edilip TZF bölgesinde daha hızlı hücre sel cevaplara sebep olunmaktadır. Çalışmalarda matriks içindeki sitokinlerin remodeling aşamasında yavaş salınım yaparak uzun dönemde etkili olduklarını gösterilmiştir (45).

### **2.3.3. TZF'deki Trombositlerden Salgılanan Sitokinler**

TZF matriksi içerisinde bulunan trombositlerin  $\alpha$  (alfa) granüllerinden PDGF, TGF- $\beta$  ve IGF' gibi bazı sitokinler salınır. Bu faktörlerin TZF'nin içerisinde bulunduğunu gösteren çalışmalar vardır. Faktörlerin yara iyileşmesi üzerindeki etkilerinden dolayı, TZF'nin kullanımı yaygınlanma eğilimi göstermektedir (40-44).

#### **2.3.3.1. PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü)**

PDGF'ler trombositlerin  $\alpha$  (alfa) granüllerinde bulunurlar ve pıhtılaşma sırasında salınırlar. Aynı zamanda monositler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve endotel hücrelerinde de bulunurlar. Yara iyileşmesi sırasında ortaya çıkan ilk polipeptid hormondur.

PDGF'in en önemli etkisi hücre çoğalmasını ve protein sentezini arttırmasıdır. Bu hormon hücreleri bölünmeye hazır hale getiren bir faktör

olarak bilinir. Mezenşimal hücreler, düz kas hücreleri ve fibroblastlar için güçlü bir mitojenik etki gösterirler. PDGF' nin etkisi diğer büyüme faktörlerinin varlığında artmaktadır. Aynı zamanda lökositler, makrofajlar, fibroblastlar ve düz kas hücreleri için güçlü bir kemoatraktandır. Bunlara ek olarak, anjiyogenik özellikleri sayesinde kollajen ve matriks formasyonunu stimüle eder (41, 43, 44).

### **2.3.3.2. TGF- $\beta$ (Transforme Edici Büyüme Faktörü- $\beta$ )**

İki polipeptit zincirinin disülfat bağı ile bağlanması ile meydana gelmiştir. TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  ve TGF- $\beta_3$  olmak üzere üç farklı formda bulunur. Bunlardan TGF- $\beta_1$ ' in trombositlerde ve kemikte yüksek konsantrasyonlarda bulunduğu bildirilmiştir. TGF- $\beta$  otokrin ve parakrin mekanizmalar ile etki gösteren önemli düzenleyici bir moleküldür.

TGF- $\beta$  'nın faaliyetleri sadece lokal ve çevresel etkilerle sınırlı değildir. Günümüzde, TGF- $\beta$ 'ların endokrin sirkülasyonunun otoimmün hastalıklar ve kronik fibrotik patolojilerde önemli bir payı olduğu anlaşılmıştır. Günümüzde de aterosklerozis ve karsinogenezisi de içeren pek çok hastalıkta prognostik marker olarak kullanılmaktadır. Makrofajlar, trombositler ve endotelial hücreler tarafından salınan TGF- $\beta$ 'lar etkilerini yakındaki fibroblastlar, kemik iliği kök hücreleri, endotelyal hücreler ve preosteoblastlar üzerinde gösterirler.

TGF- $\beta$ 'lar anjiogenezisi, konnektif dokudaki fibronektin, glikozaminoglikan ve kollajen yapımını stimüle ederler. TGF- $\beta$ 'nın en önemli fonksiyonlarından biri de osteoblast prekürsörlerinin mitojenezi ve kemotaksisidir.

Bu polipeptit aynı zamanda osteoklast yapımını ve rezorpsiyonu inhibe ederek de kemik oluşumunu artırır.

TGF- $\beta$  in vitro olarak PDGF ile birlikte fibroblastların büyümesini stimüle ederken epidermal büyüme faktörü ile birlikteyken inhibe etmektedir (41, 43, 44).

### **2.3.3.3. IGF-I (İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I)**

Tek zincirli polipeptit bir hormondur. IGF-I insülin ile %47 oranında benzerlik gösterir. Kemik dokusunda en fazla bulunan büyüme faktörüdür. Kemik matriksi içinde depolanır ve rezorpsiyon olayında ortama salınmakta ve yeni kemik oluşumunu stimüle etmektedir. Kıkırdak büyümesini, kemik matriks oluşumunu, osteoblastların büyümesini ve preosteoblastların osteoblastlara farklılaşmasını stimüle eder. Ayrıca osteoblastlardan tip 1 kollajen salınımını artırır. IGF-I hücreleri direkt olarak stimüle edebilir. Osteoblastik hücrelerdeki alkalen fosfataz aktivitesini artırarak aktive eder.

IGF-I başta osteoblastlar ve trombositler olmak üzere makrofaj ve monositlerden de salgılanabilmektedir. IGF-I transkriptleri yaradaki makrofajlardan izole edilmiştir. Bu durum büyüme faktörlerinin lokal habercileri olarak hareket edebileceklerini düşündürmektedir. IGF-I in PDGF ile kombinasyonu yara iyileşmesinin kalite ve kantitesini arttırabilmektedir (41, 43, 44).

### **2.3.4. TZF'deki Lökositler Tarafından Salgılanan Sitokinler**

Bu grupta yer alan sitokinler enflamasyonda kilit görevi yapan IL-1 $\beta$ , IL-6 ve TNF- $\alpha$  ile yara iyileşmesinde görev yapan IL-4 ve VEGF gibi sitokinlerdir (45).

#### **2.3.4.1. IL-1 $\beta$ (Interlökin-1 $\beta$ )**

Aktif makrofaj, nötrofil, endotel hücreleri, fibroblast, keratinosit ve langerhans hücreleri tarafından salgılanır. Enflamasyonunun kontrolünde kilit rol oynar. İki farklı gene bağlı olarak  $\alpha$  ve  $\beta$  formları vardır. IL-1 $\beta$  dominanttır.

IL-1 $\beta$  sentezlenmesi TNF- $\alpha$ , İnferon  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve bakteriyel endotoksinler tarafından kontrol edilmektedir. Ana görevi T helper lenfosit stimulasyonudur.

TNF- $\alpha$  ile birlikte çalıştığında osteolizisi arttırarak osteoklastların aktive olmasına neden olur (45).

#### **2.3.4.2. IL-6 (Interlökin-6)**

IL-6, IL-1 $\beta$  ve TNF- $\alpha$  ile koordineli olarak çalışan bir enflamatuar sitokinidir. Asıl kaynağı stimule olan monosit, fibroblast ve epitelyal hücreler olup; uyarıda makrofaj, T ve B lenfositler, granüosit, mastosit, kondrosit ve osteoblast hücreleri de IL-6 salgırlar. Fizyolojik olarak IL-1 $\beta$ , bakteri endotoksinleri, TNF- $\alpha$  ve PDGF tarafından da salgılanması uyarılmaktadır. Ayrıca IL-6 kendisi salgılanmasını stimule veya inhibe edebilir.

IL-6, B lenfositlerin farklılaşmasını ve T lenfositlerin de aktivasyonunda rol alır. IL-2 ile beraber matür veya immatür T lenfositlerin sitotoksik T lenfositlere farklılaşmasını sağlar. Bundan başka IL-4 ile etkilenmesinden sonra IL-6, B lenfositlerin son farklılaşmasında görev yapıp bunların salgılayıcı plazmositlere dönüşmesinde görev alır. B lenfositlerin popülasyonuna bağlı olarak antikorların salgılanmasını uyarır. Bu oran 120 ile 400 kat arasında artmaktadır. Son olarak IL-6'nın IL-3 ile sinerjik etki göstererek hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu in vitro olarak arttırdığı tespit edilmiştir.

IL-6 immün hücrelerin uyarılmasında, dolayısıyla enflamasyon, yıkım ve remodeling olaylarında önemli görevler yapmaktadır (45).

#### **2.3.4.3. TNF- $\alpha$ (Tümör Nekroze Edici Faktör $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$ , bakteriyel endotoksin istilası sonucu meydana gelen enflamasyonda ilk salgılanan sitokinlerdendir. Bakteriyel antijenler tarafından aktivasyon sağlandıktan sonra bu faktör monosit/makrofaj, nötrofil, polimorfonükleer lökosit ile T lenfositler tarafından salgılanmaktadır. Salgılanma miktarı IL-6 ve TGF- $\beta$  tarafından kontrol edilmektedir.

TNF- $\alpha$ , monositleri aktive eder ve fibroblastların remodeling kapasitesini stimule eder. Bu faktör fagositoz ile nötrofil sitotoksitesini arttırarak IL-1 ile IL-6 gibi mediatörlerin salgılanmalarını ayarlar (45).

#### **2.3.4.4. IL-4 (Interlökin 4)**

IL-4, başlıca aktive olan T hücrelerinin bir alt grubu tarafından salgılanmakta, bu hücreler aynı anda IL-6'yı da salgılamaktadırlar. IL-4, aktive olan B hücrelerin proliferasyon ile farklılaşmasında görev almaktadır.

Esas görevi iyileşme esnasında enflamasyon olayı cereyan ederken, enflamasyonun şiddetini azaltmaktır (45).

#### **2.3.4.5. VEGF (Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü)**

VEGF, bilinen vasküler büyüme faktörleri arasında en güçlü ve en çok bulunan faktördür. Epitel hücrelerin proliferasyon, migrasyon, özelleşme gibi görevlerinde başlıca kontrol görevi yapmaktadır. Bu faktör tek başına anjiogenezisin başlaması ve bu sitokinin izoformları ağın büyümesi için yeterlidir (45).

#### **2.3.5. Trombositten Zengin Fibrinin Avantajları**

1. Alıcı ve verici alanda operasyon sırasında ve sonrasında kanamanın azalması.
2. Yumuşak doku iyileşmesinin hızlandırılmasına yardımcı olması.
3. Adeziv (Yapıştırıcı) etkisi sayesinde alıcı sahadaki greft materyalinin stabilitesini artırması.
4. Büyüme faktörleri sayesinde iyileşmekte olan dokuların vaskülarizasyonunun hızlandırılması.
5. Kemik replasman materyalleri ile kombine kullanılarak rejenerasyonun artırılmasını sağlaması.
6. Toksik olmaması.
7. Orijinal donörden alındığında otojen materyal olduğu için immün ve allerjik reaksiyonlara sebep olmaması
8. Operasyon sırasında veya öncesinde kısa sürede hazırlanması (Operasyon sırasında zaman kaybına neden olmaz).
9. Doku uyumlu olması.
10. Enfeksiyöz hastalıkların geçiş riskinin bulunmaması.

- 11 İçindeki lokosit ve bunlar tarafından salgılanan sitokinler sayesinde enflamasyon olayını kontrol etmesi ve enfeksiyonu baskılaması (40, 41, 45, 46).

### 3 GEREÇ VE YÖNTEM

GATA Araştırma Bilimsel Kuruluna 08 Ekim 2008 gün ve AR-2008/41 başvuru numarası ile yapılan araştırma başvurumuz, GATA Araştırma Bilimsel Kurulu'nca incelenerek 23 Ocak 2009 gün ve 01 sayılı toplantısında onaylandı. Araştırmanın deney aşamasına başlanmadan önce, GATA Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'nun 24 Ekim 2008 gün ve 8 sayılı toplantısında aldığı 08/61 no'lu kararı ile gereken hayvan etiği açısından uygunluk onayı alınmıştır. Araştırmamız GATA Diş Hekimliği Bilimleri Merkezi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı, GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Deney Hayvanları Kısmı, Adana Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki Araştırma Laboratuvarı ve GATA ile Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dallarında yürütüldü.

Çalışmada GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Deney Hayvanları Kısmı tarafından temin edilen ortalama ağırlıkları  $60\pm 5$  kg ve yaşları 8 ay olan üç adet erkek domuz kullanıldı. Çalışmamızda denek hayvan sarfını azaltmak amacı ile domuzların sağ ve sol tibia kemikleri kullanıldı.

Çalışmada hayvanın kulak veninden alınan kandan elde edilen otojen TZF ile boyutları 1000-2000  $\mu\text{m}$  arasında olan  $\beta$ -TCP (kasios®TCP, France) greft materyali kullanıldı.

Her tibiada 5 mm çapında ve 5 mm derinliğinde dört adet suni defekt hazırlandı. Oluşturulan bu defektler kullanılan materyallere göre dört gruba ayrıldı. Grupların dağılımı aşağıdaki gibidir:

1. Grup: Defekt boş bırakıldı.
2. Grup: Defekt içine TZF yerleştirildi.
3. Grup: Defekt içine TCP yerleştirildi.
4. Grup: Defekt içine TZF ve TCP karıştırılarak yerleştirildi (Tablo 3.1.).

Standardizasyon amacıyla TZF hazırlanması ve operasyonlar aynı cerrah tarafından yapıldı.

Tablo 3.1. Oluşturulan defektler ve içlerine konulan maddeler.

Sıra No	Operasyon Bölgesi	Kavite No	Kaviteye Konulan Maddeler
1	1.Hayvan Sağ Tibia	Birinci	Boş
2	1.Hayvan Sağ Tibia	İkinci	TZF
3	1.Hayvan Sağ Tibia	Üçüncü	TCP
4	1.Hayvan Sağ Tibia	Dördüncü	TZF+TCP
5	1. Hayvan Sol Tibia	Birinci	Boş
6	1. Hayvan Sol Tibia	İkinci	TZF
7	1. Hayvan Sol Tibia	Üçüncü	TCP
8	1. Hayvan Sol Tibia	Dördüncü	TZF+TCP
9	2.Hayvan Sağ Tibia	Birinci	Boş
10	2.Hayvan Sağ Tibia	İkinci	TZF
11	2.Hayvan Sağ Tibia	Üçüncü	TCP
12	2.Hayvan Sağ Tibia	Dördüncü	TZF+TCP
13	2. Hayvan Sol Tibia	Birinci	Boş
14	2. Hayvan Sol Tibia	İkinci	TZF
15	2. Hayvan Sol Tibia	Üçüncü	TCP
16	2. Hayvan Sol Tibia	Dördüncü	TZF+TCP
17	3.Hayvan Sağ Tibia	Birinci	Boş
18	3.Hayvan Sağ Tibia	İkinci	TZF
19	3.Hayvan Sağ Tibia	Üçüncü	TCP
20	3.Hayvan Sağ Tibia	Dördüncü	TZF+TCP
21	3. Hayvan Sol Tibia	Birinci	Boş
22	3. Hayvan Sol Tibia	İkinci	TZF
23	3. Hayvan Sol Tibia	Üçüncü	TCP
24	3. Hayvan Sol Tibia	Dördüncü	TZF+TCP

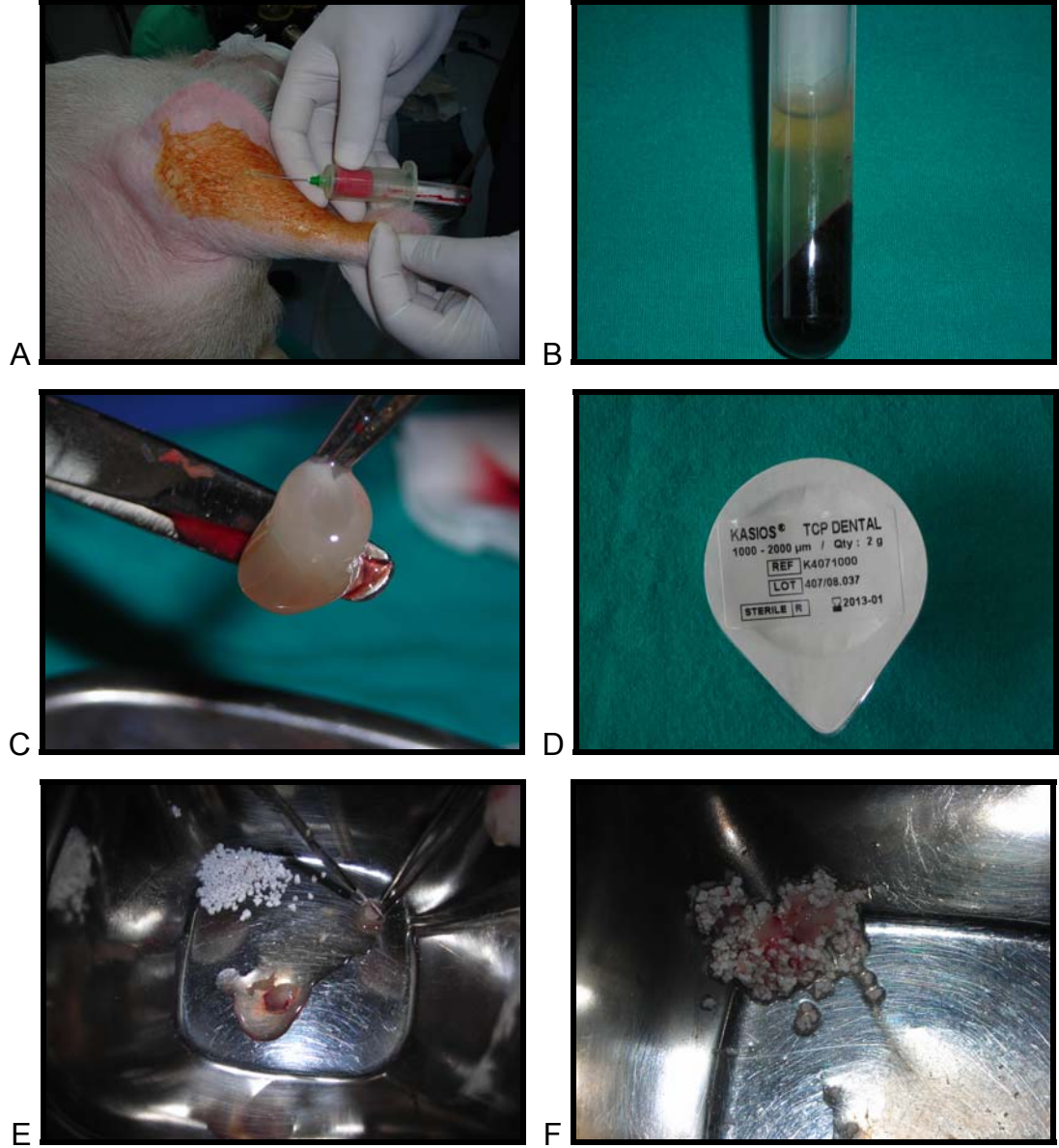
### **3.1. Trombositten Zengin Fibrinin Elde Edilmesi**

TZF elde etmek için her operasyondan önce sitrat içermeyen vakumlu cam steril tüpüne cerrahi işlem yapılacak olan domuzun kulak veninden 10 cc kan alınarak bekletilmeden 10 dakika süreyle 400 g'de santrifüje edildi (Nüve marka, NF 800 model santrifüj cihazı kullanıldı). Rölatif santrifüjleme gücü (g)=28.38xR (rpm/1000)<sup>2</sup>) formülü kullanılarak hesaplandı. (R: santrifüj rotorunun inch cinsinden yarıçapıdır). Santrifüj işleminden sonra tüpte üç tabaka oluştu (üst kısımda plazma, orta kısımda TZF ve alt kısımda da şekilli kan elemanlarından oluşan tabaka). Hayvanların operasyon bölgeleri steril örtüler ile kapatılırken kulak veninden kan alınıp, her operasyon tarafı için ikişer tüp TZF hazırlandı. TZF'nin cam tüpten çıkarılmadığı sürece yaklaşık 2 saat çalışma süresi vardır. Tüplerden biri tek başına ikinci kavitede kullanılırken, ikinci tüpteki TZF şekilli kan elemanlarından ayrıldıktan sonra bistüri ile küçük parçalara ayrılıp, % 50 oranında TCP ile karıştırıldı ve dördüncü kaviteye uygulandı (Şekil 3.1.).

### **3.2. Trikalsiyum Fosfat Greft Materyalinin Hazırlanması**

Çalışmamızda greft materyali olarak sentetik fosfokalsik seramiklerden  $\beta$ -Trikalsiyum Fosfat'ın ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) 1000-2000  $\mu\text{m}$  boyutundaki partikülleri kullanıldı.

Kasios (kasios®TCF, France) marka TCP steril iki kaba boşaltılarak birinci greft materyali serum fizyolojik ile karıştırılarak üçüncü kaviteye uygulandı. İkinci greft kısmı da TZF ile karıştırılarak dördüncü kaviteye uygulandı (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. TZF ve TCP'nin hazırlanması. A: Kulak veninden kan alınması, B: TZF'nin cam tüpteki görüntüsü, C: TZF'nin makas ile şekilli kan elemanlarından ayrılması, D: Kullanılan TCP greft materyali, E: TZF'nin bistüri ile parçalanması, F: TZF ile TCP'nin karıştırılması.

### 3.3. Cerrahi İşlemler

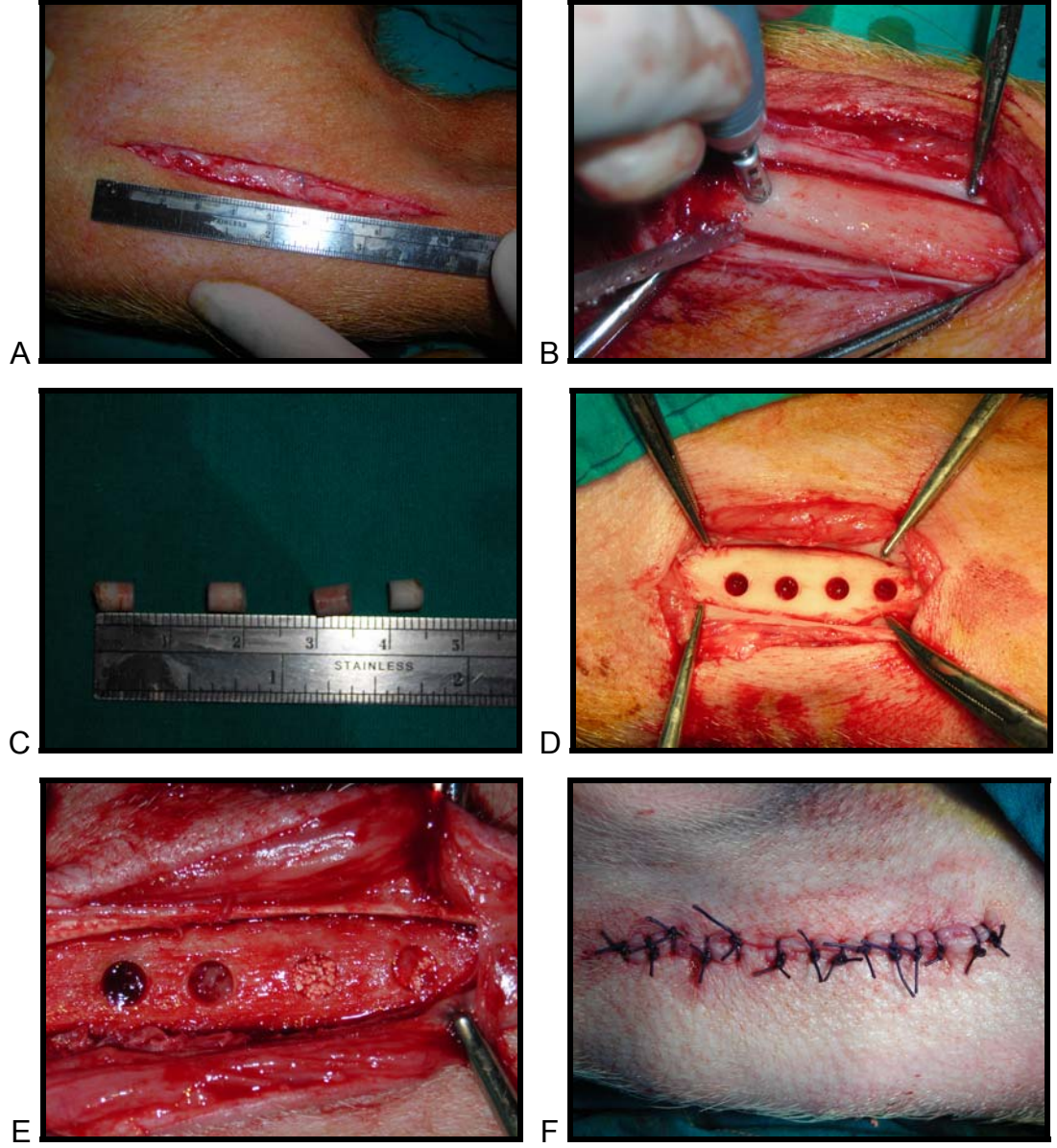
Cerrahi işlemlere başlanmadan önce deneklere premedikasyon amacı ile intramusküler sedatif olarak %2'lik Alfazyne (xylazine) (Alfasan Intl. B.U., Woorden Holland) 2 mg/kg ve %10'luk Alfamine (ketamin HCl) (Alfasan Intl. B.U., Woorden Holland) 20 mg/kg uygulandı. Damar yolu açıldıktan sonra, induksiyon sağlanması amacı ile 20 mg Diprivan (propofol) (AstraZeneca Pharmaceuticals LP, Caponga, Italy) I.V. enjekte edilip, hayvanlar entübe edildi ve denekler Sevorane (sevofluran) (Abbot Laboratories Ltd., England) ile anestezi altına alınarak solunum desteği sağlandı.

Derin anestezi sağlandıktan sonra tibianın medial bölgesindeki deri tıraş edildi ve dezenfeksiyon amacı için polivinilpirolidon iyot (Batticon %10, Adeka İlaç ve Kimyasal Ürünler San. ve Tic. A.Ş.) ile silindi. Operasyon bölgesi dışındaki tüm yüzeyler steril örtüler ile kapatıldı. Tibianın medial yüzeyine uzunlamasına yaklaşık 7 cm'lik bir cilt insizyonu yapılarak sırası ile bağ dokusu, yağ dokusu, kas dokusu ve periost diseke edilerek kemik açığa çıkarıldı. Kemik yüzeyinde çalışma yapılacak alan ekarte edilerek 5 mm çapında 5 mm derinliğindeki kaviterler serum fizyolojik irrigasyonu altında tibia kemiğine proksimalden distale doğru standart trefen frez ile dört adet delik açılarak medullaya kadar ulaşıldı. Delikler arasında 10 mm'lik aralıklar bırakıldı. Kaviterler oluşturulduktan sonra, defektler oluşturulmadan hazırlanan TZF materyallerinden birincisi cam tüpten penset ile çıkarılıp alt kısma yapışık olan kan hücreleri tabakası makas ile kesilerek ikinci kaviteye yerleştirildi. Üçüncü kaviteye TCP greft materyali ve son kaviteye de ikinci tüpteki TZF bistüri ile parçalara ayrılıp TCP ile karıştırılarak elde edilen karışım konuldu. Tüm greft materyalleri yerleştirildikten sonra sırası ile periost ve kas dokuları karşılıklı yaklaştırılarak 3/0 Vicryl (poliglaktin 910) (Ethicon, Johnson & Johnson Intl., Brussels, Belgium) ile suture edildi. Son olarak cilt 2/0 Prolene (polipropilen) (Ethicon, Johnson & Johnson Intl., Brussels, Belgium) ile primer kapatıldı (Şekil 3.2.). Sütür işlemi tamamlandıktan sonra yara yerinin üzerine Piyedif (Sanofi Doğu ilaç, İstanbul, Türkiye) dezenfektan sprey sıkılıp, enfeksiyon profilaksisi amacıyla tüm deneklere operasyon esnasında 10 mg/kg, operasyondan sonraki beş

gün boyunca da intramusküler olarak 7.5 mg/kg Pan Terramycin (Oksitetrasiklin), (Pfizer İlaçları Ltd. Şti., Ortaköy-İstanbul, Türkiye) uygulandı. Analjezik ve antiinflamatuvar olarak da operasyon sonlandırılmadan başlamak üzere 0.3 mg/kg Maxicam (Meloksikam), (Sanovel İlaç San. ve Tic. A.Ş., Silivri-İstanbul, Türkiye) deri altı olarak beş gün uygulandı.

Hayvanların bakımları ve beslenmeleri GATA Araştırma ve Geliştirme Merkezi Deney Hayvanları Kısmı bakım sorumluları tarafından veteriner hekim kontrolünde sağlandı. Denekler operasyondan 12 hafta (3 ay) sonra sakrifiye edildi.

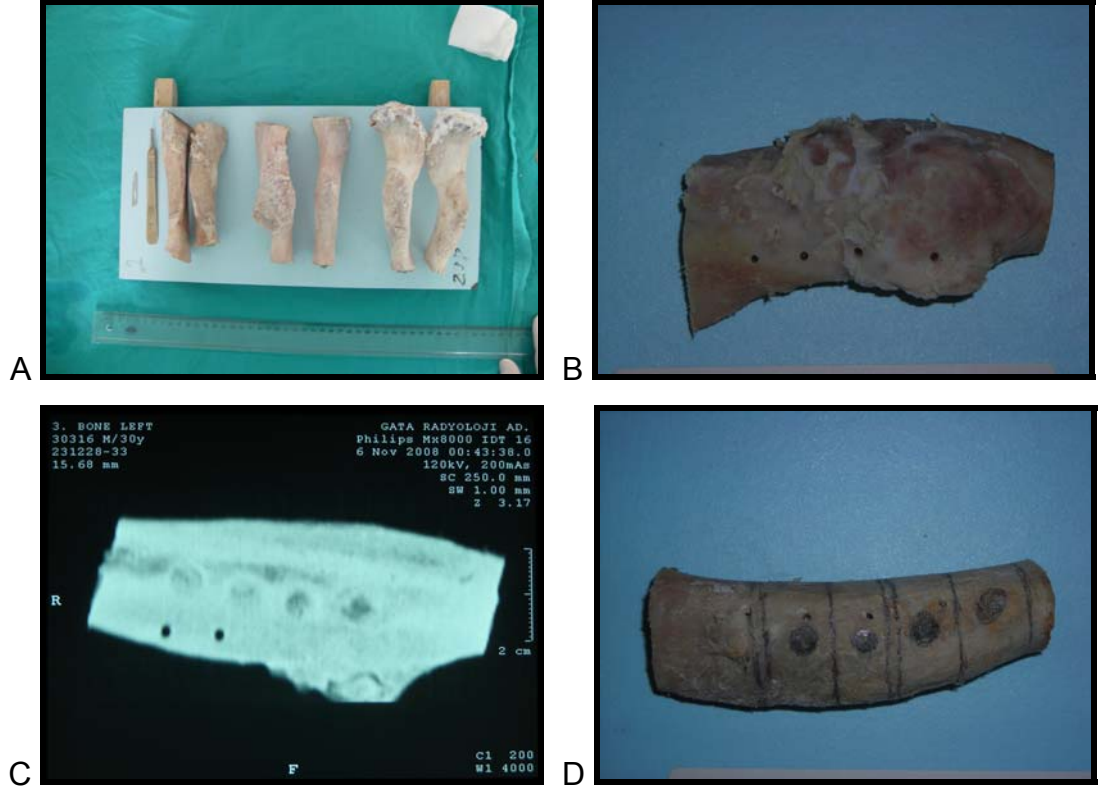
Sakrifikasyon amacı ile hayvanlara xylazin HCl ve ketamin HCl IM uygulandıktan sonra intravenöz yolla yüksek doz pentobarbital (>150 mg/kg) uygulanarak deneklerin tibiaları ampute edildi.



Şekil 3.2. Cerrahi aşamalar. A: İnsizyon, B: Kaviterin trefen frez ile hazırlanması, C: Çıkarılan kemik parçaları, D: Kaviterin tamamlanmış hali, E: Kaviterin greft materyalleri ile doldurulmuş durumu, F: Operasyon bölgesinin primer kapatılması.

### 3.4. Defekt Alanlarının Tespiti

Ampute edilen tibialar üzerindeki tüm kas ve periost yapışıklıkları temizlendi. Tibianın medial yüzeyinde defekt oluşturulan bölgelerde 1-8 mm arasında değişen oranlarda kemikte kalınlaşmalar görüldü. Bunlardan dolayı, yapılan makroskopik incelemelerde defektler tespit edilemedi. Oluşturulan kavitelelerin tespiti için çıkarılan kemiklerin proksimal ile distal kısımlarından güvenlik payı bırakılarak fazla kemik kısımları uzaklaştırıldı ve kemik sagittal olarak ikiye ayrılıp gerekmeyen lateral kısımlar çıkarıldı. Böylece kemikler hem kortikal, hem de meduller açılardan incelenebildi. Muhtemel kavitelere denk gelmeyecek şekilde kemiklere rond frez ile girilerek dörder adet rehber nokta açıldı ve Philips marka Mx 8000 IDT 16 dedektörlü multislice bilgisayarlı tomografi cihazı ile kemiklerin üç boyutlu çekimleri yapıldı. Defekt bölgeleri tespit edildi ve bu bölgeler kurşun kalem ile kemiklerin medial yüzlerinde işaretlenip (Şekil 3.3.), her defektin 2-3 mm proksimal ve distalinde sağlam kemik dokusu kalacak şekilde separe ile kesimler yapıldı. Örneklerin karışmaması için çıkarılan parçalar frezlerle birden yirmi dörde kadar işaretlendi ve her örnek ayrı kaplarda olmak üzere %10 tampon formalin solüsyonuna yerleştirildi.



Şekil 3.3. Defekt alanlarının tespiti. A: Ampute edilen tibialar, B: Proksimal, Distal ve Lateral fazla kısımları çıkarıldıktan sonra kemiğin görüntüsü, C: Defektlerin tomografik görüntüsü, D: Kemiğin medial yüzünde defektlerin izdüşümsel olarak işaretlenmesi.

### **3.5. Örneklerin Hazırlanması**

Kemik dokusunun incelenmesi için kullanılan klasik yöntem kemiğin asit solüsyonlarında dekalsifiye edilerek parafine gömülmesidir. Ancak dekalsifikasyon aşamasında dikkatsiz davranılması durumunda kemiğin inorganik içeriğinin yanı sıra organik içeriği de zarar görmektedir. Çalışmamızda dekalsifikasyon işlemi ile kemik matriksinde meydana gelebilecek hasarı önlemek, sert ve yumuşak dokuların bir arada izleyebilmek için Donath ve Breuner'in 1982 yılında geliştirdikleri kesme-inceleme tekniği yöntemi kullanıldı. Bu yöntem; fiksasyon, dehidratasyon, plastik infiltrasyon, gömme ve polimerizasyon, blokların hazırlanması, yüzey hazırlığı, paralel slayt yapıştırılması, ayırma kesisi, son ince kesitin hazırlanması ve boyama aşamalarından oluşmaktadır.

#### **3.5.1. Fiksasyon**

Örnekler fiksasyonu için %10 tamponlu nötral formalin solüsyonu kullanıldı. Bu solüsyonlarda örnekler plastik kapalı kaplarda 24 saat bekletilerek fikse edildiler. Bu işlem sonunda dehidratasyon aşamasına geçilmeden önce çeşme suyu altında 30 dakika boyunca yıkandılar.

#### **3.5.2. Dehidratasyon**

Formalin solüsyonundan çıkarılıp çeşme suyu altında 30 dakika boyunca yıkanan örnekler dehidratasyon amacı ile Exakt 510 (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Kg of Norderstedt, Germany-dehydration ve infiltration system) içindeki kafeslere konularak dehidratasyon infiltrasyon sistemi içine yerleştirildiler. Burada kademeli olarak artan derişimlerdeki (%70, 80, 90, 96 ve 99,9) etil alkol solüsyonları içerisinde, her bir derivasyonda 24 saat bekletildiler (Şekil 3.4.).

#### **3.5.3. Plastik infiltrasyon**

Alkol solüsyonundan çıkartılan örnekler vakum altında çalışan Exakt 510 (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Kg of Norderstedt, Germany) infiltrasyon cihazına yerleştirildi ve Technovit 7200 VLC rezin ile karanlık

ortamda muamele edilerek 24 saat süre ile bekletildi. İnfiltrasyonun tam olarak sağlanmasının güçlüğünden dolayı örnekler burada rezinin derin dokulara kadar ulaşması ve hava kabarcıklarının tamamen uzaklaşması sağlandı (Şekil 3.4.).

#### **3.5.4. Gömme ve Polimerizasyon**

Plastik infiltrasyonu tamamlanan örnekler gömme kalıplarına yerleştirildiler. Bu kalıplar Technovit 7200 VLC rezin ile doldurulduktan sonra tekrar vakumlandılar ve polimerizasyon işlemine başlandı. Polimerizasyon işleminde Exakt 520 (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Kg of Norderstedt, Germany) ışık polimerizasyon ünitesi kullanıldı. Polimerizasyon işleminde öncelikle dört saat boyunca 580 nm dalga boylu düşük yoğunluklu sarı ışık uygulayarak başlandı. Daha sonra da 450 nm dalga boylu yüksek yoğunluklu mavi ışık 10 saat süre ile uygulandı. Polimerizasyon işlemi ekzotermik bir tepkime olduğundan sıcaklığın 40°C'in altında tutulması sağlandı (Şekil 3.4.).

#### **3.5.5. Blokların Hazırlanması**

Polimerize olan doku bloğu gömme kalıbından çıkartıldı. Plastik bloğun düzgün yüzeyi benzin ile silindikten sonra üzerine bir damla Technovit 7210 yapıştırıcı (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) damlatıldı. Exakt 402 vakumlu yapıştırma sistemine (Exakt Apparatebau GmbH & Co., Kg of Norderstedt, Germany) pleksiglas yerleştirildikten sonra blok ile pleksiglas yapıştırıldı. Yapıştırıcının homojen olarak dağılması için 30 saniye beklendi. Polimerizasyonu için adeziv presin ışığı açıldı ve 15 dakika boyunca mavi ışık uygulandı (Şekil 3.4.).

#### **3.5.6. Yüzey Hazırlığı**

Pleksiglase yapıştırılan bloklar defekt alanları kesi hattının ortasında kalacak şekilde hassas kesme sistemi (Exakt 300 CP, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) ile kesildi (Şekil 3.4.). Daha sonra 1.200 gritlik su zımparası yerleştirilmiş olan mikro inceltme sistemine (Exakt 400 CS, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) konuldular. İşlem

tamamlandığında bloğun açığıdaki yüzeyi pleksiglas yüzeyine paralel hale geldi. Paralellik sağlandıktan sonra 2.500 gritlik su zımparası ile yüzeyi parlatıldı.

### **3.5.7. Paralel Pleksiglas Yapıştırılması**

Paralel yapıştırma öncesinde blokların yüzeyleri organik bir solüsyon olan benzin ile silindi. Yapıştırma ünitesindeki vakumlu bölgeye pleksiglas yerleştirildikten sonra örneğin bulunduğu pleksiglas ünitenin alt plakasına yerleştirildi. Aralarına ışıkla polimerize olan yapışkan rezin damlatıldıktan sonra aralarında plastik blok bulunan paralel pleksiglaslar yapıştırıldı. Polimerizasyon için 15 dakika beklendi (Şekil 3.4.).

### **3.5.8. Ayırma Kesisi**

Paralel pleksiglas, Exakt kesme-inceltme sistemi (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) içinde bulunan vakum aparatına tutturuldu. Vakum aparatına tutturulan pleksiglas tarafında örnek bulunmaktaydı. Elmas testere pleksiglas yüzeyinde sıfırlandıktan sonra mikrometrelili ayar kolu ile testere-pleksiglas arası mesafe 300 µm olacak şekilde ayarlandı. Sistemin soğutma suyu açılarak motor çalıştırıldı. Kesme işlemi tamamlandıktan sonra paralel pleksiglaslar ayrıldı. Çalışılacak örneğin bulunduğu pleksiglas vakum aparatından ayrıldı.

### **3.5.9. Son İnce Kesitin Hazırlanması**

Kesitin kalınlığının ölçülmesi için pleksiglas kalınlığı kumpas ile ölçüldü. Sıfırlandıktan sonra toplam kalınlık ölçüldü. Yapıştırıcı kalınlığı ortalama 30–40 µm olarak tespit edildi. Toplam kalınlıktan pleksiglas ve yapıştırıcı kalınlığı çıkartılarak örneğin kalınlığı ortaya çıkarıldı. Bu değerden son istenilen değer çıkartılarak mikro inceltme sistemi için referans inceltme kalınlığı belirlendi. Bu değer sistem kontrol bilgisayarına girilerek inceltme işlemine başlandı. İşlem sırasında kademeli olarak 1.000, 1.200, 2.500 ve 4.000 gritlik su zımparaları kullanıldı. İnceltme işlemi tamamlandığında 40 µm kalınlığında kesitler elde edildi (Şekil 3.4.).



Şekil 3.4. Kesme-İnceltme yönteminde kullanılan cihazlar. A: Vakumlu dehidratasyon ve infiltrasyon ünitesi, B: Vakumlu ve ışıklı reinfiltrasyon ünitesi, C: Polimerizasyon ünitesi, D. Vakumlu ve ışıklı yapıştırma sistemi, E: Hassas kesme sistemi, F: Mikro aşındırma sistemi.

### **3.5.10. Boyama**

Hazırlanan kesitler öncelikle %10'luk hidrojen peroksit solüsyonu içerisinde beş dakika süre ile çalkalandılar. Solüsyondan çıkartılan kesitler distile su ile tamamen durularak kurumaya bırakıldılar. Kurutma işleminden sonra örneklerin üzerine doku kesitinin üzerini tamamen örtecek şekilde Toluidine Blue (TB) boyama solüsyonu (Fluka Chemie GmbH, Switzerland) damlatılıp 20 dakika süre ile beklendi. Boyama işlemi tamamlandıktan sonra distile su ile durulandı ve fazla boyanın tamamen uzaklaşması sağlandı. Kuruması için 12 saat beklendi ve üzerlerine üzerine bir damla Technovit 7210 yapıştırıcı (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) damlatıldı, lamel ile kapatılıp polimerizasyonu için adeziv presin ışığı açıldı ve 15 dakika boyunca mavi ışık uygulandı.

### **3.6. Histolojik İnceleme**

Hazırlanan preparatlardan histolojik değerlendirme yapılması amacı ile fotoğraflar Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD'daki araştırma laboratuvarında Olympus BX 50 ışık mikroskobu ile buna bağlı Olympus DP 70 kamera, GATA Histoloji ve Embriyoloji AD'da Nikon Eclipse E600 ışık mikroskobu (Nikon Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) ile buna bağlı Olympus Camedia C 4040 dijital kamera (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japan) ve Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da Leica DM 4000 B ışık mikroskobu ile buna bağlı Microfire by Optronics marka kamera ile alındı. Alınan görüntüler kişisel bilgisayara aktarıldı. Histolojik inceleme 2.5x, 4x ve 10x optik büyütme altında gerçekleştirildi.

Preparatlarda ayrıca tüm alanların aynı anda değerlendirilebilmesi ve alan hesaplamasının yapılabilmesi için Hacettepe Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD'da Leica DM 4000 B ışık mikroskobu kullanılarak Microfire by Optronics marka adaptör ile görüntüler alındı. Alan 2.5x objektif ile trace edilerek planimetrik ölçüm alındı. Bu işlemde kesitin tamamı etrafındaki boş alanı da kapsayacak şekilde işaretlenip preparattaki kesitin büyüklüğüne bağlı olarak 17 ile 30 dijital fotoğraf çekilerek kesitin tamamı tek bir fotoğraf

olarak birleştirildi. Elde edilen görüntüler MBF Stereo Investigator yazılımı ile kişisel bilgisayara aktarıldı. Yazılımdaki Stereoloji Sistemi kullanılarak alan ölçmek için “Nokta Sayım Metodu” (Cavalieri) kullanıldı. Kalibrasyon her birim için  $500 \times 500 = 250.000 \mu\text{m}^2$  olarak ayarlandı. Defekt alanına denk gelen kısımdaki alanın tamamı incelenerek yeni kemik dokusu ile henüz kemikleşmemiş alanlar (fibrotik bağ dokusu alanları) farklı renklerde işaretlenip alan hesaplamaları yapıldı.

### **3.7. İstatistiksel İnceleme**

Cavalieri yöntemi ile elde edilen bulgulardan yararlanarak alan hesaplamaları yapıldı. Deneklerden elde edilen kavitelerdeki kemikleşmiş ve henüz kemikleşmemiş alanlara ilişkin bilgilere ait tanımlayıcı istatistikler en küçük – en büyük ve ortalama  $\pm$  standart sapma değerleri ile gösterildi. Tedavi gruplardaki kemikleşme alanı değişimlerini karşılaştırabilmek amacı ile denek sayılarının düşüklüğünden ve ölçüm değerlerinin normal dağılıma uymaması nedeni ile Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Varyans analizi sonucunda istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunduğu, farkın kaynağını bulabilmek amacı ile post-hoc test olarak Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney testi ile ikili karşılaştırmalar yapıldı. Tüm istatistiksel analiz ve hesaplamalar için Ms-Excel ve SPSS for Win. Ver. 15.00 (SPSS Inc., Chicago, IL., USA) paket programlarından faydalanıldı. İstatistiksel kararlarda  $p \leq 0.05$  seviyesi anlamlı farklılığın göstergesi olarak kabul edildi.

## 4 BULGULAR

Deney hayvanlarında operasyonlara bağlı herhangi bir enfeksiyonun gelişmediği, operasyon esnasında veya sonrasında ölüm olmadığı görüldü. Postoperatif dönemde hayvanlar ödem ve enfeksiyon açısından bir hafta süre ile takip edildi. Bu süre zarfında herhangi bir komplikasyona rastlanmadı. Sakrifikasyona kadar geçen 12 hafta boyunca deneklerin genel durumlarında olumsuz bir değişiklik, yeme bozukluğu ve kilo kaybı izlenmedi. 12 hafta sonunda hayvanlar sakrifiye edilerek tibiaları ampüte edildi.

### 4.1. Histolojik Bulgular

Ampüte edilen altı tibiadan elde edilen preparatların tamamı uzman bir histolog tarafından histolojik olarak değerlendirildi. Örneklerin tamamı incelendiğinde tüm gruplarda kaviterin kemikle dolmaya başladığı, matürasyonun değerşik safhalarda olduğu, defekt alanların üstündeki bölgelerde reaksiyonel kemik oluşumu meydana geldiği, defekt alanlarında enfeksiyona ait bir bulgu olmadığı ve osteoklastik aktivite görülmediği tespit edilmiştir. Yapılan semikantitatif histolojik değerlendirme sonucunda elde edilen bulgular aşağıda belirtildiği gibidir.

#### 4.1.1. Birinci Grup (Kontrol Grubu)

Preparatların tamamı incelendiğinde defekt alanlarının büyük kısmının immatür kemikle dolduğu izlenmiş, geri kalan kısımların fibrotik bağ dokusu ile dolu olduğu tespit edilmiş. Örneklerde osteon yapısının tam olarak oluşmadığını Volkmann kanallarının yapılanmadığını ve osteosit sayısının azlığı dikkati çekmektedir (Şekil 4.1., Şekil 4.2.).

#### 4.1.2. İkinci Grup (TZF Grubu)

Defektlerin tamamı incelendiğinde kaviterin büyük oranda yeni kemikle dolduğu izlenmiştir. Kemik matürasyonu kontrol grubuna göre daha iyi olmasına rağmen sekonder kemik doku oluşumunun olmadığı tespit edilmiştir. Defekt alanları incelendiğinde yer yer Volkmann kanalları

izlenmiştir. Havers kanalları etrafında yoğunlaşmış osteosit hücreleri görülmüştür. Hücre sayısının fazlalığına karşın lamel yapılarının düzgün olmadığı izlenmiştir (Şekil 4.3., Şekil 4.4.).

#### **4.1.3. Üçüncü Grup (TCP Grubu)**

TCP uygulanmış bu gruba ait preparatlar incelendiğinde, yeni kemik ile dolmamış boş alanların birinci ve ikinci gruba göre daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Buna karşın kemik kalitesinin (osteon lamellerinin düzgünlüğü) ilk iki gruba nazaran daha iyi olduğu izlenmiştir (Şekil 4.5.). TCP greft materyalinin partiküllerinin çok zor tespit edildiği ve bu alanların yeni kemik oluşumuna odak teşkil ettiği tespit edilmiştir. Yeni oluşan kemik dokusu arasındaki alanların eritrositlerle ve kemik iliği öncül hücreleri ile yoğun bir şekilde çevrelendiği görülmüştür. Yeni kemik oluşumu kortikal kemik sınırında daha yoğun olarak izlenmiştir (Şekil 4.6.). Trace edilerek alınan fotoğraflarda kemiğin medullasına doğru da bir kemik oluşumu meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.7.).

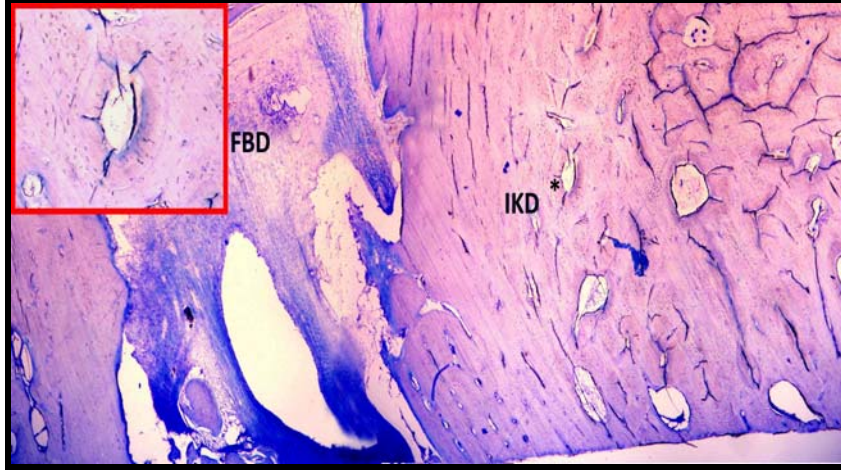
#### **4.1.4. Dördüncü Grup (TCP+TZF Grubu)**

TCP ve TZF karıştırılarak uygulanmış gruba ait preparatlar incelendiğinde yeni kemik oluşum oranının diğer gruplara nazaran daha iyi olduğu, preparatlarda birçok yerde normal osteon yapısı ile Havers kanallarını birbirine bağlayan Volkmann kanalları izlendiği tespit edilmiştir (Şekil 4.8.) Preparatların incelenmesinde TCP greft materyali tespit edilememiş, az miktardaki boş alanların da üçüncü grupta olduğu gibi yine yoğun bir şekilde eritrositlerle ve kemik iliği öncül hücreleri ile dolu olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9.). Trace edilerek alınan fotoğraflarda defekt alanının büyük kısmının yeni kemik dokusu ile dolduğu ve kemiğin medullasına doğru bir kemik oluşumu meydana geldiği tespit edilmiştir (Şekil 4.10.).

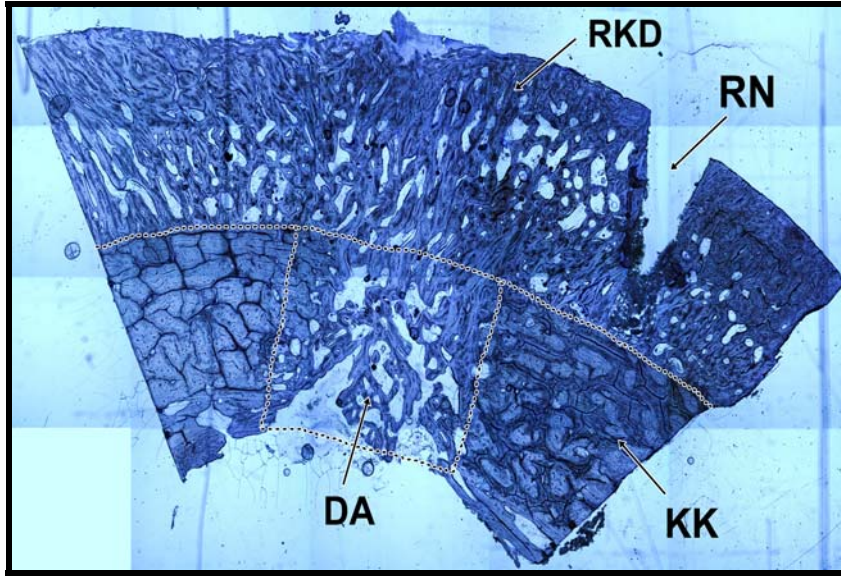
## **Grupların İncelenmesiyle Elde Edilen Bulgular Değerlendirilecek**

### **Olursa:**

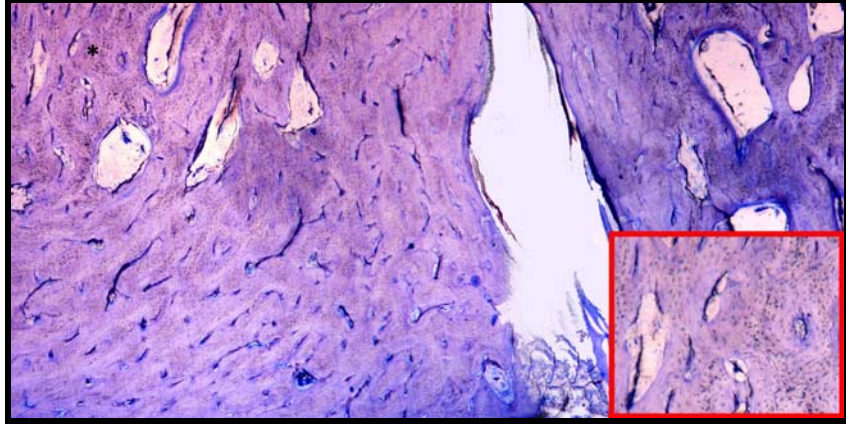
- 1 TCP+TZF uygulanmış grupta yeni kemik oluşumlarının daha fazla olduğu; lamellerin, kanaliküllerin ve osteositlerin oluşturduğu osteon yapılarının diğer gruplara oranla daha iyi olduğu,
- 2 Hiç bir greft materyalinin kullanılmadığı yani kavitenin boş bırakıldığı grupta kompakt kemik alanlarının az ve osteon yapılarının iyi olmadığı,
- 3 Tek başına TZF veya tek başına TCP uygulanmış grup beraber bu iki materyalin kullanıldığı gruptaki kadar etkin olmadığı,
- 4 Kullanılan her iki materyalin de inflamasyon ve rezorpsiyona sebep olmadığı,
- 4 TCP'nin tek başına uygulandığı gruptaki yeni kemik oluşum miktarının diğer gruplara göre daha az olduğu, ancak kemik maturasyonun iyi olduğu saptandı.



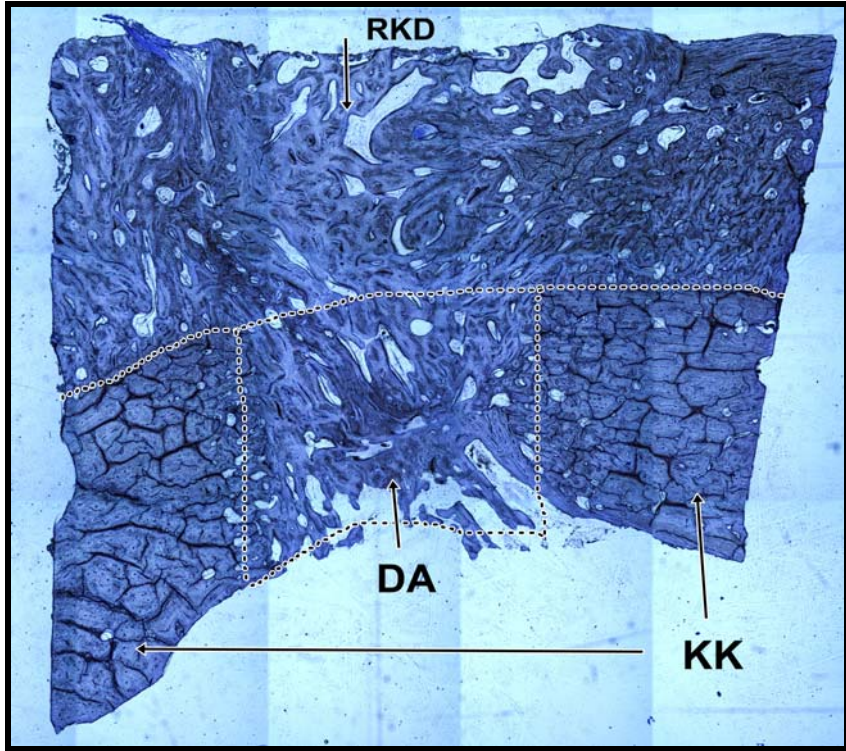
Şekil 4.1. Kontrol grubu. FBD (fibroz bağ dokusu alanı), IKD (immatur kemik dokusu), sol üstte çerçeve içine alınmış alan, (\*) olan bölgeden büyütülmüştür. Çerçeve içindeki yapıya baktığımızda osteon yapısının tam olarak oluşmadığını, Volkmann kanallarının yapılanmadığını ve osteosit sayısının azlığı dikkati çekmekte.



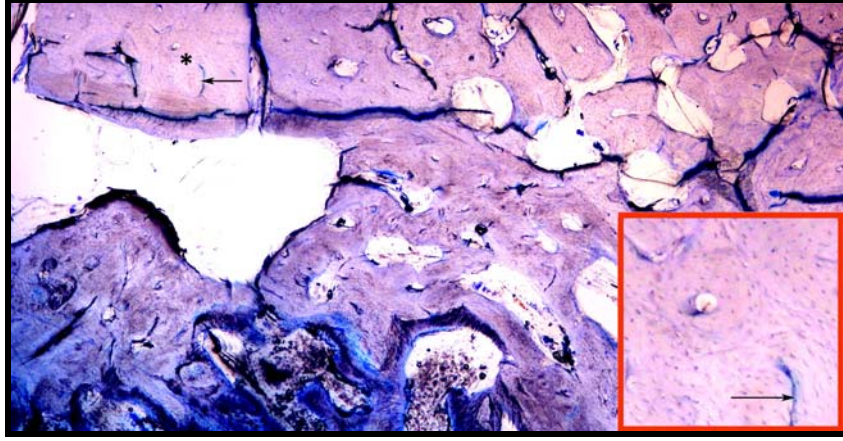
Şekil 4.2. Kontrol grubunda plenimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar. Kortikal kemiğin üstünde meydana gelen rezidüel kemik dokusu (RKD), defekt alanını tespit etmek için rond frez ile oluşturulan rehber nokta (RN), kortikal kemik (KK), defekt alanı (DA).



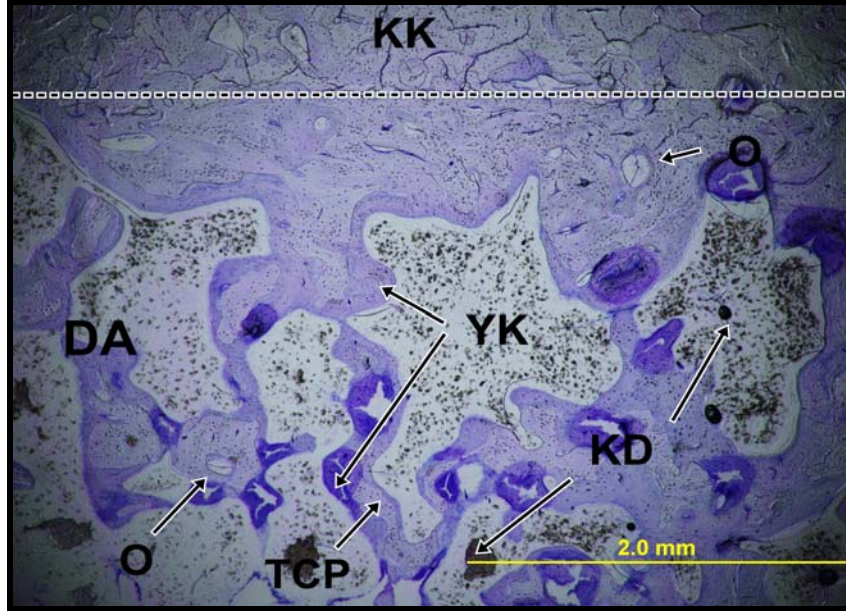
Şekil 4.3. TZF grubu. Sağ alt köşede yıldız (\*) konmuş bölgenin büyütülmüş hali izlenmekte. İnset yapılmış fotoğrafta yer yer Volkmann kanalları izlenmekte. Havers kanalları etrafında yoğunlaşmış osteosit hücreleri görülmekte. Hücre sayısının fazlalığına karşın lamel yapılarının düzgün olmadığı izlenmekte.



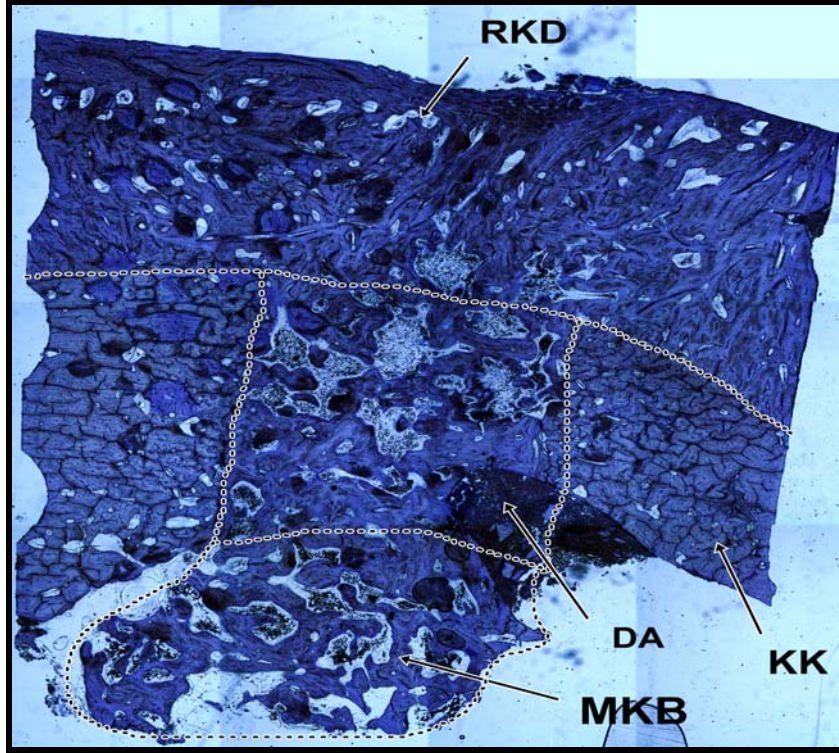
Şekil 4.4. TZF grubunda planimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar. Kortikal kemiğin üstünde meydana gelen rezidüel kemik dokusu (RKD), kortikal kemik (KK), defekt alanı (DA).



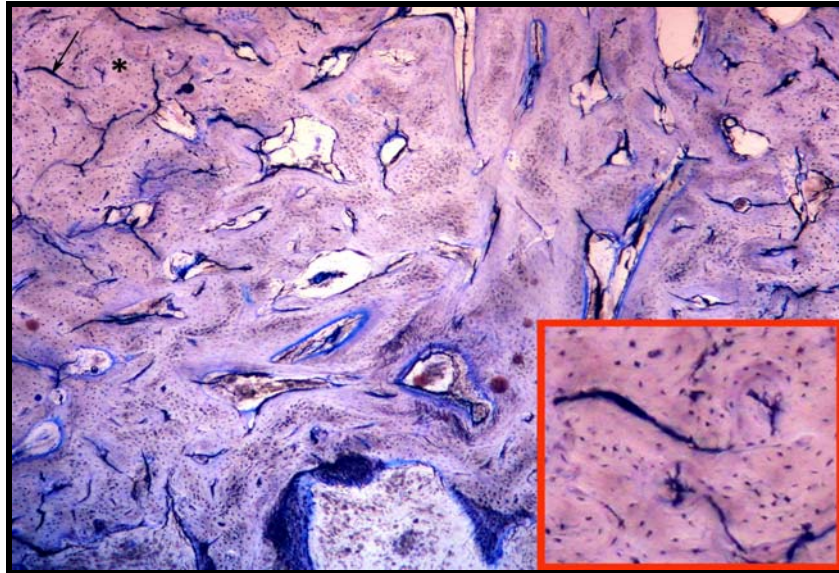
Şekil 4.5. TCP grubu. Kemik trabekülleri ve kompakt kemik alanları beraber izlenmekte. Sol üst köşede osteon (\*) ve Volkmann kanalı (ok) sağ alt köşede ise işaretli alan inset olarak gözlenmekte. Çerçeve içerisinde osteon lamellerinin düzgünlüğü dikkat çekmekte.



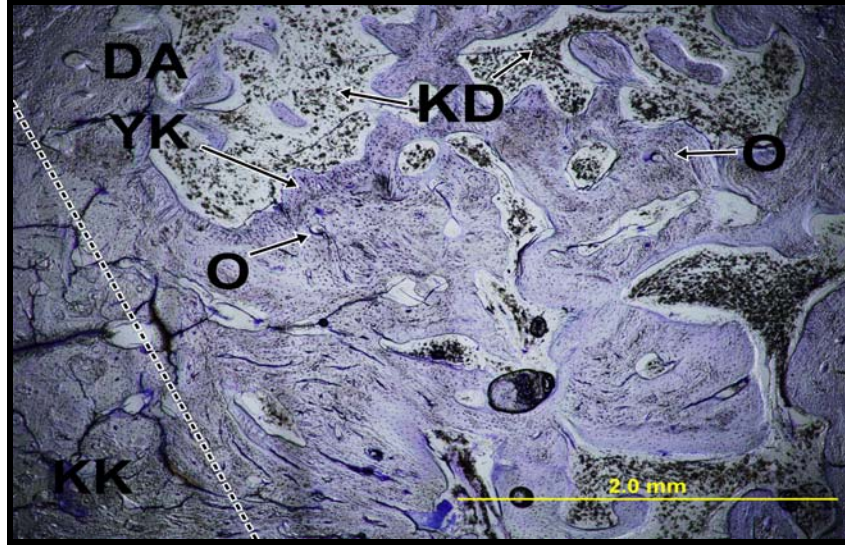
Şekil 4.6. TCP grubunda 4x objektif ile alınan fotoğraftaki oluşumlar. Üst kısımda kortikal kemik (KK), alt kısımda defekt alanı (DA) izlenmektedir. Greftlenen alanda yoğun bir şekilde eritrositlerle dolu kan damarları (KD), üstünde yeni kemik oluşumunu tetikleyen TCP greft materyalleri, bunların etrafında meydana gelen yeni kemik (YK) dokusu ile oluşmaya başlamış osteon (O) yapıları izlenmekte.



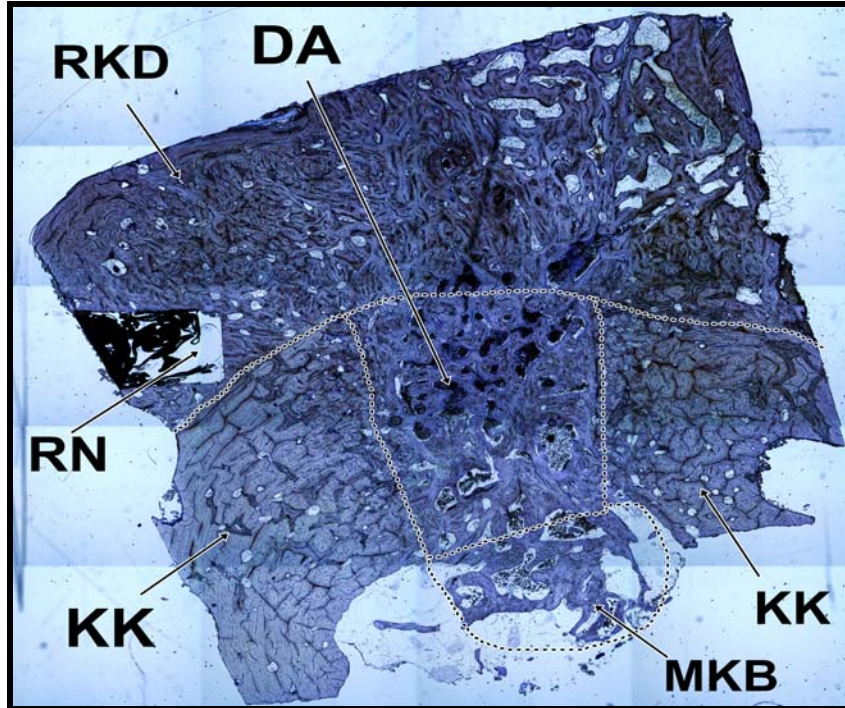
Şekil 4.7. TCP grubunda plinimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar. Kortikal kemiğin üstünde meydana gelen rezidüel kemik dokusu (RKD), kortikal kemik (KK), defekt alanı (DA), kemiğin medullasında meydana gelen kemik büyümesi (MKB).



Şekil 4.8. TCP+TZF grubu. Yıldız (\*) ile işaretlenmiş alanın inset olarak büyütülmüş hali sağ alt köşede yer almakta. Büyütülmüş fotoğrafta bir kaç normal osteon yapısı izlenmekte. Havers kanallarını birbirine bağlayan Volkmann kanalları izlenmekte.



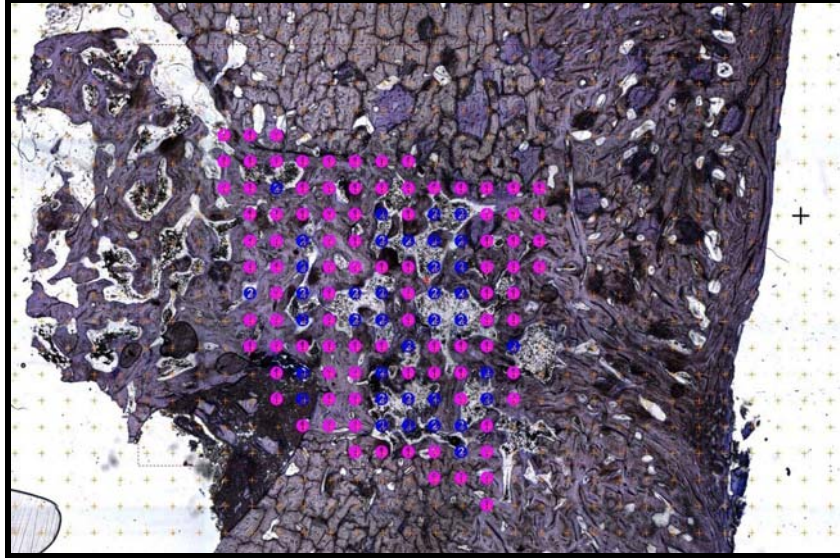
Şekil 4.9. TCP+TZF grubunda 4x objektif ile alınan fotoğraftaki oluşumlar. Alt sol kısımda kortikal kemik (KK), geri kalan alanlarda defekt alanı (DA) izlenmektedir. Greftlenen alanda yoğun bir şekilde eritrositlerle dolu kan damarları (KD), defekt alanının büyük kısmını dolduran yeni kemik (YK) dokusu ile osteon (O) yapıları izlenmekte.



Şekil 4.10. TCP+TZF grubunda plinimetrik ölçüm ile alınan fotoğraftaki oluşumlar. Kortikal kemiğin üstünde meydana gelen rezidüel kemik dokusu (RKD), defekt alanını tespit etmek için rond frez ile oluşturulan rehber nokta (RN), kortikal kemik (KK), defekt alanı (DA), kemiğin medullasında meydana gelen kemik büyümesi (MKB).

#### 4.2. Nokta Sayım Metodu İle Alan Hesaplaması

Alan hesaplaması için Kesme-İnceltme yöntemi ile elde edilen örneklerden planimetrik olarak görüntüler alındı. MBF Stereo Investigator yazılımındaki “Nokta Sayım Metodu” (Cavalieri) yöntemi ile yeni kemik ve fibrotik doku alan miktarları hesaplandı. Bu işlem için defekt alanlarının tamamı tarandı ve yeni kemik ve fibrotik alanlar farklı renklerde işaretlendi (Şekil 4.11.). Daha sonra örneklerin tamamı için veriler bilgisayara girilerek alan hesaplaması  $\mu\text{m}^2$ , Cavalieri noktası, % cinsinden ve % cinsinden ortalamalar olarak hesaplandı. Yapılan ölçümler ve elde edilen bulgular Tablo 4.1., Tablo 4.2., Tablo 4.3.ve Tablo 4.4.’de görülmektedir.



Şekil 4.11. Planimetrik ölçüm ile alınan fotoğrafta Cavalieri metodu ile alan sayımı. Defekt alanındaki yeni kemik dokuya denk gelen noktalar kırmızı, fibrotik bağ doku ile dolu alanlar mavi noktalar ile işaretlenmiştir.

Tablo 4.1. Defektlerin  $\mu\text{m}^2$  cinsinden alan miktarları.

Grup No	Alan Şekli	Kavite No			
		1.	2.	3.	4.
1.	Total	20.750.000	18.000.000	33.250.000	32.500.000
	Yeni Kemik	16.750.000	14.750.000	23.750.000	24.750.000
	Fibrotik Doku	4.000.000	3.250.000	9.500.000	7.750.000
2.	Total	16.750.000	19.500.000	26.250.000	28.750.000
	Yeni Kemik	11.250.000	13.500.000	18.000.000	20.250.000
	Fibrotik Doku	5.500.000	6.000.000	8.250.000	8.500.000
3.	Total	20.000.000	26.500.000	36.750.000	19.750.000
	Yeni Kemik	14.750.000	20.500.000	20.250.000	16.250.000
	Fibrotik Doku	5.250.000	6.000.000	16.500.000	3.500.000
4.	Total	16.500.000	18.000.000	35.250.000	29.750.000
	Yeni Kemik	12.500.000	14.250.000	18.250.000	19.000.000
	Fibrotik Doku	4.000.000	3.750.000	17.000.000	10.750.000
5.	Total	15.250.000	34.000.000	33.250.000	19.750.000
	Yeni Kemik	13.000.000	27.000.000	25.000.000	16.750.000
	Fibrotik Doku	2.250.000	7.000.000	8.250.000	3.000.000
6.	Total	25.750.000	23.250.000	30.750.000	43.750.000
	Yeni Kemik	19.750.000	19.750.000	21.750.000	36.000.000
	Fibrotik Doku	6.000.000	3.500.000	9.000.000	7.750.000

Yukarıdaki tablonun değerlendirilmesine örnek verecek olursak; 1. Grupta 1. hayvanın sağ bacağında oluşturulan defektler görülmekte. Bu gruptaki ilk defektte, yani kavitesi boş olan kavitede total alan 20.750.000  $\mu\text{m}^2$ , yeni kemik 16.750.000  $\mu\text{m}^2$  ve fibrotik doku da 4.000.000.  $\mu\text{m}^2$  olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.2. Defektlerin sayılan Cavalieri noktası cinsinden alan miktarları.

Grup No	Alan Şekli	Kavite No			
		1.	2.	3.	4.
1.	Total	83	72	133	130
	Yeni Kemik	67	59	95	99
	Fibrotik Doku	16	13	38	31
2.	Total	67	78	105	115
	Yeni Kemik	45	54	72	81
	Fibrotik Doku	22	24	33	34
3.	Total	80	106	147	79
	Yeni Kemik	59	82	81	65
	Fibrotik Doku	21	24	66	14
4.	Total	66	72	141	119
	Yeni Kemik	50	57	73	76
	Fibrotik Doku	16	15	68	43
5.	Total	61	136	133	79
	Yeni Kemik	52	108	100	67
	Fibrotik Doku	9	28	33	12
6.	Total	103	93	123	175
	Yeni Kemik	79	79	87	144
	Fibrotik Doku	24	14	36	31

Yukarıdaki tablonun değerlendirilmesine örnek verecek olursak; 2. Grupta 1. hayvanın sol bacağında oluşturulan defektler görülmekte. Bu gruptaki ikinci defekte, yani kavitesi TZF ile doldurulmuş olan alan miktarı Cavalieri noktası cinsinden verilmiş olup, kavitede total alan 78, yeni kemik 54 ve fibrotik doku da 24 Cavalieri noktası olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.3. Defektlerin % cinsinden alan miktarları.

Grup No	Alan Şekli	Kavite No			
		1.	2.	3.	4.
1.	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
	Yeni Kemik	80.7	81.9	71.4	76.2
	Fibrotik Doku	19.3	18.1	28.6	23.8
2.	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
	Yeni Kemik	67.2	69.2	68.6	70.4
	Fibrotik Doku	32.8	30.8	31.4	29.6
3.	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
	Yeni Kemik	73.8	77.4	55.1	82.3
	Fibrotik Doku	26.2	22.6	44.9	17.7
4.	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
	Yeni Kemik	75.8	79.2	51.8	63.9
	Fibrotik Doku	24.2	20.8	48.2	36.1
5.	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
	Yeni Kemik	85.2	79.4	75.2	84.8
	Fibrotik Doku	14.8	20.6	24.8	15.2
6.	Total	100.0	100.0	100.0	100.0
	Yeni Kemik	76.7	84.9	70.7	82.3
	Fibrotik Doku	23.3	15.1	29.3	17.7

Yukarıdaki tablonun değerlendirilmesine örnek verecek olursak; 3. Grupta 2. hayvanın sağ bacağında oluşturulan defektler görülmekte. Bu gruptaki üçüncü defekte, yani kavitesi TCP ile doldurulmuş olan alan miktarı % cinsinden verilmiş olup, kavitede total alan % 100.0, yeni kemik %55.1 ve fibrotik doku da %44.9 olarak ölçülmüştür.

Tablo 4.4. Defektlerin alan miktarlarının % cinsinden ortalamaları.

Alan Şekli	Kavite No			
	1.	2.	3.	4.
Total	100.0	100.0	100.0	100.0
Yeni Kemik	76.6	78.6	65.5	76.6
Fibrotik Doku	23.4	21.4	34.5	23.4

Yukarıdaki tabloda tüm örneklerin % cinsinden ortalamaları alınıp, defekt kaviteleeri bazındaki değerleri görülmektedir.

Nokta sayım (Cavalieri) yöntemi ile alan hesaplamaları sonucu ortaya çıkan bulgular değerlendirildiğinde 1., 2. ile 4. gruplar arasında yeni kemik ile fibrotik doku alan miktarları yönünden anlamlı fark tespit edilememiştir. Diğer gruplara nazaran üçüncü gruptaki yeni kemik oluşum oranı düşük, dolayısıyla fibrotik doku oranı yüksek bulunmuştur. Bu bulgular histolojik değerlendirme ile elde edilen bulgular ile örtüşmektedir.

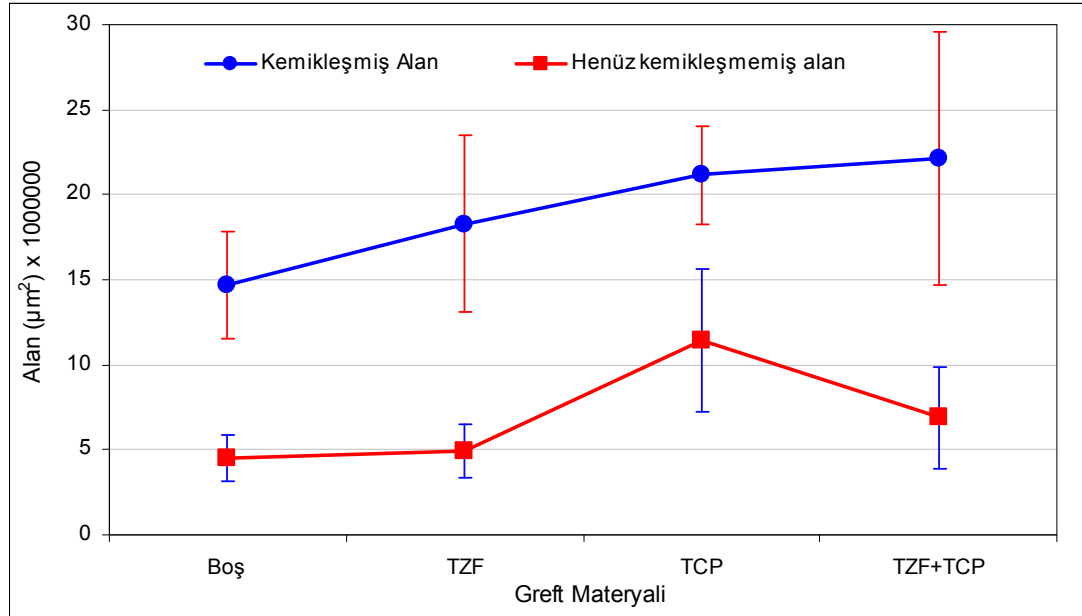
#### 4.3. İstatistiksel Bulgular

Kemik oluşumunu hızlandırmak amacı ile greft materyali uygulaması sonrasında elde edilen ölçüm değerleri ortalamaları kullanılan greft materyaline göre Tablo 4.5. ve Şekil 4.12.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Kavitelere konulan greft materyallerinin ortalama alanları.

Alan	Tedavi Grubu	En az	En Çok	Ortalama	Std. Sapma	X <sup>2</sup> (p)
Yeni kemik alanı (µm <sup>2</sup> )	Boş	11250000.00	19750000.00	14666666.67	3141125.06	8.139 (0.043)*
	TFZ	13500000.00	27000000.00	18291666.67	5189934.17	
	TCP	18000000.00	25000000.00	21166666.67	2866472.86	
	TFZ+TCP	16250000.00	36000000.00	22166666.67	7430791.79	
Fibrotik Alan (µm <sup>2</sup> )	Bos	2250000.00	6000000.00	4500000.00	1369306.39	12.217 (0.007)*
	TFZ	3250000.00	7000000.00	4916666.67	1602081.98	
	TCP	8250000.00	17000000.00	11416666.67	4161329.92	
	TFZ+TCP	3000000.00	10750000.00	6875000.00	3019726.81	
Toplam Alan (µm <sup>2</sup> )	Bos	15250000.00	25750000.00	19166666.67	3868677.64	11.114 (0.011)*
	TFZ	18000000.00	34000000.00	23208333.33	6249833.33	
	TCP	26250000.00	36750000.00	32583333.33	3710345.90	
	TFZ+TCP	19750000.00	43750000.00	29041666.67	8961607.93	

\*: Kruskal-Wallis varyans analizi sonucu istatistiksel olarak anlamlı farklılık



Şekil 4.12. Kavitelere konulan greft materyallerinin ortalama alanları (standart sapmalar ile birlikte).

Yeni kemik alanı oluşumu tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $X^2=8.139$ ;  $p=0.043$ ). Farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirleyebilmek amacı ile Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile post-hoc ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Post-hoc karşılaştırmaların sonucuna göre; hiçbir grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadığından (Bonferroni düzeltmesi sonucunda yeni kritik p değeri = yanılma düzeyi / karşılaştırma sayısı =  $0.05 / 6 = 0.0083$ ) yeni kemik oluşumu açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olmadığına karar verildi. Ortalamalara bakıldığında boş bırakılan kavite ile tedavi uygulanan kaviteler arasında oldukça fazla bir fark görünmesine karşın bu fark, hayvan deneylerinde kullanılan denek sayısına ilişkin kısıtlamalar nedeni ile istatistiksel olarak anlamlı olacak kadar büyük olmadığı görülmüştür.

Fibrotik alan oluşumu tedavi gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $X^2=12.217$ ;  $p=0.007$ ). Farkın hangi gruptan kaynaklandığını belirleyebilmek amacı ile Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney testi ile post-hoc ikili karşılaştırmalar yapılmıştır. Boş bırakılan ve TCP tedavisi uygulanan kaviteler ( $Z=2.892$ ;  $p=0.002$ ) ile TZF ve TCP ( $Z=2.892$ ;  $p=0.002$ ) uygulanan kaviteler arasında istatistiksel olarak da anlamlı farklılık görülürken, diğer tedaviler arasındaki fark istatistiksel olarak önemli değildir ( $p>0.05$ ). TCP greft materyali boş ve TZF greft materyaline göre daha fazla fibrotik alan oluşumunu sağlamıştır.

Yeni kemik alanı oluşumu ile Fibrotik alan birlikte düşünüldüğünde ise Toplam alana göre kullanılan greft materyallerinin birlikte değerlendirilmesi zorunluluğu doğmuştur. Toplam alan kullanılan greft materyallerine göre istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir ( $X^2=11.014$ ;  $p=0.011$ ). Farklılığın kaynağına bakıldığında ise; Boş kavite ile TCP greftleri arasında toplam alan açısından anlamlı farklılık bulunurken ( $Z=2.887$ ;  $p=0.002$ ), diğer greftler arasında anlamlı farklılık görülmemiştir ( $p>0.05$ ). TCP grefti kullanılan kavitelere toplam alan oluşumu diğer greft materyali kullanılan kavitelere göre oldukça fazladır ve bu fark istatistiksel olarak da önemlidir.

Kemik iyileşmesini hızlandırmak için greft materyali kullanmak kaviteyi boş bırakmaya göre tüm denek noktalarında çok daha iyi sonuçlar vermesine karşın kullanılan denek noktasının (ve denek sayısının) kısıtlılığı nedeni ile boş bırakılan kaviteye göre daha iyi sonuçlar elde edilen greft materyallerinin etkisi tüm greft materyalleri için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

## 5. TARTIŞMA

Kemik dokusu son derece karmaşık ve yüksek oranda özelleşmiş bir bağ dokusudur. Herhangi bir skar dokusu oluşturmadan kendi kendine özel bir rejenerasyon veya remodeling gösterme kapasitesine sahiptir. Kemiğin hasara uğraması durumunda, orijinal yapısını ve fonksiyonunu tamamen eski haline getirmektedir. Enfeksiyon, travma, cerrahi rezeksiyonlar, kistler ve tümörler gibi bazı patolojik durumların varlığında oluşan büyük kemik defektleri, kemik dokusu ile iyileşemeyebilir. Böyle durumlarda iyileşmeyi başlatmak, hızlandırmak veya kolaylaştırmak için iyileşme sürecine müdahale etmek gerekebilir.

Kemik iyileşmesini hızlandıran geleneksel tedavi yöntemleri, öncelikli olarak defekt alanının çeşitli kemik greftleri ile doldurulması ve yapısal destek sağlanmasından faydalanır (47).

Otojen kemik greftleri, düşük immün cevap oluşturma riskinden dolayı kemik defektlerinin tedavisinde altın standart olarak değerlendirilmektedir (48-51).

Bunun dışında homogreft ve heterogreftler de kemik grefti olarak kullanılmaktadır. Bunlarda hastalıkların geçişi ve immünolojik reaksiyonlar gibi bir takım dezavantajlar vardır. İnsan veya hayvan kaynaklarından kemik grefti elde etmenin mümkün olmadığı durumlarda ve donör sahadaki morbiditeyi önlemek amacı ile sentetik kemik greftleri (alloplastlar) kullanılmaktadır (52-55).

Sentetik greft materyalleri ise hastaya ek bir maliyet getirmekte ve otojen greftler kadar doku uyumu sağlamamaktadırlar. Kullanılan sentetik greft materyallerinden biri kalsiyum fosfat grubudur. Kalsiyum fosfat grubu seramikler başlıca iki materyal olan HA ve TCP'tan oluşurlar ve bu materyallerin biyouyumluluklarının oldukça iyi olduğu saptanmıştır (56-58).  $\beta$ -TCP rezorbe olabilen; poröz yapısıyla da rezorbe oldukça yeni kemik oluşumuna imkan veren sentetik bir materyaldir. Hayvan ve insan çalışmalarında  $\beta$ -TCP'in rezorbe olabildiği ve yeni kemik oluşumunu stimüle

ettiği gösterilmiştir. Büyüme faktörleri içermez; osteoindüktif değildir ancak osteokondüktif özelliği vardır.

Sentetik greft materyallerinin ek maliyete sebep olmaları ve doku uyumlarının otojen greftler kadar iyi olamaması sebebiyle iyileşme sürecini kısaltmak, daha kısa sürede daha yoğun kemik oluşumunu stimule etmek için BMP, TZF veya değişik maddeler de greftlerle karıştırılarak kullanılmaktadır. TZF yeni kuşak bir fibrin materyal olup, içindeki değişik faktörler ile iyileşmeyi hızlandırdığı inanılmaktadır (40-43, 45, 46).

TZF maddesinin kullanımının yeni olması nedeniyle literatür incelendiğinde bu tür çalışmaların hayvanlarda daha yapılmadığı, ancak otojen olması ve hazırlanmasında katkı madde katılmaması nedeniyle direkt insanlarda kullanıldığı tespit edilmiştir. Çalışmada TZF maddesinin temini için otojen kana ihtiyaç duyulması çalışmaların hacimsel olarak büyük hayvanlarda yapılabilmesine sebep olmaktadır. Hayvan sarfını engellemek, bir hayvandan daha fazla miktarda otojen TZF edebilmek ve daha fazla defekt bölgesinin greftlenebilmesi için domuz uygun bir model olarak düşünülmüştür. Sık üremeleri, bir doğumda ortalama 8-10 yavru doğması, kısa sürede büyümeleri, stresten fazla etkilenmemeleri ve enfeksiyona diğer hayvanlara nazaran daha dirençli olmalarından dolayı çalışmada seçilmişlerdir.

Çalışmamızda domuzların yukarıda belirtilen özelliklerinin yanısıra domuz tibiasının planlanan deney için yeterli uzunlukta olması, operasyon bölgesine yaklaşmanın kolay olması ve bölgede kanamanın az olması, histolojik olarak kemik iyileşmesinin domuz tibiasında kolaylıkla değerlendirilebilecek olması, teminlerinin ve bakımlarının kolay olması nedeniyle üç adet erkek domuz denek olarak tercih edilmiştir. Çalışmamızda denek hayvan sarfını azaltmak amacı ile domuzların sağ ve sol tibia kemikleri kullanıldı. Uzun süreli bir çalışma olmasından dolayı hayvanlar erişkin, sağlıklı ve daha önce hiç operasyon geçirmemiş olanlardan seçilmiştir.

TZF maddesinin otojen olması, hazırlanırken kullanılan steril cam tüplerde antikoagülan madde içermemesi, hazırlanmasında ek katkı

maddeler gerektirmemesi bir avantaj olup bu çalışmalarda allerjik veya immünolojik reaksiyonlarının görülmemesine sebep olmaktadır (40).

TZF sentezlenmiş büyüme faktörü içeren trombositlerdeki  $\alpha$  granüllerinin degranülasyonu ile çalışır. Bu faktörler fibrin matriks içerisinde bulunup, operasyon öncesi kulak veninden alınarak hazırlanan TZF maddesinin yaklaşık iki saat kullanım süresi vardır. TZF'nin hazırlanmasında ve operasyon esnasında standardizasyona azami şekilde dikkat edilmiştir. Hayvanların beslenmesine dikkat edilmiş ve veteriner hekim kontrolünde preoperatif ve postoperatif dönemlerde standart besin rejimi ile beslenmeleri sağlanmıştır. Çalışmada domuzlar 12. haftada sakrifiye edilmiştir.

Günümüzde kemiğin histopatolojik incelemesini yapmak amacıyla farklı yöntemler kullanılmaktadır. Araştırmamızda kesitleri almak ve preparatları hazırlamak için kullandığımız yöntem ilk defa Donath (59) tarafından ortaya konulmuş ve uygulanmıştır. Bu yöntem geleneksel yöntemlerle kesitleri alınamayan sert doku ve biyomateryallerin histolojik incelenmelerinde kullanılmaktadır (59-60).

Kesme inceltme sistemi, dekalsifiye edilmeyen kemikte alveoler kret ogmantasyon tekniklerinin (alveoler distraksiyon, sinüs lift, büyüme faktörleri uygulamaları, vs), çeşitli biyomateryallerdeki (heterojen, alloplastik, vs) kemik apozisyonunun analizinde ve alloplastik implantlardaki apozisyonun değerlendirilmesinde ve ölçülmesinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Ayrıca dental dokuların ve restorasyonların veya sabit protezlerin komşu dokuları ile birlikte incelenmesi amacı ile de kullanılmaktadır (61-64).

Laboratuvar işlemi ciddi anlamda fazla bir zaman almaktadır. Alınan örneğin büyüklüğüne göre kimi zaman birkaç hafta sürebilir. Normal olarak oral patolojilerin teşhisinde kullanılmamaktadır. Temel olarak deneysel çalışmalarda ve eğitim amaçlı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte kemik dokuya invaze olan tümörlerin kökeninin değerlendirilmesi amacıyla da kullanılabilir. Ayrıca osteopetrozis veya osteomyelit gibi kemik patolojilerinin histolojik değerlendirilmesi için de bu yöntem kullanılmıştır (65, 66, 67).

Katı gömme ortamlarının (plastik monomerler), mikrotomların ve özel kesme sistemlerinin geliştirilmesi ile dekalsifiye edilmeyen kemiğin kesilmesi

ve dolayısı ile yeni çalışmaların yapılması mümkün olmuştur. Metal içeren örneklerin kesilmesi için ilk defa Donath ve Breuner (59) tarafından tanımlanan kesme-inceltme sistemi ve gömme ortamı olarak da glikolmetakrilat (GMA) kullanılmıştır.

Metakrilat içine gömülen kemik örneklerinin kesilmesi için farklı sistemler kullanılmasına karşın bunların hiçbirisi ile metalleri kesmek mümkün değildir (64). Kesme-inceltme sisteminde elmas kaplı testere bandı olduğundan metal içeren örneklerin rahatlıkla kesilmesini sağlamaktadır.

Dekalsifiye örneklerde immatür paralel lifli kemiğin ve lamellar kemiğin birbirinden ayırt edilmesi oldukça gttr (68-70). Bu yöntemle, yeni oluşan immatür kemiğin remodele olmuş olgun kemikten ayırt edilmesi de mümkündür (68, 71). Örnekler üzerinde kronolojik olarak kemiğin oluşumu ve matürasyonunun değerlendirilmesi yapılabilir (68, 72).

Botti ve arkadaşları (73) kesme inceltme sisteminde kullanılan akrilik ortamlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada epoksi rezin ve Technovit 7200 VLC rezini (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Germany) karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak Technovit 7200 VLC rezininin hem ışık hem de elektron mikroskopik incelemeler için rahatlıkla kullanılabileceğine karar vermişlerdir.

Daimon ve arkadaşları (73) da yaptıkları çalışmada Technovit 7200 VLC rezininin ışık mikroskobu ile inorganik histokimya ve elektron mikroskobu ile X-ışını mikroanalizi için mkemmek bir gömme ortamı olduğunu tespit etmişlerdir.

Schou ve arkadaşları (74) sağlıklı ve iltihabi peri-implant dokularını inceledikleri araştırmalarında kesme-inceltme sistemi ve gömme ortamı olarak Technovit 7200 VLC rezini kullanmıştır. alışmalarında histolojik karşılaştırma için son derece başarılı örnekler elde etmişlerdir.

Benlidayı (75), implant ve sinüs lift uygulaması yaptığı çalışmada kesme-inceltme sistemi ve Technovit 7200 VLC rezini kullanmış ve histolojik değerlendirmelerde başarılı örnekler elde etmiştir.

zyiğit (27), domuzların tibia kemiğinde oluşturulan kemik defektlerinde yara iyileşmesini incelemek için çeşitli greft materyalleri ile titanyum partikülleri kullanmış, yaptığı çalışmada kesme-inceltme sistemi ve

Technovit 7200 VLC rezini kullanmıştır. Histolojik değerlendirmelerde başarılı örnekler elde etmiştir.

Bizim çalışmamızda da en uygun örnek elde etme yöntemi olarak kesme inceltme sisteminin; ortam olarak da Technovit 7200 VLC rezininin kullanılmasına karar verildi. Bu bize başarılı bir histolojik inceleme yapma imkânı sağladı. Örnekler TB ile boyandığında farklı hücre tipleri ve ekstraselüler matriks iyi bir morfoloji göstermekteydi.

Özyiğit (27), domuzların tibia kemiğinde 3 mm çapında oluşturduğu kemik defektlerinde yara iyileşmesini incelediği çalışmasında, hayvanları 16. haftada sakrifiye etmiş ve defekt alanlarının büyük oranda kemikle dolduğunu ve kaviteleri tespit etmekte zorlandığını belirtmiştir.

Çalışmamızda defektlerin daha rahat tespiti için kaviteleri 5 mm çapında oluşturduk ve hayvanları 12. haftada sakrifiye ettik, ancak reaksiyonel kemik oluşumu nedeniyle defektler makroskobik incelemelerde tespit edilemedi. Defekt kavitelerini bilgisayarlı tomografi ile alınan filmlerde tespit edebildik.

Çalışma sonucunda elde edilen örnekler incelendiğinde, kullandığımız TZF ve  $\beta$ -TCP'in yabancı cisim reaksiyonu yaratmadıkları, inflamasyon oluşturmadıkları ve doku ile uyumlarının iyi olduğu görülmüştür. Greftlenen bölgelerde osteoklastik aktiviteye rastlanmamıştır.

İçten (76), 6 köpek çenesinde TCP'in yeni kemik oluşumu hızına etkisini deneysel ve histopatolojik olarak incelemiştir. İçten çalışmasında TCP'in doku ile uyumluluğunu tam bulmuş; yabancı cisim reaksiyonu ya da inflamatuvar reaksiyona rastlamamıştır.

Karaca (77), kemik iyileşme hızını değerlendirmek amacıyla kobaylarda yaptığı çalışmada TCP kullanmış; bu materyalin doku ile çok uyumlu olduğunu, iltihabi ya da yabancı cisim reaksiyonuna sebep olmadığını rapor etmiştir.

Yazawa ve arkadaşları (78) da tavşanlarda yaptıkları kemik greft çalışmasında TCP kullanmışlar. Bu maddenin yabancı cisim reaksiyonu göstermediğini belirtmişlerdir.

Zijderveld ve arkadaşları (79), sinüs lift operasyonunda  $\beta$ -TCP yalın ve otojen grefti yalın kullanmış ve bunlar kıyaslamıştır. 6. ayda yapılan histolojik incelemede; materyalin toksisitesi, yabancı cisim reaksiyonu izlenmemiştir.

Suba ve arkadaşları (80), köpeklerde  $\beta$ -TCP ve PRP'yı kullanmış ve TCP'in doku ile tam uyumluluğunu görmüşlerdir.

Kovács ve arkadaşlarının (81) köpek mandibulaları üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada  $\beta$ -TCP ve PRP kullanmışlardır. 6. ve 12. hafta sonunda yaptıkları incelemelerde materyallerin dokular tarafından iyi tolere edildiklerini ve toksik reaksiyon oluşturmadıklarını gözlemişlerdir.

Wiltfang ve arkadaşlarının (82) çalışmalarında 39 hastaya  $\beta$ -TCP ve PRP ile uygulanan sinüs lift operasyonu sonrası 6.ayda yapılan biyopsiler sonucunda partiküller çevresinde yabancı cisim reaksiyonu izlenmemiştir.

Yine benzer bir çalışmada; Velich ve arkadaşları (83),  $\beta$ -TCP ve PRP'yı sinüs lift operasyonunda kullanmış, yabancı cisim reaksiyonu ve inflamatuvar olaylara rastlamamışlardır.

Çalışmamızda 12. haftada hayvanlar sakrifiye edilmiş olup,  $\beta$ -TCP partiküllerinin tek başına uygulandığı üçüncü kavitede yabancı cisim reaksiyonu tespit edilmemiş, greft üzerinde ve etrafında yeni kemik oluşumunun meydana geldiği tespit edilmiştir. TCP'nin TZF ile karıştırılarak uygulandığı dördüncü grupta ise TCP tespit edilememiş, bu gruptaki kemik yoğunluğunun en çok olduğu görülmüştür. TCP'nin tek başına veya TZF ile karıştırılarak uygulandığı her iki grupta da kemiğin medullasına doğru bir kemik büyümesi tespit edilmiştir.  $\beta$ -TCP ve TZF'nin kombine kullanıldığı defektlerde kemik iliği içerisinde  $\beta$ -TCP partiküllerine rastlanmamıştır. TZF'nin,  $\beta$ -TCP partiküllerini adhesiv özelliği ile bir arada tutarak defekt içerisine daha iyi yerleşmelerini ve kavite kenarlarına daha sıkı adapte olmalarını sağlayarak iyileşmeyi hızlandırdığı düşünülmektedir.

Tayapongsak ve arkadaşları (84), otuzüç mandibüler tamirinde otojen kansellöz kemik greftine otolog fibrin adhesiv ilave etmişlerdir. Radyografik incelemelerde kemik oluşumunu salt greft kullanılan gruba göre daha erken dönemde meydana geldiğini rapor etmişlerdir.

Yazawa ve arkadaşları (78); PRP, TCP ve fibrin yapıştırıcı kullanarak tavşanda çalışma yapmışlar; sentetik greft materyalleriyle PRP kullanımının kemik oluşumunda başarılı olduğunu görmüşlerdir.

Karaca (77), TCP'nin geç rezorbe olmasının, yeni kemik oluşumunu stimüle etme etkisinin daha uzun süre devam etmesini sağladığını bildirmiştir.

Szabo ve arkadaşları (85), geç de olsa tamamen rezorbe olabilme yeteneğiyle  $\beta$ -TCP'in yeni kemik oluşumunu stimüle ettiği deneylerle gösterilmiştir.

Wiltfang ve arkadaşları (86) domuzlarda Cerasorb, Bio-Oss, Collos ve PRP'yı kıyasladıkları çalışmada 12. haftada Cerasorb partiküllerinin %  $15.2 \pm 2.8$  oranında varlığını izlemişlerdir.

Benzer çalışma Velich ve arkadaşları (83) tarafından köpeklerde yapılmış, 12. haftada yapılan incelemelerde TCP partiküllerine rastlanmıştır.

Yazawa ve arkadaşları (79) tavşanlarda, PRP,  $\beta$ -TCP ve fibrin yapıştırıcı kullanarak yaptıkları çalışmada 1. hafta, 1. ay ve 2. ayda histolojik değerlendirme yapmışlar.

Zijderveld ve arkadaşları (80),  $\beta$ -TCP ve otojen grefti yalın olarak kullandıkları 41 implant hastasında 6. ayda yaptıkları biyopsi sonucunda TCP'in rezorbsiyonunun yaklaşık 6 ayda tamamlandığını tespit etmişlerdir.

Nery ve arkadaşları (87)'da 6. ayda halen TCP partiküllerin izlenebildiğini görmüşlerdir. Çalışmamız 12. haftada bittiği için daha geç dönemlerde TCP'in rezorbsiyonunu değerlendirme imkanımız olmamıştır.

Choukroun ve arkadaşlarının (88) insanda yaptıkları sinüs lift çalışmalarında TZF ve homogreft kullanmışlar. Histolojik incelemelerinde TZF ve greft materyalinin birlikte kullanılan grupta daha hızlı bir kemik iyileşmesi tespit etmişler; inflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu, allerjik veya immünolojik reaksiyon, kemikte osteoklastik aktivite artışı izlememişlerdir.

Diss ve arkadaşlarının (89) insanda yaptıkları implant ve sinüs lift çalışmalarında TZF'yi tek başına greft materyali olarak kullanmışlar ve implant yüklemesini 8-12 haftalar arasında yapmışlardır. Bir yıl sonra yapılan radyolojik incelemelerde yeni kemik oluşumları tespit edilmiştir.

Çalışmamızda TZF materyalinin tek başına veya TCP ile birlikte kullanıldığında kemik miktarı ile maturasyonunda artışlar tespit edilmiştir.

Choukroun ve arkadaşlarının (88) çalışmalarına benzer bulgular, yani yeni kemik doku miktar ve kalitesinde artış ile inflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu, allerjik veya immünolojik reaksiyon, kemikte osteoklastik aktivite artışı izlenmemiştir.

Örneklerin incelenmesinde tüm defektlerde yeni kemik yapımının sürmekte olduğu izlenmiştir. Boş defektte, yalnız TZF ve yalnız  $\beta$ -TCP kullanılan defektlerde düzenli bir organizasyon göstermeyen gevşek bağ dokusu hücreleri izlenirken; TZP ve  $\beta$ -TCP kombine kullanılan defektte yeni kemik alanları arasında sıkışmış düzenli bağ dokusu görülmüştür. Özellikle bu grupta, diğer defektlere oranla bağ dokusu içinde osteoblast ve osteositleri içeren daha fazla yeni kemik yapımının bulunduğu saptanmıştır. Defektin çevresinde düzgün ve yoğun bir şekilde dizilmiş osteositler ve yeni kemik yapımı görülmüştür. TZF ile kombine kullanılan defektte daha fazla olmak üzere tüm defektlerde lameller kemik yapısı izlenmiştir.

Araştırmamızdaki TCP partiküllerinin bulunduğu defekt alanı, düzensiz ince kemik lamelleriyle çevriliydi. Trabeküller ince, kemik lamellerinin arası genişlemiş olup içleri gevşek fibröz doku ve partiküllerle doluydu. Defekt alanındaki kemik maturasyonu (remodeling) henüz tamamlanmamış ve Haversian kanal sistemleri oluşmamıştı. Defekt yüzeyi periosteal yüzeyden gelen ve hemen hemen maturitesini tamamlamış görünümdeki kemik trabekülleriyle tamamen kapanmış görünümdeydi. Çalışmamızda TCP materyalinin kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri kemikteki defekt alanının etrafında kabul edilebilir bir kemik oluşması ve enfeksiyon veya ret gibi komplikasyonun oluşmaması bakımından uygulanabilir bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz histolojik bulguların doğrultusunda; cerrahi defektlerde, TZF'nin yalnız olarak değil;  $\beta$ -TCP ile kombine kullanımının daha etkili olduğunu düşünmekteyiz.

## 6 SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda domuzların tibiasında oluşturulan 5 mm boyutundaki kemik defektlerinde Trombositten Zengin Fibrinin yara iyileşmesi üzerindeki etkileri araştırılmış ve bu etkiler günümüzde sıklıkla kullanılan Trikalsiyum Fosfat greft materyali ile karşılaştırılmıştır. Bu amaçla oluşturulan defektlere yerleştirilen materyaller histolojik olarak incelenmiş ve buna göre;

1. Kullanılan materyallerin herhangi bir yabancı cisim reaksiyonu oluşturmadığı ve doku tarafından iyi tolere edildiği,
2. Oniki hafta sonunda alınan örneklerin tamamında defekt alanının kemikle dolduğu, ancak kemik oluşum oranının gruplara göre farklılık gösterdiği,
3. Hazırlanan defekt boyutları dikkate alındığında, kontrol grubundaki defektlerdeki kemik iyileşmesinin büyük oranda tamamlanmış olmasından dolayı, küçük defektlerde greft kullanmanın gerekliliğinin sorgulanabileceği,
4. Defekt alanlarının bir bariyer membran ile örtülmesinin, periosttan reaktif olarak kemik oluşmasını engelleyebileceği, ancak bu durumun defekt bölgesindeki beslenmeyi bozup sağlıklı değerlendirmeyi engelleyeceği,
5. Defekt kavileri oluşturulurken kenarlarına miniplak vidaları ile rehber noktalar oluşturularak bu kavilerin sakrifikasyondan sonra konvansiyonel radyografiler ile tespit edilmesinin yapılabileceği,
6. Oniki hafta sonra yapılan inceleme sonucu tüm gruplarda yeni kemik yapımının kontrol grubuna nazaran daha iyi olduğu,
7. Yara iyileşmesi bakımından en iyi iyileşmenin sırası ile TZF+TCP, TCP ve TZF gruplarında olduğu,
8. Karşılaştırılan materyallerin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin mevcut literatürle paralellik arz ettiği,
9. TZF maddesinin gerek tek başına, gerekse TCP greft materyali ile karıştırılarak kullanılmasında yara iyileşmesini hızlandırdığını sonucuna varılmıştır.

Elde edilen bu sonuçların, Trombositten Zengin Fibrin ile ilgili yeni araştırmalara ışık tutacağını ve bu malzemenin tek başına veya çeşitli greft

materyalleri ile birlikte kullanılarak yeni greft teknikleri arasında başarı ile kullanılabileceğini ve yara iyileşmesini hızlandıracağını düşünmekteyiz.

## 7 KAYNAKLAR

1. Akay, M.T.: Genel Histoloji, Beşinci Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara, 2001.
2. Erkoçak, A.: Genel Histoloji, 4. Baskı, Okan Dağıtım, Yayıncılık Ltd. Şti., İstanbul, 1983.
3. Fawcett, D.W.: Bloom and Fawcett: A Textbook of Histology, Twelfth Edition, Chapman & Hall, New York, 1994.
4. Junqueira, L.C., Carneiro, J., Kelley, R.O.: Basic Histology, Eighth Edition, 132-151, Apleton & Lange, Connecticut, 1995.
5. Bozkaya, S.: Deproteinize ve Demineralize Kemik Greftlerinin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 2005.
6. Kocabay Özkaynak, C.: Deneysel Olarak Diabet Oluşturulmuş Tavşanlarda Trombosit Zengin Plazma (TZP) Uygulamasının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkisinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 2007.
7. Manson, P.N.: Facial Bone Healing and Bone Grafts, Clin. Plast. Surg., 21(3), 331-348, 1994.
8. Çılbr, Ö.: Pyrost, Demineralize Kemik Ve Solvent Dehidrate Kemik Greftlerinin Membranlı ve Membransız Kullanımının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 1999.
9. Artzi, Z., Tal, H., Dayan, D.: Porous Bovine Bone Mineral in Healing of Human Extraction Sockets: 2. Histochemical Observations at 9 Months, J. Periodontol., 72(2), 152-159, 2001.
10. Delacure, M.D.: Physiology of Bone Healing and Bone Grafts, Otolaryngol. Clin. North Am., 27(5), 859-73, 1994.
11. Erdoğan, C.: Genel Histoloji: Hücre ve Dokular, 2. Baskı, Murat Ofset,

- İzmir, 1983.
12. Groger, A., Klaring, S., Merten, H. A., Holste, J., Kaps, C., Sittinger, M.: Tissue Engineering of Bone for Mandibular Augmentation in Immunocompetent Minipigs: Preliminary Study, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.*, 37(3), 129-33, 2003.
  13. Sodek, J., Mckee, M.D.: Molecular and Cellular Biology of Alveolar Bone, *Periodontol.* 2000, 24, 99-126, 2000.
  14. Dorfman, H.D., Czerniak, B.: Bone Tumors, Mosby Inc., St. Louis, U.S.A., 1998.
  15. Mardas, N., Kostopoulos, L., Stavropoulos, A., Karring, T.: Osteogenesis by Guided Tissue Regeneration and Demineralized Bone Matrix, *J. Clin. Periodontol.*, 30, 176-183, 2003.
  16. Schmitz, J. P., Hollinger, J. O.: The Critical Size Defect as an Experimental Model for Craniomandibulofacial Nonunions, *Clin. Orthop.*, 205, 299-308, 1986.
  17. Minkin, C., Marinho, V.C.: Role of the Osteoclast at the Bone-Implant Interface, *Adv. Dent. Res.*, 13, 49-56, 1999.
  18. Tagil, M.: The Morselized and Impacted Bone Graft. Animal Experiments on Proteins, Impaction and Load, *Acta Orthop. Scand. Suppl.*, 290, 1-40, 2000.
  19. Aaboe, M., Schou, S., Hjorting-Hansen, E., Helbo, M., Vikjaer, D.: Osseointegration of Subperiosteal Implants Using Bovine Bone Substitute and Various Membranes, *Clin. Oral Implants Res.*, 11(1), 51-58, 2000.
  20. Becker, W., Urist, M. R., Tucker, L. M., Becker, B. E., Ochsenein, C.: Human Demineralized Freeze-Dried Bone: Inadequate Induced Bone Formation in Athymic Mice. A Preliminary Report, *J. Periodontol.*, 66(9), 822-828, 1995.
  21. Jablanski, S.: Illustrated Dictionary of Dentistry, W. B. Saunders Company, Philadelphia, U.S.A., 1982.
  22. Craft, P. D., Sargent, L. A.: Membranous Bone Healing and Techniques in Calvarial Bone Grafting, *Clin. Plast. Surg.*, 16(1), 11-19,

- 1989.
23. Griffon, D. J.: Evaluation of Osteoprodutive Biomaterials: Allograft, Bone Inducing Agent, Bioactive Glass, and Ceramics. University of Helsinki, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Clinical Veterinary Sciences, Division of Surgery University of Helsinki, Helsinki, 2002.
  24. Urist, M. R., O'conner, B. T., Burwell, R. G.: Bone Grafts, Derivatives and Substitutes, Butterworth-Heinemann Ltd., Oxford, 1994.
  25. Erkmen, E.: Spongioza Blok Kemik Greftinin, Dura Mater ve Fascia Lata Greft Materyalleri ile Birlikte Uygulandığı Segmental Osteotomiler Sonrasında İyileşmenin Histopatolojik Olarak İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 2000.
  26. Mulliken, J. B. Glowacki, J.: Induced Osteogenesis for Repair and Construction in the Craniofacial Region, *Plast. Reconstr. Surg.*, 65(5), 553-560, 1980.
  27. Özyiğit, H.A.: Deneysel Olarak Oluşturulan Defektlerde Titanyum Partikülleri ve Değişik Greft Materyallerinin Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 2007.
  28. Süer, B.T.: İmplant Öncesinde Kemik Ogmantasyonları, GATA Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Seminer, Ankara, 2003.
  29. Murugan, R., Ramakrishna, S.: Development of Nanocomposites for Bone Grafting, *Composites Science and Technology*, 65: 2385–2406, 2005.
  30. Palacci, P., Ericsson, I.: *Esthetic Implant Dentistry: Soft and Hard Tissue Management*, Quintessence Pub., 2nd ed, USA, 2001.
  31. Lynch, S.E., Genco, R.J., Marx, R.E.: *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*, Quintessence Pub., USA, 1999.

- 32.Kahnberg, K.E.: Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants, Blackwell Munksgaard, 2005.
- 33.Newman, M.G., Takei H., Klokkevold P.R., Carranza, F.A.: Carranza's Clinical Periodontology, 10th ed., WB Saunders Co., USA, 2006.
- 34.Ünlü, F., Gürses, N.: Ana Hatlarıyla Periodontoloji, Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları, İzmir, 1997.
- 35.Pallasen, L., Schou, S., Aaboe, M., Hjorting-Hansen, E., Nattesatad, A., Melsen, F.: Influence of Particle Size of Autogenous Bone Grafts on the Early Stages of Bone Regeneration: A Histologic and Stereologic Study in Rabbit Calvarium, Int J Oral Maxillofac Implants,17: 498–506, 2002.
- 36.Ataoğlu, T, Gürsel, M.: Periodontoloji, Damla Ofset A.Ş., 3. Baskı, Konya, 1999.
- 37.Türker, M., Yüçetaş, Ş.: Ağız, Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi, 3. Baskı, Özyurt Matbaacılık Hizmetleri, Ankara, 2004.
- 38.Park J. B., Bronzino, J.D.: Biomaterials: Principles and Applications, CRC Press, USA, 5–9, 2002.
- 39.Shalaby, S.W., Salz, U.: Polymers for Dental and Orthopedic Applications, CRC Press, USA, 2007.
- 40.Dohan, D.M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., Gogly, B.:Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: Technological concepts and evolution, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 101: E37-44, 2006.
- 41.Dohan, D.M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., Gogly, B.:Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: Platelet-related biologic features, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 101: E45-50, 2006.
- 42.Gaßling, V.L.W., Açil, Y., Springer, I.N., Hubert, N., Wiltfang, J.: Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture, Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., Article in press, 2009.

43. Su, C.Y., Kuo, Y.P., Tseng, Y.H., Su, C.H., Burnouf, T.: In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, Article in press, 2009.
44. Kaya Yıldız, M.: Kemik İyileşmesinde Trombosit Zengin Plazmanın (Platelet Rich Plasma-PRP) Etkisinin Deneysel Olarak Değerlendirilmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 2006.
45. Dohan, D.M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., Gogly, B.: Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: Leucocyte activation: A new feature for platelet concentrates?, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 101: E51-55, 2006.
46. Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.O., Schoeffler, C., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., Dohan, D.M.: Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 101: E56-60, 2006.
47. Hsiong, S.X., Money, D.J.: Regeneration of Vascularized Bone, *Periodontol* 2000, 41: 109–122, 2000.
48. Goldberg, V.M., Stevenson, S.: Natural History of Autografts and Allografts, *Clin Orthop*, 225: 7–16, 1987.
49. Schenk, C., Schwarz, A., Kaupe, A.J.M., Wiltfang, J., Neukam, F.W.: Erfahrungen mit Autogenen Beckenkammtransplantationen im Ober und Unterkiefer Vergleich der Anterioren und Posterioren Entnachmetchnik. *Deutsche Zahnärztliche Zeitschrift*, 55: 355–360, 2000.
50. Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Radespier-Tröger, M., Kloss, F.R., Neukam, F.W.: Morbidity of Harvesting of Chin Grafts: A Prospective Study. *Clin Oral Implants Res*, 13: 495–502, 2001.
51. Schultze-Mosgau, S., Keweloh, M., Wiltfang J., Kessler, P., Neukam, F.W.: Histomorphometric and Densitometric Changes in Bone Volume

- and Structure Following Avascular Bone Grafting in the Extremely Atrophic Maxilla, *Br J Oral Maxillofac Surg*, 39: 439–447, 2001.
52. Schlegel, K.A.: Langzeitergebnisse mit dem Knochenersatzmaterial Bio-Oss, *Scweizer Monatsschrift Zahnmededizin*, 7: 535–542, 1996.
53. Metren, H.A., Wiltfang, J., Becker, H., Hönig, J.H., Wiese, K.: Resorbierbare Kunststoff-Tamponaden zur Knochendefektfüllung im Spongiösen Lager, *Zeitschrift für Zahnärztliche Implantologie*, 13: 174–179, 1997.
54. Günther, K., Scharf, H., Pesch, H., Puhl, W.: Einwachsverhalten von Knochenersatzstoffen, *Orthopädie*, 27: 105–111, 1998.
55. Wiltfang, J., Schultze-Mosgau, S., Metren, H.A., Kessler, P., Ludwig, A., Engelke, W.: Endoscopic and Ultrasound Evaluation of the Maxillary Sinus Following Combined Sinus Floor Augmentation and Implant Insertion, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 89: 288–29, 2000.
56. Hutmacher, D., Hürzeler, M.B., Schliebhake, H.A.: A Review of Material Properties of Biodegradable and Bioresorbable Polymers and Devices for GTR and GBR Applications, *Int J Oral Maxillofac Implants*, 11: 667-678, 1996.
57. Danesh-Meyer, M.J., Wikesjo, U.M.: Gingival Recession Defects and Guided Tissue Regeneration: A Review, *J Periodontal Res*, 36: 341-354, 2001.
58. Needleman, I., Tucker, R., Giedrys-Leeper, E., Worthington, H.: A Systematic Review of Guided Tissue Regeneration for Periodontal Infrabony Defects, *J Periodontal Res*, 37: 380-388, 2002.
59. Donath, K., Breuner, G.: A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues, *J. Oral Pathol.*, 11: 318-326, 1982.
60. Donath, K.: The Diagnostic Value of the New Method for the Study of Undecalcified Bones and Teeth with Attached Soft Tissue (Sage-Schliff [Sawing and Grinding] Technique), *Pathol. Res. Pract.*, 179: 631-633, 1985.

61. Donath, K.: Preparation of Histologic Sections by the Cutting-Grinding Technique for Hard Tissue and Other Material not Suitable to be Sectioned by Routine Methods, Exakt-Kulzer Publication, Norderstedt, Germany, 1995.
62. Barth, E., Johansson, C., Albrektsson, T.: Histologic Comparison of Ceramic and Titanium Implants in Cats. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 5: 227-231, 1990.
63. Rohrer, M.D., Schubert, C.C.: The Cutting-Grinding Technique for Histologic Preparation of Undecalcified Bone and Bone-Anchored Implants: Improvements in Instrumentation and Procedures, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 74: 73-78, 1992.
64. Hillmann, G., Hillman, B., Donath, K.: Enzyme, Lectin and Immunohistochemistry of Plastic Embedded Undecalcified Bone and Other Hard Tissues for Light Microscopic Investigations, *Biotech Histochem*, 66: 185-193, 1991.
65. Semba, I., Ishigami, T., Sugihara, K., Kitano, M.: Higher Osteoclastic Demineralization and Highly Mineralized Cement Lines with Osteocalcin Deposition in Mandibular Cortical Bone of Autosomal Dominant Osteopetrosis Type II: Ultrastructural and Undecalcified Histological Investigations, *Bone*, 27: 389-395, 2000.
66. Recker, R.R.: *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*, CRC Press, USA, 13-37, 1983.
67. An, Y.H., Martin, K.L.: *Handbook of Histology Methods for Bone and Cartilage*, Humana Press, USA, 199-206, 2003.
68. Kürkçü, M., Benlidayı, M.E.: Biyomateryal İçeren Sert Dokulardan Histolojik Kesit Hazırlanmasına İlişkin Yöntem, *Türk Oral Maksillofas. Cer. Derg.*, 11: 74-78, 2007.
69. Raghoobar, G.M., Liem, R.S., Vissink, A.: Vertical Distraction of the Severely Resorbed Edentulous Mandible: A Clinical, Histological and Electron Microscopic Study of 10 Treated Cases, *Clin Oral Implants Res*, 13: 558-565, 2002.
70. Cano-Sánchez, J., Campo-Trapero, J., Gonzalo-Lafuente, J.C.,

- Moreno-Lopez, L.A., Bascones-Martinez, A.: Undecalcified Bone Samples: A Description of the Technique and Its Utility Based on the Literature, *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 10Suppl1:E74–87, 2005
71. Pallesen, L., Schou, S., Aaboe, M., Hjorting-Hansen, E., Nattestad, A., Melsen, F.: Influence of Particle Size of Autogenous Bone Grafts on the Early Stages of Bone Regeneration: A Histologic and Stereologic Study in Rabbit Calvarium, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 17: 498-506, 2002.
72. Botti, F., Ragazzoni, E., Pilloni, A., Cocchia, D.: Assessment of the Acrylic Resin Technovit 7200 VLC for Studying the Gingival Mucosa by Light and Electron Microscopy, *Biotech. Histochem.*, 72: 178–184, 1997.
73. Daimon, T., Kawai, K., Kamoto, T.: Use of a Technovit 7200 VLC to Facilitate Integrated Determination of Aluminum by Light and Electron Microscopy, *Biotech. Histochem.*, 75: 27-32, 2000.
74. Schou, S., Holmstrup, P., Stoltze, K., Hjorting-Hansen, E., Fiehn, N.E., Skovgaard, L.T.: Probing around Implants and Teeth with Healthy or Inflamed Peri-Implant Mucosa/Gingiva. A Histologic Comparison in Cynomolgus Monkeys (*Macaca Fascicularis*), *Clin. Oral Implants Res.*, 13: 113-126, 2002.
75. Benlidayı, M.E.: Sinüs Tabanı Greftlemesi ve Eş Zamanlı İmplant Yerleştirme İşlemlerinde Sığır Kaynaklı Spongioz Hidroksilapatit Blok ve Granül Hidroksilapatit Greft Materyallerinin Deneysel Olarak Karşılaştırılması, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Adana, 2008.
76. İçten, O.: Trikalsiyumfosfatın Yeni Kemik Yapımına Etkisinin Deneysel İncelenmesi, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 1987.
77. Karaca, İ.R.: Trikalsiyumfosfat, Hidroksilapatit ve Pyrostun Yeni Kemik Yapımına Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara, 1990.

78. Yazawa, M., Ogata, H., Kimura, A., Nakajima, T., Mori, T., Watanabe, N.: Basic Studies On the Bone Formation Ability by Platelet Rich Plasma in Rabbits, *J. Craniofac. Surg.*, 15(3) , 439-446, 2004.
79. Zijderveld, S.A., Zebro, I., Bergh, J.P.A., Schulten, A.J.M., Bruggenkate, C.M.: Maxillary Sinus Floor Augmentation Using A  $\beta$ -Tricalcium Phosphate (Cerasorb) Alone Compared to Autogenous Bone Grafts, *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 20(3): 432–440, 2005.
80. Suba, Z., Takacs, D., Gvulai-Gaal, S., Kovacs, K.: Facilitation of betatricalcium phosphate-induced alveolar bone regeneration by platelet-rich plasma in beagle dogs: a histologic and histomorphometric study, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 19(6): 832–838, 2004.
81. Kovacs, K., Velich, N., Huszar, T., Fenyves, B., Suba, Z., Szabo, G.: Histomorphometric and Densitometric Evaluation of the Effects of Platelet-Rich Plasma on the Remodeling of [ $\beta$ ]-Tricalcium Phosphate in Beagle Dogs, *Journal of Craniofacial Surgery*, 16(1): 150-154, January, 2005.
82. Wiltfang, J., Kessler, P., Schultze-Mosgau, S., Nkenke, E., Zimmermann, R., Schlegel, K.A.: Sinus Floor Augmentation Using  $\beta$ -Tricalciumphosphate: Does Platelet-Rich Plasma Promote It's Osseous Integration and Degradation?, *Clinical Oral Implants Research*, 14: 210–215, 2003.
83. Velich, N., Nemeth, Z., Toth, C., Szabo, G.: Long-Term Results With Different Bone Substitues Used For Sinus Floor Elevation, *The Journal of Craniofacial Surgery*, 15(1): 39–41, 2004.
84. Tayapongsak, P., O'brien, D.A., Monteiro, C.B., Arceo-Diaz, L.L.: Autologous Fibrin Adhesiv in Mandibular Reconstruction With Particulate Cancellous Bone and Marrow, *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 52: 161–166, 1994.
85. Szabo, G., Suba, Z., Hrabak, K., Barbaras, J., Nemeth, Z.: Autogeneous Bone Versus  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Graft Alone For

- Bilateral Sinus Elevations. Preliminary Results, *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, 16: 681–692, 2001.
86. Wiltfang, J., Kloss, F.R., Kessler, P., Nkenke, E., Schulze-Mosgau, S., Zimmermann, R., Schlegel, K.A.: Effects of Platelet-Rich Plasma On Bone Healing In Combination With Autogenous Bone and Bone Substitutes In Critical-Size Defects, *Clinical Oral Implants Research*, 15(2): 187, 2004.
87. Nery, E.B., Lynvh, K.B., Kirthe, W.M.: Bioceramic Implants In Surgically Produced Infrabony Defects, *J. Periodontol.*, .46: 328, 1975.
88. Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.O., Schoeffler, C., Dohan, S.L., Dohan, A.J.J., Mouhyi, J., Dohan, D.M.: Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: Histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 101: 299-303, 2006.
89. Diss, A., Dohan, D.M., Mouhyi, J., Mahler, P.: Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 105: 572-579, 2008.