

GÜLŞAT KAYA

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2023

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

KOLLAJEN MEMBRAN VE HYALÜRONİK ASİTİN
KEMİK REJENERASYONUNA ETKİSİNİN HİSTOLOJİK
VE HİSTOMORFOMETRİK İNCELENMESİ

GÜLŞAT KAYA

DANIŞMAN
DOÇ. DR. NİLÜFER BALCIOĞLU

ORAL İMPLANTOLOJİ ANABİLİM DALI
ORAL İMPLANTOLOJİ

İSTANBUL-2023

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gülşat KAYA

İTHAF

Tanıdığım en güzel insan, Annem'e ithaf ediyorum

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın her aşamasında bilgi birikimi ve bilimsel bakış açısı ile büyük katkılarını ve desteklerini sunan değerli danışman hocam Doç. Dr. Nilüfer Balcıoğlu'na teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Oral İmplantoloji Anabilim Dalı 'nda devam ettirmiş olduğum doktora eğitimi süresince bilgi ve tecrübelerini paylaşan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Selim Ersanlı, Prof. Dr. Serdar Yaçın, bir dönem danışman hocam olan Prof. Dr. Ayşe Cansu Başeğmez ve Prof. Dr. Volkan Arısan'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm doktora eğitim sürecinde destekleriyle her zaman yanımda olan, çalışmamın deneysel kısmında büyük yardımları bulunan tüm doktora arkadaşlarıma ve Oral İmplantoloji Anabilim Dalı ailesine,

Çalışmanın deneysel kısmının gerçekleşmiş olduğu İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nün tüm akademik personeli ve çalışanlarına,

İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı'nda görev yapan Doç. Dr. Merva Soluk Tekkeşin 'e değerli histolojik ve histomorfometrik analizleri için teşekkür ederim.

Doktora sürecim boyunca manevi desteklerini esirgemeyen ve uzun bir liste olduğu için isimlerini yazamadığımdan kendimi şanslı hissettiğim tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Hayatımın her alanında bana iyiyi, sevgiyi, doğruyu öğreterek bugünlere getiren, muhteşem kişiliğini örnek aldığım ve doktora sürecim boyunca da en büyük destekçim olan çok kıymetli annem Nimet Kaya'ya, akademik kariyerin önemini aşıl原因an ve destekleyen değerli babam Halit Kaya'ya, kardeşlerim Hilal Kaya Ergin, Olgun Kaya ve Tanıl Toprak Kaya'ya, saygıdeğer aile büyüklerimiz dedelerim Faik Kaya ve İrfan Kaya'ya minnetlerimi sunar ve teşekkürü borç bilirim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37784

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	ii
İTHAF.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	xi
ÖZET	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik.....	3
2.1.1.1. Kemik Hücreleri.....	3
2.1.1.2. Osteoblastlar.....	4
2.1.1.3. Osteoklastlar.....	6
2.1.1.4. Osteositler	7
2.1.2. Kemik Yapısı ve Metabolizması.....	8
2.1.2.1. Kemik Türleri ve Yapısal Organizasyon.....	8
2.1.3. Kemik Rejenerasyonu	10
2.1.3.1. Fizyolojik ve onarıcı rejenerasyon	10
2.1.3.2. Kemik rejenerasyonunun aktivasyonu	10
2.1.3.3. Kemik Defektlerinin Onarımı	11
2.2. Greft Materyalleri	13
2.2.1. Kemik Greftlerinin Fizyolojisi.....	14
2.2.1.1. Osteogenez	14
2.2.1.2. Osteoindüksiyon.....	15
2.2.1.3. Osteokondüksiyon.....	15
2.2.2. Greft Materyalinin Özellikleri	15
2.2.3. Greft Materyal Tipleri	17
2.2.3.1. Otojen Kemik Greftleri	17

2.2.3.2. Allogreftler	20
2.2.3.3. Zenogreftler	21
2.2.3.4. Alloplastik Greft Materyalleri	23
2.3. Bariyer Membranlar	25
2.3.1. Bariyer Membranların Temel Özellikleri	26
2.3.1.1. Biyouyumluluk	26
2.3.1.2. Hücre Oklüzyonu	27
2.3.1.3. Doku entegrasyonu	27
2.3.1.4. Alan Yapımı ve Alan Bakımı	28
2.3.1.5. Ameliyat Sırasında Klinik Kullanım	28
2.3.1.6. Komplikasyonlara Duyarlılık	29
2.3.2. Rezorbe Olmayan Membranlar	29
2.3.2.1. Genişletilmiş Politetrafloraetilen (e-PTFE) Membran	29
2.3.2.2. Yüksek Yoğunluklu Politetrafloraetilen (d-PTFE) Membran	31
2.3.3. Rezorbe Olabilen Membranlar	31
2.3.3.1. Polimerik membranlar	32
2.3.3.2. Kollajen membranlar	33
2.4. Hyalüronik Asit	34
2.4.1. Hyalüronik Asitin Kimyasal Özellikleri	35
2.4.2. Hyalüronik Asitin Biyolojik Özellikleri	36
2.4.3. Biyomedikal Uygulamalarda HA'nın Yeri	38
3. GEREÇ VE YÖNTEM	41
3.1. Çalışma Dizaynı	41
3.2. Anestezi	41
3.3. Cerrahi Aşama	42
3.4. Post – operatif Bakım	49
3.5. Sakrifikasyon	50
3.6. Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme	50
3.7. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	52
4.1. Histolojik Bulgular	52
4.1.1. İltihap Skorları, Yabancı Cisim Reaksiyonu ve Nekroz	52
4.2. Histomorfometrik Bulgular	58

4.2.1. Yeni Kemik Oluşumu	58
4.2.2. Rezidüel Greft	65
5. TARTIŞMA	67
KAYNAKLAR	78
HAM VERİLER	98
FORMLAR	99
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	100



TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1:Gruplara Göre 3. ve 6. Hafta Yeni Kemik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	58
Tablo 2: Gruplara Göre 3. Hafta Yeni Kemik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	60
Tablo 3: Gruplara Göre 6. Hafta Yeni Kemik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	62
Tablo 4: Gruplara Göre Yeni Kemik 3. Hafta ve 6.hafta Farklarının Değerlendirilmesi	64
Tablo 5: Gruplara Göre 3. ve 6. Hafta Rezidüel Greft Ölçümlerinin Değerlendirilmesi	66



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Hyalüronik asitin moleküler yapısı	34
Şekil 2: Cerrahi aşama öncesi ameliyata hazırlanmış sıçan	42
Şekil 3: Sıçan kalvaryumunda trefin frez ile defekt hazırlanması	43
Şekil 4: Deney grupları	44
Şekil 5: Deney ve kontrol grupları.....	44
Şekil 6: Deneklerde oluşturulan kafa kubbesi üzerindeki iki defekt örneği	45
Şekil 7: Trephine frez ile elde edilen kemik örneği.....	47
Şekil 8: Yalnızca zenogreft uygulanmış denek.....	48
Şekil 9: Zenojen greft ve kollajen membran uygulanmış denek	48
Şekil 10: Zenojen greft ve hyalunik asit membran uygulanan denek.....	49
Şekil 11 : Çalışmada kullanılan hyaluronik asit membran	49
Şekil 12: 3. haftada grup E'de gözlemlenen defekt kenarlarından başlayan yeni kemik oluşumu. Oklar ile yeni kemik alanları gösterilmektedir (H&Ex40)	52
Şekil 13:3. haftada grup HY' de defekt kenarlarından başlayan ve ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları(H&Ex40).....	53
Şekil 14:3. haftada grup X'de defekt kenarlarından başlayan ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları. Rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmiştir (H&Ex40). ...	53
Şekil 15:3. haftada grup X'de defekt kenarlarından başlayan ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları. Rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmiştir (H&Ex40). ...	54
Şekil 16:3. haftada grup X+HY' de defekt kenarlarından başlayarak ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları. Rezidüel greft alanları yıldız işareti ile gösterilmiştir(H&Ex40).....	54
Şekil 17:6. haftada grup E'de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşumu alanları ok ile gösterilmektedir (H&EX40).	55
Şekil 18:6. haftada grup CM'de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşum alanları ok ile gösterilmektedir (H&Ex40)	55
Şekil 19:6. haftada grup HY' de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşum alanları ok ile gösterilmektedir (H&Ex40).	56
Şekil 20:6. hafatada grup X'de gözlemlenen defekt kenalarından başlayan yeni kemik oluşumu alanları ok ile , rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmektedir (H&Ex40)..	56

Şekil 21:6. haftada grup X+CM' de defekt kenarlarından başlarak yeni kemik oluşumu alanları ok ile, rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmektedir (H&Ex40).....	57
Şekil 22:6. haftada grup X+HY'de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşu alanları ok ile, rzidüel greft alanları yıldız ile gösterilmektedir (H&Ex40).	57
Şekil 23:Grupların 3hf- 6.hafta yeni kemik ölçümleri farklarının dağılımı	65
Şekil 24:Gruplara Göre 3. ve 6. hafta reziduel greft dağılımı	66



SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu (YKR)
 Hyalüronik Asit Grubu (Grup HY)
 Hyalüronik Asit ve Greft Grubu (Grup X+HY)
 Kolajen Membran Grubu (Grup CM)
 Kolajen Membran ve Greft Grubu (Grup X+CM)
 Greft Grubu (Grup X)
 Boş Grup (Grup E)
 Kemik Morfogenik Protein (BMP)
 Transferize büyüme faktörü (TGF- α)
 Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR)
 Mezenkimal Kök Hücreler (MSC)
 Hücre Dışı Matriks (ECM)
 Kalsiyum Fosfat (CaP)
 Poliklikolit (PGA)
 Poliaktit (PLA)
 Formaldehit (FA)
 Politetrafloroetilen (PTFE)
 Genişletilmiş Politetrafloroetilen (e-PTFE)
 Yüksek Yoğunluklu Politetrafloroetilen (d-PTFE)
 Hyalüronik Asit (HA)
 Glikozaminoglikan (GAG)
 Trikalsiyum fosfat (TCP)
 Tümör nekroz faktör (TNF)
 Osteoprotegerin (OPG)
 Fibroblast büyüme faktörü (FGF)
 Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF)
 İnsülin benzeri büyüme faktörleri I ve II (IGF I-II),
 Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF)
 Taze donmuş kemik (TDD)
 Dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti (DKKA)
 Demineralize dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti (DDKKA)

Deproteinize sığır kemik mineralleri (DBBM'ler)

Glial hiyalüronat bağlayıcı protein (GHAP)

Hücre içi yapışma molekülü-1 (ICAM-1)

Kemik morfogenetik protein 2 (Bone morphogenetic protein-2, BMP-2)



ÖZET

Kaya, G.(2022). Kollajen Membran ve Hyalüronik Asitin Kemik Rejenerasyonuna Etkisinin Histolojik ve Histomorfometrik İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Oral İmplantoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

İmplant uygulamalarında yetersiz kemik hacmi olduğunda kemik oluşturmak için kullanılan yöntemlerden biri yönlendirilmiş kemik rejenerasyonudur(YKR). Hyalüronik asit(HA) insan vücudunda hücre dışı matrikste bulunur ve birçok biyolojik süreçte görev almaktadır. HA'nın görev aldığı biyolojik süreçlerden bir tanesi de kemik rejenerasyonudur. Bu nedenle HA bazlı biyomateryallerin kullanımı her geçen gün artmaktadır. HA'nın benzil esterlerinden olan HYAFF11 materyalinden örülmüş ağ yapıdaki Hyalonect membranların hücre göçü, hücre proliferasyonu, hücre farklılaşması gibi süreçlere katkısı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmanın amacı, HYAFF11 tabanlı meşlerin YKR üzerindeki başarısını değerlendirmektir. 36 ratın her birinin kalvariyasında 5 mm genişliğinde ikişer defekt hazırlanmıştır. Çalışmada 6 grup belirlenmiştir: boş defekt (grup E); HYAFF11 bazlı ağ (grup HY), kollajen membran (grup CM), ksenogreft (grup X), ksenogreft+HYAFF11 ağ (grup X+HY) ve ksenogreft+kollajen membran (grup X+CM). Ameliyat sonrası 3. ve 6. haftalarda bir seferde 18 sıçan sakrifiye edilmiştir ve histolojik değerlendirme yapılmıştır. Grupların hiçbirinde enfeksiyon, inflamasyon veya nekroz gözlenmemiştir. 3. haftada en fazla yeni kemik oluşumu grup X+CM'de ($0,94 \pm 0,40 \text{ mm}^2$) görülmüş, bunu X+HY grubu ($0,80 \pm 0,21 \text{ mm}^2$) izlemiştir ($p=0,805$). 6. haftada en yüksek yeni kemik oluşumu X+CM ($1,57 \pm 0,66 \text{ mm}^2$) grubunda ölçülmüş, bunu X grubu ve X+HY ($1,39 \pm 0,48 \text{ mm}^2$; $1,34 \pm 0,44 \text{ mm}^2$, sırasıyla) izlemiştir. HY ve CM grubu arasında 3. ve 6. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir (sırasıyla $p=0,556$, $p=0,732$). 3. ve 6. haftalarda kalan greft miktarı açısından X+HY, X+CM ve X grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Gruplar arasında gözlenen yakın değerler göz önüne alındığında, HA'nın YKR'de kullanım için alternatif bir biyomateryal olabileceği sonucuna varılabilir. HA'nın YKR'deki etkinliğini değerlendirmek için farklı greft materyalleri ve defekt boyutları ile daha ileri deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

Anahtar Kelimeler: Kemik rejenerasyonu, Kollajen membran, Hyalüronik asit membran, Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu, Histomorfometri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 37784

ABSTRACT

Kaya, G. (2022). Histological and Histomorphometric Investigation of the Effect of Collagen Membrane and Hyaluronic Acid on Bone Regeneration. İstanbul University, Institute of Health Science, Oral Implantology Department. PhD Thesis. İstanbul.

When there is insufficient bone volume in implant applications, one of the methods used to create bone is guided bone regeneration (GBR). Hyaluronic acid (HA) is found in the extracellular matrix of the human body and is involved in many biological processes. One of the biological processes that HA takes part in is bone regeneration. For this reason, the use of HA-based biomaterials is increasing day by day. It has been reported that the networked Hyalonect membranes knitted from HYAFF11 material, one of the benzyl esters of HA, contribute to processes such as cell migration, cell proliferation, and cell differentiation. The aim of this study is to evaluate the success of HYAFF11-based meshes on GBR. Two 5 mm wide defects were prepared in the calvaria of each of the 36 rats. Six groups were identified in the study: empty defect (group E); HYAFF11-based mesh (group HY), collagen membrane (group CM), xenograft (group X), xenograft+HYAFF11 mesh (group X+HY), and xenograft+collagen membrane (group X+CM). At 3 and 6 weeks postoperatively, 18 rats were sacrificed at a time and histological evaluation was performed. No infection, inflammation or necrosis was observed in any of the groups. In the 3rd week, the most new bone formation was seen in group X+CM ($0.94 \pm 0.40 \text{ mm}^2$), followed by the X+HY group ($0.80 \pm 0.21 \text{ mm}^2$) ($p=0.805$). At 6 weeks, the highest new bone formation was measured in the X+CM ($1.57 \pm 0.66 \text{ mm}^2$) group, followed by the X group and X+HY ($1.39 \pm 0.48 \text{ mm}^2$; $1.34 \pm 0.44 \text{ mm}^2$, respectively) followed. No statistically significant difference was observed between the HY and CM groups at the 3rd and 6th weeks ($p=0.556$, $p=0.732$, respectively). There was no statistically significant difference between X+HY, X+CM and X groups in terms of remaining graft amount at 3rd and 6th weeks. Considering the close values observed between the groups, it can be concluded that HY may be an alternative biomaterial for use in GBR. Further experimental and clinical studies with different graft materials and defect sizes are needed to evaluate the efficacy of HY in GBR.

Key Words: Bone regeneration, Collagen membrane, Hyaluronic acid membrane, guided bone regeneration, Histomorphometry

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 37784

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde diş eksikliklerinin tedavisinde implantların kullanımı diş hekimleri tarafından gün geçtikçe daha yaygın bir şekilde tercih edilmektedir. Yapılan implant tedavilerinde daha başarılı sonuçların alınabilmesi sert ve yumuşak dokuların ideal boyut ve kalitede olmasıyla yakından ilişkilidir. Kemik kaybı bulunan hastalarda ise yatay ve dikey yöndeki kemik kayıplarını gidermek amacıyla kemik ogmentasyonu yöntemine başvurulmaktadır. Bu konuda altın standart olarak otojen greft kullanımı gösterilmektedir. Bu yöntemin dezavantajları arasında donör alan için ikinci bir cerrahi işleme ihtiyaç duyulması, opere edilen bu ikinci bölgede kemik hasarı ya da benzeri çeşitli komplikasyonların görülmesi ve zaman zaman da yeterli miktarda greft elde edilememesi gibi durumlar sayılabilir (1). Güncel çalışmalarla alternatif yöntemler üzerine pek çok çalışma yapılmakta ve yöntemler geliştirilmektedir. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu işlemi bu uygulamalardan birisidir. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu; implant uygulaması öncesinde atrofik alveol kretinde yeni kemik oluşumunu sağlamak amacıyla veya implant çevresindeki dehisens veya fenestrasyon defetklerinin kemik dolumu ile tedavisinde kullanılan bir yöntemdir (1,2).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda kullanılan bariyer teknikleri, değişik materyaller ile periodontal dokuların dışarda tutularak, yeni kemik oluşumu için gerekli hücrelerin yara repopulasyonuna göçüne izin vermek ve süreç için uygun alan oluşturmak amacıyla kullanılırlar. Konuyla ilgili yapılan çalışmalar incelendiğinde; rezorbe olabilen membranların kullanımın daha yaygın olarak tercih edildiği görülmektedir(3). Üretimlerinde ise dura mater, poliglikolik asit, poliüretan, kollajen ve hyalüronik asit gibi materyaller kullanılmaktadır. Bu materyaller defekt bölgesinde sızdırmazlık sağlaması bunların yanında uygulama kolaylığı açısından klinik avantajı ve biouyumlu olması olması sayesinde birçok avantaj sağlamaktadır. Bu avantajlar sayesinde rezorbe olabilen membranların kullanımı günümüz diş hekimliğinde daha fazla tercih edilmekte ve yaygınlaşmaktadır (3,4). Bunların yanı sıra pıhtı stabilizasyonu ve hemostaz sağlamaları gibi etkenler de kullanımlarının yaygınlaşmasındaki etkenlerden bazılarıdır(5).

Yapılan çalışmalarla rezorbe olabilen membranlar üzerinde geliştirmeler yapılmaktadır. Bunun için yeni içerikler kullanılmaya başlanmış ve bu materyallerin özelliklerinden yararlanılmıştır. Bu örneklerden biri de hyalüronik asit içeren membranlardır. Hyalüronik asitli (HA) membranlar (rneğin çalışmamızda kullanmış olduğumuz Hyalonect Membran) ortopedik ve rekonstrktik cerrahi alan uygulamalarında kullanımı yaygınlaşmakta olan membranlar arasındadır(6). Yapısı itibari ile hyalüronik asit kendi doğal formunda viskoz bir jel olarak bulunmaktadır. Bu doğrusal polimer oldukça hidrofilik özellik sergilemektedir. Hyalüronik asitin biyolojik özelliklerini korumak kaydıyla çeşitli kimyasal modifikasyonlar ile oluşturulmuş benzil esterlerinden biri olan HYAFF11 içeren ağ yapıdaki bir membran görevi gören Hyalonect bu örneklerden biridir. İhtiva ettiği HYAFF11 sayesinde rezorpsiyonu sırasında cerrahi alanda hücre dışı matriks yapının işlevine katkıda bulunarak hücre proliferasyonu, g, progenitör hücrelerin farklılaşması, anjiyogenezin desteklenmesi gibi faktörleri etkileyerek kemik rejenerasyonuna katkı sağlaması beklenmektedir(6–12).

Bu deneysel çalışmada HYAFF11 liflerinden hazırlanmış membranların ynlendirilmış kemik rejenerasyonu işlemlerindeki başarısının değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Ayrıca çalışmanın sonuçları rutin klinik kullanımda sıklıkla kullanılan kollajen membranların başarısı ile karşılaştırılarak HA'nın kullanımındaki başarısına dair veriler elde edilmeye çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik

Kemik, sert ve mineralize olması ile birlikte kan damarları içeren, yapımı ve rejenarasyonu sırasında çeşitli hücre tiplerinin görev aldığı canlı bir dokudur. Kemik dokusunun hayatta kalması için yeterli kan temini gereklidir. Bu nedenle anjiyogenez yalnızca kemik gelişimi için değil aynı zamanda bakım ve onarım için de gereklidir.

Dental implant yerleştirmek için yeterli miktarda kemik dokusu gereklidir. Hem estetik sonuç hem de uzun dönemli başarı için kemik miktarı ön emli bir kriterdir. Kemik dokusu yetersiz kaldığında çeşitli yöntemler kullanılarak yeni kemik oluşumu sağlanmaktadır. Kemik greftleri veya büyüme faktörlerinin osteoindüksiyon aracılığıyla kemik oluşumunun artırılması için kullanılması, kemik greftleri veya ikame malzemelerle osteokondüksiyon sağlanarak yeni kemik oluşumu için bir iskele olarak kullanılması, kök hücrelerin veya progenitör hücrelerin transferi ile osteoblastlara farklılaşmasının sağlanması, distraksiyon osteogenezisi ve bariyer membranları kullanarak yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) yeni kemik oluşumu için kullanılan yöntemlerdir. Kullanılan yöntem ne olursa olsun, her zaman kemik iyileşmesinin altında yatan temel bir mekanizma bulunmaktadır(13).

Kemik kırık onarımı gibi durumlarda da görüldüğü üzere benzersiz bir rejenerasyon kapasitesine sahiptir. Kemik, yenilenen doku ile kırıkları veya lokal kusurları iyileştirebilir, ya da bir iz bırakmadan eşit derecede yüksek yapısal organizasyona sahip olarak yeniden üretilebilir. Bu iyileşme modelinin mekanizması, genellikle embriyonik iyileşmenin, osteogenez ve büyümenin bir özeti olarak kabul edilir. Rekonstrüktif cerrahide klinik uygulamalar ile kemik oluşumunu arttırmak için, bu büyük rejeneratif potansiyelden yararlanılmaktadır. Bu sebeple kemik augmentasyonu veya herhangi bir kemik defektinin tedavisi için kemiğin hücresel ve moleküler düzeyde gelişim ve morfogenezinin derinlemesine anlaşılması gerekmektedir(14).

2.1.1.1. Kemik Hücreleri

Kemik oluşumu, bakımı ve onarımı dört farklı hücre tipi tarafından düzenlenir. Osteoblastlar, kemik astar hücreleri ve osteoklastlar kemik yüzeylerini kaplarken, osteositler kemik matrisinin iç kısmında bulunur. Kemik astar hücreleri

osteoblastlara dahil olarak kabul edildiğinden aşağıda anlatılmış olsa da bu grup için ayrı bir başlık oluşturulmayacaktır.

2.1.1.2. Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik oluşumunun aktif olduğu tüm periosteal veya endosteal yüzeyleri kaplayan tek bir tabaka oluşturan büyük küboidal hücrelerdir(15). Osteoblastın çekirdeği ovaldir ve sitoplazması bol miktarda endoplazmik retikulum ve belirgin bir golgi kompleksi ile doludur. Osteoblastlar arasında heterojenlik var gibi görünmektedir ve kemik tipleri ve/veya anatomik bölgeler arasındaki farklılıkları yansıtabilir(16). Osteoblast, kemik matrisinin sentezinden, birleştirilmesinden ve mineralizasyonundan sorumludur. Osteoblastlar, kemik iliğindeki mezenkimal kök hücrelerden kaynaklanır. Osteoblastik soy hücrelerinin farklılaşması, gelişimlerinin çeşitli aşamalarında transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir(17).

Bazı osteoblastlar, matris salgılanmasının tersine çevrilmesi veya komşu osteoblastlar ile yakalanması yoluyla osteosit haline gelir. Matris biriktirme hızı, gömülü osteositlerin sayısını belirleyebilir(18). Diğer herhangi bir kemik türünden çok daha hızlı oluşturulan woven kemik yüksek bir gömülü osteosit sayısına sahiptir(19).

Kemik astar hücresi, osteoblast ailesine ait bir hücre türüdür. Kemik yüzeyini kaplayan inaktif bir osteoblast olarak kabul edilir. Kemik astar hücreleri düzdür ve hem hücre metabolizmasının hem de protein sentezinin düşük aktivitesinin göstergesi olan sitoplazmik organellerin azaltılmış bir hücre yapısına sahiptir. Bu hücreler, bu nedenle, aynı zamanda inaktif veya istirahat osteoblastları olarak adlandırılır. Kemik astar hücreleri, osteoklast aktivasyon faktörlerinin salınması ve osteoklastların bağlanması için kemik yüzeyinin açığa çıkardığı düşünülen aktif kasılma ile rezorpsiyonun başlamasına katılabilir.

Yaşam boyunca, iskelet, onarım ve mekanik adaptasyon amacına hizmet eden sürekli yeniden şekillenmeye maruz kalır. Sinyal moleküllerinin ekspresyonundaki bir dengesizliğin sonuçları, metabolik kemik bozuklukları veya Paget hastalığı, osteopetroz, osteoporoz, artrit veya periodontitiste kemik kaybı gibi hastalıklara sebep olabilir(20,21). Kemiğin yeniden şekillenmesinin düzenlenmesi hem sistemik hem de lokal kontrol altındadır. Lokal faktörler parakrin ve otokrin tarzda işler ve osteoblastlar, osteoklastlar ve inflammatuar ve immün hücreler sinyal moleküllerinin hem kaynakları

hem de hedefleri olarak işlev görür. Çok sayıda sitokin ve büyüme faktörünün kemik oluşumu üzerinde anabolik ve/veya katabolik etkileri vardır(22,23). Bu kemik düzenleyici moleküller arasında paratiroid hormonu, paratiroid hormonu ile ilişkili peptit, kalsitonin, kalsitriol (D vitamininin aktif formu), prostaglandin E2, büyüme hormonu, tiroid hormonu, seks steroidleri (östrojen ve testosteron), leptin, statinler, interferon, tümör nekroz faktörü, transferize büyüme faktörü (TGF- α), TGF- β , kemik morfogenetik proteinleri (bone morphogenetic proteini, BMP'ler), fibroblast büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörü 1, trombosit kaynaklı büyüme faktörler ve interlökinler 1, 6, 11 ve 17 olarak sıralanabilir.

Osteoblast, kollajenlerden ve kollajen olmayan proteinlerden oluşan kemik matrisini oluşturmak için hücre dışı ortama salgılanan makromoleküllerin bir karışımını sentezler. Kemik mineralizasyonu sırasında osteoblastlardan belirli bir mesafede osteoid mineralize kemiğe dönüşür. Woven kemiğin mineralizasyonu, matris veziküller tarafından başlatılır. Aksine, mineralize lameller kemiğin osteoidinde matriks vezikülleri nadiren görülür. Bununla birlikte, kollajen fibrilleri arasında ortaya çıkan ilk mineral, osteoid içinde dağılmış ve mineralizasyon cephesinde biriken küçük ayrı odaklarda bulunabilir. Osteopontin ve kemik sialoproteini gibi kollajen olmayan kemik proteinlerinin bu küçük mineralizasyon odakları ve amorf gri veya retiküler mineralize kemik yamaları ile birlikte lokalizasyonu bu ilişkiyi gösterir. Bu proteinlerin mineralizasyon süreci ile, kemik asidik glikoprotein ve osteokalsin, mineralize kemik matrisi boyunca yaygın bir dağılım paterni gösterir(15).

Kemik matriksi su, mineral, kollajenler ve kollajen olmayan makromoleküllerden oluşan biyolojik bir bileşiktir ancak genellikle kollajen olmayan proteinler olarak adlandırılır. Kemiğin biyokimyasal bileşimi yakın zamanda gözden geçirilmiştir(16,24). Kemik biyokimyasında kollajenler yapısal ve morfogenetik roller oynarlar(25). Mineralize dokularda, çeşitli kollajen olmayan proteinlerle etkileşime girerler ve mineral kristallerinin barınması için bir iskele sağlarlar. Kollajen olmayan kemik proteinleri kabaca glikoproteinler, proteoglikanlar, plazma kaynaklı proteinler, büyüme faktörleri ve diğer makromoleküller olarak sınıflandırılabilir. Kemik matriksi yapısal bir işlevi olmasının yanı sıra biyomineralizasyon ve matriks-hücre etkileşimlerinde rol oynayan molekülleri barındırır ve büyüme faktörleri ve sitokinler için bir rezervuar görevi görür(26).

Doku onarımı sırasında büyüme ve farklılaşma faktörleri sadece lokal hücreler tarafından üretilemez, aynı zamanda mineralize matriksten de salınabilir. Hakim görüş, osteoklastların rezorbsiyon işlemi sırasında mineralize kemik matriksinden salınan büyüme faktörlerinin fonksiyonlarını lokal hücreler üzerinde uyguladığı yönündedir. Kemik matriksinde bulunan büyüme faktörleri arasında insülin benzeri büyüme faktörleri, fibroblast büyüme faktörleri, transforme edici büyüme faktör (TGF- β) ve trombosit kaynaklı büyüme faktörleri yer alır. Kemik rejenerasyonu için gerekli biyokimyasal bileşenler TGF- β süper ailesidir. Bu ailenin üyeleri, embriyonik gelişimi, morfogenezi ve hücre proliferasyonu, farklılaşması, apoptoz ve hücre döngüsü dahil olmak üzere çeşitli fonksiyonel tepkileri düzenleyen faktörlerdir. Etkileri sadece hücre tipine değil, aynı zamanda yerel ortamda bulunan sitokinlere ve diğer büyüme faktörlerine de bağlıdır(26).

2.1.1.3. Osteoklastlar

Osteoklastlar, monosit-makrofaj hematopoietik hücre soyunun hücreleridir(13). Bunların birincil işlevi, çeşitli fizyolojik ve patolojik bağlamlarda kemik matrisini parçalamaktır. Diğer dev hücrelerden, özellikle yabancı cisim dev hücrelerinden farklıdır ve geleneksel olarak bir rezorbsiyon boşluğundaki, Howship lakünadaki yerleriyle tanımlanırlar. Ayrıca, büyük ve çok çekirdekli dirler. Diğer karakteristik özellikler, nükleer faktör B (RANK) için reseptör aktivatörü olması ve makrofaj koloni uyarıcı olanlar dahil olmak üzere bir dizi hücre yüzeyi reseptörlerinin varlığıdır. Boyutları 30 ila 100 μ m arasında değişir ve çekirdek sayısı kabaca 3 ila 30 arasında değişir(14).

Sitoplazmaları asidofiliktir ve sıklıkla vakuoller içerir. Osteoklastın marjinal alanı, mineralize yüzeye yapışır ve gerçek emilim odasını sözde sızdırmazlık bölgesi (temiz bölge) ile kapatır. Bu odanın orta kısmında, hücre yüzeyi, hücreyi oluşturan çok sayıda sitoplazmik kıvrım ile büyütülür. Genişleyen hücre zarı yoluyla, mineral kristallerini çözmek ve organik kemik matrisini parçalamak için hidrojen iyonları ve proteolitik enzimler salınır(13).

Osteoblastların aksine, osteoklastlar hematopoietik kök hücrelerden kaynaklanır. Bu nedenle dahil olan birçok büyüme faktörü ve transkripsiyon faktörünün olması şaşırtıcı değildir, diğer hücrelerin hematopoietik farklılaşması da osteoklast farklılaşmasını etkiler(27).

Kemik rejenerasyonu, kemik oluşumu ve rezorpsiyonu arasındaki hassas dengeye bağlıdır. Kemik rezorpsiyonu, tümör nekroz faktör(TNF) ligand ve reseptör ailelerinin üyeleri olan RANK ve ligandından (RANKL) ve osteoprotegerinden (OPG) oluşan bir sistem tarafından düzenlenir. RANKL, kemik iliği stromal hücreleri, osteoblastlar ve belirli fibroblastlar tarafından üretilirken RANK, osteoklast öncüleri ve olgun osteoklastlar tarafından üretilir. RANK'ın RANKL'a bağlanması, osteoklast farklılaşmasını ve aktivitesini indükler ve osteoklast sağkalımını düzenler. Ancak OPG, kemik iliği stromal hücreleri, osteoblastlar ve belirli fibroblastlar tarafından üretilen, bu bağlanma için rekabet eden RANKL için çözünür bir tuzak reseptördür. Bu nedenle OPG, osteoklast farklılaşması ve aktivasyonunun doğal bir inhibitörüdür.

Bu sisteme herhangi bir müdahale, kemik apozisyonu arasındaki dengeyi değiştirebilir. Kemik rezorpsiyonu sırasında makrofaj koloni uyarıcı faktörü ayrıca bir dizi proinflamatuvar sitokin ve büyüme faktörleri, özellikle interlökin 1 ve tümör nekroz faktörü de önemli rol oynamaktadır.

Kemiğin apozisyonu ve rezopsiyonu arasındaki dengeyi T ve B lenfositleri, dendritik hücreler ve sitokinler gibi bağışıklık sistemi elemanları değiştirebilir. B hücreleri, T hücreleri ve kemik iliği stromal hücreleri tarafından üretilen RANKL ve osteoklast öncüleri, olgun osteoklastlar, T lenfositleri, B lenfositleri ve dendritik hücreler tarafından üretilen RANK ile bu hücreler doğrudan kemik rezorpsiyonunu etkileyebilir. Kemik biyolojisini immün hücre biyolojisi ile ilişkilendiren bu önemli düzenleyici sistemin keşfi, yeni terapötik stratejiler olasılığını yaratmıştır. Rekombinant OPG kullanma girişimleri, kemik erimesini ve kaybını önlemede başarılı olmuştur. Bununla birlikte, OPG verilen bir hastada önemli antikor titrelerinin üretilmesi, bu gelişmeyi erken sona erdirmiştir. RANK sinyalini bloke etmenin başka bir yolu, RANKL'a karşı tamamen insan monoklonal bir antikor olan denosumab'ın kullanılmasıdır. Klinik araştırmalar şu anda osteoporoz, kemik metastazı, miyelom ve romatoid artritli hastalarda kemik kaybı üzerindeki etkilerini araştırmaktadır(28).

2.1.1.4. Osteositler

Osteosit kemik matriksinde lakun adı verilen boşlukta bulunan olgunlaşmış osteoblastlardan oluşan hücrelerdir. Komşu osteositler, yoğun bir kanaliküler sistem boyunca uzanan küçük sitoplazmik uzantılarla birbirine bağlanır. Bu kanalikülolakünar

sistem metabolitlerin ve sinyal molekülerinin osteositler, osteoblastlar ve kemik astar hücrelerinin hücresel iletişimi için difüzyonuna izin verir ve osteositlerin hayatta kalması için vazgeçilmezdir çünkü besinlerin ve atık ürünlerin yoğun mineralize kemik matriksinden difüzyonu neredeyse imkansızdır. Ancak, bu sistemin taşıma kapasitesinin de sınırlamaları vardır.

Memelilerde, osteositleri canlı tutmak için kritik taşıma mesafesi yaklaşık 100 μm 'dir(29). Bu, trabeküler kemikteki hem osteonların hem de paketlerin duvar kalınlığının neden nadiren 100 μm 'yi geçtiğini açıklar. Osteositler, kemik döngüsüne, iyon değişimine ve mekanik sinyallerin algılanmasına dahil olmaları yoluyla kemik homeostazına aktif olarak katılabilir(30).

2.1.2. Kemik Yapısı ve Metabolizması

Kemik, temel olarak destekleyici doku olarak işlev görmektedir. Yine de, sadece vücut desteğinin ötesine geçen işlevleri vardır. Kemikğin işlevleri şunları içerir: mekanik vücut desteği; hareket; ısırma için dişlerin desteklenmesi ve yiyeceklerin ezilmesi; beyin, omurilik ve iç organların desteklenmesi ve korunması; organlar ve hematopoietik hücrelerin kaynağı olan kemik iliğinin muhafazası; ve kalsiyum homeostazı(16).

İki farklı ossifikasyon modu vardır: intramembranöz ve kondral (endokondral) kemikleşme. Doğrudan veya intramembranöz kemikleşme durumunda bağ dokusu kemik matrisi birikimi için bir şablon görevi görür. Dolaylı veya kondral kemikleşme sırasında, kıkırdak bir model oluşturur ve kireçlendikten sonra katı bir taban görevi görür önce kemikle kaplanır, sonra kemikle değiştirilir. Endokondral kemikleşme büyüme kıkırdağında gerçekleşir.

Embriyonik gelişim sırasında, bireysel kemiğin şeklinin doğrudan veya dolaylı olduğu detaylandırılır. Takip eden fetal ve postnatal büyüme dönemlerinde, kemikler üç değişikliğe uğrar: uzunluk ve çapta büyüme, kemiklerin inceltme periost ve endosteal modelleme ile şekillendirme ve yeniden modelleme. Bu nedenle, modelleme ve yeniden modelleme, yalnızca olgun iskelette değil, aynı zamanda kemiğin gelişimi ve büyümesi sırasında da önemli süreçlerdir.

2.1.2.1. Kemik Türleri ve Yapısal Organizasyon

Kollajen fibrillerinin oryantasyonuna bağlı olarak, iki tip kemik dokusu tanımlanabilir: woven kemik ve lameller kemik.

Woven kemik ağırlıklı olarak embriyolarda ve büyümekte olan çocuklarda oluşur ve daha sonra lameller kemik ile değiştirilir. “Yetişkinlerde, woven kemik kırık onarımı sırasında kemik kallusunda olduğu gibi kemik oluşumu gereken durumlarda ve patolojik Paget hastalığı, renal osteodistrofi, hiperparatiroidizm, veya florozis gibi patolojik durumlarda yeniden ortaya çıkar. Woven kemikte, kollajen fibrilleri rastgele bir şekilde seyretmektedir. Bu interfibriller boşluklar nispeten geniştir(31).” Woven kemik, iç içe geçmiş kollajen fibrillere sahip olmanın yanı sıra çok sayıda büyük osteosit ve yüksek mineral yoğunluğu içerir.

Lamellar kemik, matris ile karakterize edilen çok daha karmaşık bir yapıya sahiptir. Paralel bir kolajen fibril düzenlemesinden oluşan katmanlardan oluşur. Bir katmanlı birim yaklaşık 3 ila 5 µm genişliğinde ve fibrillerin oryantasyonu bir lamelden diğerine değişir. Bu nedenle, lamelli kemik, karmaşık, kontrplak benzeri bir yapı olarak kabul edilebilir(32).

Olgun kemik, kortikal (kompakt) ve kanselloz (trabeküler veya süngerimsi) kemikten oluşur. Lamellerin oryantasyonuna bağlı olarak, kortikal kemik matrisi alt bölümlere ayrılır. Temel yapısal birimler osteonlardır (ya da havers sistemleri), merkezde vasküler (haversian) kanalları olan uzunlamasına yönlendirilmiş silindirik yapılardır. İkincil osteonlarda duvar eş merkezli lamellerden oluşurken, birincil osteonlar daha ilkel paralel lifli kemik matrisi ile karakterize edilir.

Periosteal ve endosteal yüzeyler boyunca, apozisyonel büyüme sıklıkla çevresel lamel paketleriyle sonuçlanır. Çevresel lamellerin ve daha önceki osteon nesillerinin kalıntıları, kalan boşluğu interstisyel lamel olarak işgal eder. Kortikal yeniden şekillenme aktivitesinin bu kalıntıları içindeki osteositler genellikle vasküler beslenmeleri kesilir ve ölürler(33).

Süngeröz kemiğin trabekülleri aynı zamanda, hatlara ayrılmış (veya birbirine yapıştırılmış) kemik yapısal birimlerinden, yani paketler veya duvarlardan oluşur. Ayrıca büyümenin erken dönemlerindeki lokal yeniden şekillenmeyi ve süngerimsi kemik döngüsünü yansıtır(34).

2.1.3. Kemik Rejenerasyonu

2.1.3.1. Fizyolojik ve onarıcı rejenerasyon

Rejenerasyon, genel olarak vücuttaki kaybolan bileşenlerin, yapı ve işlevin tamamen restore edilmesi için eşit derecede yüksek yapısal organizasyon öğeleriyle değiştirilmesi olarak anlaşılır. Fizyolojik rejenerasyon, onarıcı rejenerasyondan farklıdır.

Pek çok doku veya organ sistemi fizyolojik rejenerasyona yani hücrelerin veya doku elemanlarının sürekli değiştirilmesine uğrar. Kortikal ve trabeküler kemiğin yeniden şekillenmesi de rejenerasyonu temsil eder; hem hücreler hem de matris değiştirilir.

Onarıcı rejenerasyon, dokular yaralanma veya hastalık nedeniyle kaybedildiğinde gerçekleşir. Kemik, orijinal mimarisini tamamen restore etme konusunda benzersiz bir potansiyele sahiptir, ancak bazı sınırlamalar vardır. Orijinal doku organizasyonu seviyesinin yeniden yapılandırılması sırayla gerçekleşir ve gelişim ve büyüme sırasında meydana gelen kemik oluşumu modelini tekrarlar. Aynı şekilde, yeterli kan temini ve sağlam bir baz tarafından sağlanan mekanik stabilite gibi bazı temel koşulların yerine getirilmesi gerekir. Bu kemik rejenerasyon modeli ve onarım sürecini desteklemek ve korumak için bazı olasılıklar, seçilmiş deneysel çalışmalarda histolojik gözlemlerle gösterilmiştir.

2.1.3.2. Kemik rejenerasyonunun aktivasyonu

Herhangi bir kemik lezyonu (kırık, defekt, implant yerleştirilmesi veya kan beslemesinin kesilmesi gibi), büyüme faktörlerinin ve diğer sinyal moleküllerinin salınımı ve lokal üretimi ile lokal kemik rejenerasyonunu aktive eder. Kemik, büyüme faktörlerinin en zengin kaynaklarından biridir. Klasik konseptinde osteoindüksiyon, heterotopik (ektopik) kemik oluşumunun, yani kemiğin fizyolojik olarak normal olarak bulunmadığı bölgelerde kemik oluşumunun başlatılmasını ifade eder. Bununla birlikte, osteoindüksiyon terimi, ossifikasyonun mevcut kemiklerle temas halinde aktive olması durumunda, yani ortotopik kemik indüksiyonu durumunda, aynı sıklıkla uygulanır. Karışıklığı önlemek için, ortotopik kemik oluşumu için kemik aktivasyonu terimi tercih edilir(35).

Heterotopik kemik oluşumunda, indüklenabilir osteoprogenitör hücreler kemikten uzakta bulunur. Bu mezenkimal hücreler deri altı bağ dokusunda, iskelet kaslarında, dalak ve böbrek kapsülünde bol miktarda bulunur. BMP'ler gibi osteoindüktif uyaranlara tepkileri ortotopik kemik oluşumundan daha karmaşıktır ve aslında endokondral kemik oluşumunu taklit eder. BMP'lerin sıçanlara deri altına implantasyonundan sonra, mezenkimal hücrelerin çoğalması 3 ila 4 gün sonra başlar. 5-8. günlerden itibaren kıkırdak gelişir ve 1 gün içinde mineralleşmeye başlar. Kalsifiye kıkırdak vasküler invazyonu ve kemik ikamesi 10 ila 11. günler ve sonrasında takip eder. İndüksiyon, indüklenabilir osteoprogenitör hücreler üzerinde etkiliyse, orta kıkırdak farklılaşması zorunlu görünmektedir. Daha da önemlisi, yanıt her zaman dolaylı kemik oluşumdur.

Ortotopik kemik oluşumunda, osteoprogenitör hücreler, kemik iliği stroması, periosteum, endosteum ve intrakortikal kanallar gibi kemiğe doğrudan yakın dokularda bulunur. Bu hücreler, osteoindüktif sinyallerle proliferasyon ve farklılaşma ile doğrudan osteoblastlara yanıt verir. Böylece ortotopik kemik indüksiyonunda, indükleyici ajanlar belirlenen osteoprogenitör hücreler üzerinde etki eder ve hücrel yanıt doğrudan kemik oluşumdur. Gecikme fazı kısadır - nadiren 1 ila 3 günden uzundur - ve yeni oluşan kemik önceden var olan kemik yüzeyleri üzerine serilir.

2.1.3.3. Kemik Defektlerinin Onarımı

Kemik defektlerinin onarımı, kemik rejenerasyonu çalışması için iyi bir modeldir. Kırıkların aksine, defektler mekanik faktörlere ve kan akışının tıkanmasına daha az maruz kalır. Bu nedenle, cerrahi ve farmakolojik önlemlerin kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisiyle ilgilenen birçok klasik deneyde defekt iyileştirme kullanılmıştır.

Johner, tavşanların kaval kemiğinde 0,1 ila 1,0 mm çaplı sondaj deliklerinin iyileşmesini incelemiştir. Bu deliklerdeki kemik oluşumu, osteoklastik rezorpsiyon olmadan birkaç gün içinde başlamıştır. Osteon (0,2 mm) aralığında çapa sahip delikler eşmerkezli olarak lameller kemik ile doldurulmuştur. Daha büyük deliklerde, önce bir woven kemik iskelesi oluşturulmuş ve daha sonra 150 ila 200 µm çapa sahip yeni oluşturulmuş intertrabeküler boşluklarda lameller kemik biriktirildiği saptanmıştır. Apozisyonel büyümede olduğu gibi, lameller kemiğin matriks birikim hızı günde birkaç mikronla sınırlandırılırken, woven kemik daha büyük defektleri hızla köprülemiştir(34).

Çalışmanın sonunda hem küçük hem de büyük defektler kompakt kemik ile doldurulmuştur. Bununla birlikte, woven kemik tarafından bu hızlı köprüleme için bir eşik vardır. Tavşan kortikal kemiğindeki delikler için bu eşik yaklaşık 1 mm'dir(36).

Köpek pelvisinde gözenekli asetabular bileşenlere kemik büyümesi üzerine yapılan deneysel çalışmalarda, sık sık alıntılanan osteojenik atlama mesafesi ifadesinin özetlenmesi de benzer sonuçları göstermektedir(37). Bu terim, kemiğin tek bir sıçramada 1 mm'den daha geniş boşlukları geçemediğini gösterir. İmplantlar söz konusu olduğunda, defektlerin köprülenmesi sadece kemikli taraftan başladığı için durum daha da zorlaşır. Bu, daha büyük defektlerin veya boşlukların süresiz olarak açık kalacağı anlamına gelmez, ancak doldurma daha uzun sürer ve 3 ila 5 mm'lik çaplı defektlerin onarımı tamamlanana kadar aylar olmasa da birkaç hafta boyunca devam edeceğine şüphe yoktur. Dental implantların etrafındaki kemik iyileşmesi, yakın zamanda ortaya koyulduğu üzere implant yüzeyi ile çevreleyen kemik arasındaki mesafe ve implant yüzeyi özellikleri ile ilişkili olarak analiz edilmiştir(38).

Ancak kemik dolumunun tamamlanması iyileşmenin tamamlandığı anlamına gelmez. Kemik rejenerasyonu kompakt görünse de, yapısı hala osteonal kortikal kemiğinkinden uzaktır. İkincisi, haversian kanallar yeniden modelleme ile oluşturulmalıdır. Defekt oluşumundan yaklaşık 3 hafta sonra, orijinal defekt çapının kenarını çevreleyen kortekste kemiğin yeniden şekillenmesi başlar. Yeniden şekillenme, delme sırasında üretilen vasküler hasar da dahil olmak üzere çevresel yerel doku ortamı tarafından etkinleştirilir. Defektin kenarından, yeniden şekillenme yeni oluşan kemiğe doğru ilerler ve onun yerini uzunlamasına yönlendirilmiş, ikincil osteonlar alır. Birkaç ay içinde küçük kortikal defektler tamamen yeniden yapılandırılır ve ancak ayrıntılı mikroskobik değerlendirme ile tanımlanabilir(38).

Özetle, küçük kortikal defektlerin onarımı, gelişme ve büyüme sırasında kompakt kemik oluşumuna çok benzeyen iki aşamaya ayrılabilir. Bir defektin delinmesiyle üretilen basit lezyon, apozisyonel kemik oluşumu ile defektin doldurulmasıyla başlayan ve daha sonra haversian yeniden şekillenme ile defekt bölgesinin yapısal bir entegrasyonuna yol açan programlanmış bir olaylar dizisini aktive ediyor gibi görünmektedir.

Kemik dokusu dikkate değer bir rejeneratif potansiyel sergiler böylelikle orijinal yapısını ve mekanik özelliklerini mükemmel bir şekilde geri yükler. Ancak bu

kapasitenin sınırlamaları vardır ve hatta bazı koşullar yerine getirilmezse başarısız olabilir. Kemik onarımını olumsuz etkileyen ve hatta engelleyen faktörler; vasküler beslemenin başarısızlığı, mekanik instabilite, büyük boyutlu defektler ve yüksek proliferatif aktiviteye sahip rekabet eden dokular olarak sıralanabilir. Kemik rejenerasyonunu arttırmak için ise; büyüme faktörleri ile osteoindüksiyon, kemik greftleri veya ikameleri ile osteokondüksiyon, kök hücrelerin veya progenitör hücrelerin transferi, distraksiyon osteogenezisi, bariyer membranlar kullanılarak YKR gibi tek başına veya kombinasyon halinde çeşitli seçenekler mevcuttur(39).

2.2. Greft Materyalleri

Biyomalzemelerin kullanımı modern rejeneratif diş hekimliğinde çok önemli bir rol oynamıştır. Bir zamanlar kemik boşluklarını doldurabilen pasif yapısal materyaller olarak hareket ettikleri düşünülürken, son zamanlarda biyoaktif özelliklere sahip bir dizi rejeneratif ajan geliştirilmiştir. Bu materyaller, kemik rejenerasyonunu kolaylaştırmak için hareket eder ve kemik gelişimi prosedürlerinin kolaylığını ve öngörülebilirliğini büyük ölçüde arttırmıştır(40).

İmplant diş hekimliğinde ve oral cerrahide kemik grefti malzemelerinin kullanımı son yirmi yılda o kadar yaygınlaşmıştır ki, her yıl yeni ürünlerin geliştirilmesi hızla devam etmektedir. Her kemik grefti materyalinin kendine özgü rejeneratif özellikleri vardır. Kemik grefti malzemelerinin en yaygın sınıflandırması aşağıdakileri içerir:

- Otogreftler (aynı birey)
- Allogreftler (insan kadavra kemikleri)
- Ksenograftlar (hayvan kaynaklı)
- Alloplastlar (sentetik kaynaklı)

Orijinal olarak kemik greft materyalleri, ana kriterleri biyouyumluluk olmak üzere pasif, yapısal bir destek ağı olarak hizmet etmek üzere geliştirilmiştir. Bununla birlikte, doku mühendisliği ve rejeneratif tıptaki ilerlemeler, histolojik analizle doğrulandığı gibi, rejeneratif kapasitelerinin her birini artırmıştır. Günümüzde birçok kemik grefti, uygulandıkları alanda yeni kemik oluşumuna daha fazla rehberlik etmeyi amaçlayan hem mikro hem de nano ölçekte özel olarak tasarlanmış yüzey topografyalarına sahiptir(41).

Kemik grefti materyallerinin geniş kullanım alanları göz önüne alındığında, her klinik durumda tek bir materyalin kemiği güçlendirme görevini yerine getiremeyeceği beklenmelidir. Ayrıca, birçok klinik durumda, daha iyi ve daha öngörülebilir sonuçlara yol açmak için iki veya daha fazla kemik aşılama materyalinin bir kombinasyonu gereklidir(42).

Her greft materyali, optimum biyouyumluluk, güvenlik, ideal yüzey özellikleri, uygun geometri ve kullanım ve ayrıca iyi mekanik özellikler dahil olmak üzere kullanımıyla ilgili çeşitli özellikleri yerine getirmelidir. Bununla birlikte, kemik greftleri rutin olarak osteojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri ile karakterize edilir. Bu nedenle ideal greft; kemik aşılama iskelesi içinde yeni kemik matrisi oluşturabilen osteojenik progenitör hücreler içermeli, mezenkimal hücreleri olgun kemik oluşturan osteoblastlara farklılaştırmak için toplayarak ve indükleyerek osteoindüktif potansiyel göstermeli ve üç boyutlu doku büyümesini kolaylaştıran bir osteokondüktif iskele oluşturmalıdır. Sonuç olarak, kemik grefti için altın standart, bu üç önemli biyolojik özelliğe sahip olduğu için otojen kemiktir. Yeni kemik oluşumunu iyileştirmedeki güçlü yeteneğine rağmen, ekstra cerrahi zaman, maliyet, sınırlı tedarik ve ek hasta morbiditesi gibi sınırlamalar alternatifleri zorunlu kılmıştır(43).

2.2.1. Kemik Greftlerinin Fizyolojisi

Kemik oluşumunun kemik greftleri aracılığı ile sağlanmasının üç temel mekanizması bulunmaktadır:

1. Osteogenez
2. Osteoindüksiyon
3. Osteokondüksiyon

2.2.1.1. Osteogenez

Kemik dokusunda yeni kemiğin oluşması osteogenez olarak ifade edilir. Kemik greftleri aracılığıyla bu prosesin yerine getirilebilmesi için greft canlı osteoblast ve/veya osteoblast öncüllerinin (kök hücreler) ihtiva etmelidir(44). Otojen greft materyalleri osteojenik özelliği bulunan yegane grefttir. Osteojenik potansiyel kök hücrelerin uygun koşullar altında olgun osteoblastlara farklılaşması olarak tanımlanmıştır. Bu kök hücreler yani osteoblast öncülleri greft materyali içinde bulunan osteoblastlara kıyasla kemik rejenerasyonunda daha fazla rol oynar(45).

Osteoprogenitör hücreler periostta, kemik iliğinde, kemikte ve farklı dokularda bulunurlar.

2.2.1.2. Osteoindüksiyon

Konsept olarak osteoindüksiyonu ilk kez kemik morfogenetik proteinlerinin keşfederek Urist belirtilmiştir. Tanım olarak osteoindüksiyon, primitif mezenkimal hücrelerden gelişen osteoprogenitör hücreler tarafından kemik matriksinden kaynaklanan indüksiyon ajanlarının aracılığı ile yeni kemik oluşumunu ifade edilir(46). Yeni kemik oluşumu mezenkimal hücrelerin proliferasyon olarak osteoblastlara farklılaşmasıyla gerçekleşir. Osteoindüksiyon sürecinde en çok yer alan büyüme faktörleri; fibroblast büyüme faktörü (FGF), kemik morfogenetik proteinler (özellikle -2, -4, -6, -7, -9 ve -14), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF-B1 ve B2 insülin benzeri büyüme faktörleri I ve II (IGF I-II)), retinoik asit ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) olarak sıralanabilir(47).

2.2.1.3. Osteokondüksiyon

Yeni kemik oluşumunu sağlamak amacıyla alıcı sahaya kemik greftinin uygulanması sonrasında materyalin rezorpsiyona uğramasıyla kemik apozisyonu gerçekleşir. Bu sırada osteoblastlar, mezenkimal hücreler ve osteoklastlara greft materyali tarafından çatı işlevi görmesi osteokondüksiyon olarak tanımlanır. Bu amaçla uygulanan greftlerin yüzey pürüzlülüğü, porözite, por büyüklüğü gibi mekanik özelliklere sahip olması gerekmektedir(48,49). Alıcı sahadaki hücresel yoğunluk, sahanın boyutları, greft stabilizasyon gibi faktörler yeni kemik oluşumu sırasında önemli rol oynamaktadır(10).

2.2.2. Greft Materyalinin Özellikleri

Kemik greft materyalleri, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda (YKR) çeşitli amaçlara hizmet edebilir. Bunlar:

- Membran çökmesini önlemek için membranı desteklemek
- Alıcı bölgeden kemik büyümesi için bir iskele görevi görmek
- Alıcı bölgeden kemik büyümesini stimüle etmek
- Üstteki yumuşak dokulardan gelen basınca karşı mekanik bir kalkan sağlamak

- Arttırılmış hacmi rezorpsiyondan korumak

Kemik greft materyallerinin kullanımına ilişkin klinik endikasyonlar, küçük peri-implant lezyonların tedavisinden daha geniş çaplı devamlı defektlerin tedavisine kadar uzanır.

Bu geniş amaç yelpazesi göz önüne alındığında, tek bir malzemenin tüm gereksinimleri karşılayamayacağı beklenebilir. Bu nedenle, etkili bir sonuç sağlamak için genellikle iki veya ikiden fazla materyali birleştirmek gerekli olacaktır.

Köken veya üretim yönteminden bağımsız olarak, kemik grefti materyali belirli talepleri karşılamalı ve kemik ogmentasyon prosedürlerine uygun olması için tanımlanmış bazı materyal özelliklerini göstermelidir. Bir kemik ikame materyali, hastalık bulaşma veya immünolojik reaksiyon riskinden kaçınmak için güvenli ve biyouyumlu olmalıdır. Bu, ameliyat sırasında yanlış bir uygulama olmadığı sürece otogreftlerle ilgili bir sorun değildir(36).

Greft geometrisi, malzemenin içinde kemik oluşumu için çok önemli olan kan damarlarının büyümesini desteklemelidir. Bu, malzemenin yalnızca gözenekli olması değil, aynı zamanda birbirine bağlı makro gözeneklere sahip olması gerektiği anlamına gelir. Optimal makro gözenek boyutuyla ilgili çelişkili raporlar vardır, ancak bunun 100 ila 500 µm aralığında olduğuna inanılmaktadır(50). Makro gözeneklilik blok şeklinde kullanılan kemik dolgu malzemelerinin revaskülarizasyonunda muhtemelen en önemli özelliktir. Partikül greftler kullanıldığında, greft partikülleri arasında vasküler içe büyümenin gerçekleşmesi daha olasıdır. Bu nedenle, kemik dolgu malzemesinin aşılınmış alana çok sıkı bir şekilde sıkıştırılmaması, böylece artırılmış hacmin engellenmeden yeniden damarlanmanın sağlanması önemlidir.

Kemik greft malzemelerinin yüzey özellikleri, kimyasal bileşimleri, mikro gözeneklilikleri, yüzey pürüzlülükleri, kristallikleri ve kristal boyutları ile belirlenir. Bu yüzey özellikleri, ilk protein adsorpsiyonu için büyük önem taşımaktadır(51,52).

Son olarak, greft materyalinin kullanım özellikleri klinik uygulamayı kolaylaştırmalıdır. İstenen ilave malzeme özellikleri klinik endikasyona bağlıdır: Kemik dolgu malzemesi, çekim soketleri gibi daha sonra implantların yerleştirileceği alanlara uygulanıyorsa, malzeme tercihen yeni kemik oluşumu ile birlikte veya yeniden şekillenme sırasında rezorbe edilmelidir, böylece implantların tek başına canlı kemiğe

yerleştirilmesine izin verir. Diğer durumlarda, düşük ikame oranı veya hatta emilmeyen bir malzeme daha uygun olabilir.

Tüm bu materyal özellikleri, yeni bir kemik greft materyali uygulanmadan önce dikkatlice değerlendirilmelidir. Laboratuvarında, osteoblastik hücre hatları kullanılarak yapılan in vitro çalışmalar, ana hedef hücrelerin hücre proliferasyonu, farklılaşması ve hücre dışı matris üretimi ile ilgili olarak malzemeye nasıl tepki verdiğini ortaya çıkarabilir. Ayrıca, osteoklastların malzeme yüzeyinde rezorpsiyon çukurları geliştirip geliştiremeyeceği veya fizikokimyasal çözünmenin gerçekleşip gerçekleşmeyeceği de belirlenebilir. Deneysel belgeler, diğer iyi belgelenmiş kemik büyüme materyalleri ile standartlaştırılmış karşılaştırmalı çalışmalardan elde edilen verileri içermelidir(53).

2.2.3. Greft Materyal Tipleri

2.2.3.1. Otojen Kemik Greftleri

Otogreftler intraoral veya ekstraoral donör bölgelerinden toplanabilmekte ve yaklaşık %30 organik ve %70 inorganik bileşiklerden oluşmaktadır. Organik bileşiklerin %90 ila %95'i kollajendir (tip I) ve geri kalanı osteokalsin, kalsitonin, osteopontin ve sialoproteinler gibi kollajen olmayan proteinlerdir. İnorganik bileşen, ağırlıklı olarak kristalli hidroksiapatit formundaki kalsiyum fosfattan oluşmaktadır.

Otojen kemik transplantasyonu ile, kemik uyarıcı büyüme faktörleri ve canlı osteojenik hücreler, alıcı bölgeye getirilir(54). Hücrelerin miktarı ve büyüme faktörlerinin konsantrasyonu, bireyler arası büyük farklılıklar göstermektedir ve büyük ölçüde hastanın yaşına, sistemik rahatsızlığı olup olmasına ve donör bölgenin yeri gibi faktörlere bağlıdır.

Otojen kemik greftleri büyüme faktörleri, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), dönüştürücü büyüme faktörü, insülin benzeri büyüme faktörleri I ve II, trombosit kaynaklı büyüme faktörü ve fibroblast büyüme faktörleri A ve B'yi içerir. Otogreftlerin rezorpsiyonu sırasında büyüme faktörleri esas olarak kemik matrisinde bulunur ve salınırlar. Otogreftin mutlak yüzey alanı ne kadar yüksek olursa, büyüme faktörleri o kadar hızlı serbest bırakılır. Bu, süngersi kemik bloklarının, kompakt kemik bloklarından daha kolay büyüme faktörlerini saldığı ve partiküllü otogreftlerin,

bloklardan daha hızlı kemik uyarıcı büyüme faktörlerinin salınımını gösterdiği anlamına gelmektedir(52).

YKR prosedürlerinde en önemli hücreler, osteojenik hücrelerdir (osteoblastlar, preosteoblastlar ve pluripotent kök hücreler). Bu hücreler en çok trabeküler kemikte bulunurken kompakt kemik en az osteojenik hücre miktarını göstermektedir. Genç sağlıklı bireylerdeki osteojenik potansiyel, yaşlı hastalardaki osteojenik potansiyelden daha büyüktür, bunun nedeni, esas olarak, mevcut osteoblastların bozulmuş fonksiyonundan ziyade yaşlı bireylerde osteoprogenitör hücrelerin proliferatif kapasitesinin azalmasıdır. Lakünalarında kalan transplante edilmiş osteositlerin herhangi bir rol oynadığına dair bir kanıt bulunmamaktadır. Ancak YKR prosedürlerinden sonra kemik biyopsilerinde canlı osteositlerin varlığı, hücrelerin transplantasyon prosedüründe hayatta kalabileceğini doğrulamaktadır. Kortikal ve süngerimsi otogreftlerin geometrisi büyük ölçüde değişir ve esas olarak hastanın yaşı ve donör bölgesinin konumuna bağlıdır. Otogreftler farklı yerlerden elde edilebilir ve farklı şekillerde kullanılabilir(55).

Otojen blok greftler, sabitleme vidaları ile sabitlendiği varsayılarak, üstteki yumuşak dokudan gelen basınca karşı mekanik stabilite sağlayan tek greftlerdir. Revaskülarizasyon hızı blok greftin geometrisine ve dolayısıyla öncelikle donör bölgeye bağlıdır(56). Blok grefti örtmek için hücre tıkaçı bir membranın kullanılması revaskülarizasyonu yavaşlatabilir(26), ancak alıcı bölgedeki kortikal plağa küçük bir frezle nüfuz edilirse, yeni kan damarlarının içe büyümesi kolaylaştırılabilir(57). Örneğin mandibular gövdeden gelen kompakt bloklar, iliak krestten gelen kortikokanselöz bloklardan daha yavaş revaskülarizasyon gösterir(54). Aynısı emilim hızı için de geçerlidir. Kortikokanselöz bloklar, 6 ay içinde başlangıç hacminin %60'ına kadar rezorbsiyon gösterebilir(58,59). Kranial donör bölgelerinden gelen kortikal bloklar da rezorbsiyona uğrar, bu ancak daha az ölçüdedir(57).

Yıllar geçtikçe, blok greftler, sürünen ikame olarak adlandırılan yeni oluşturulmuş kemik ile değiştirilecektir. Bu yeniden şekillenme benzeri süreçte, greft matrisinde bulunan kemik uyarıcı büyüme faktörleri açığa çıkar ve ek yeniden şekillenmeye neden olmaktadır.

Otojen partiküllü greftler, blok greftlere göre daha fazla osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon gösterir, çünkü çok daha geniş bir açıta kalan greft yüzeyi alanı

sayesinde büyüme faktörleri sunmaktadır(55). Bir otogreftin osteojenik potansiyeli, partikülleşirse artarken, mekanik manipülasyon yoluyla toplam osteojenik hücre miktarı azalmaktadır(60). Bu, aynı blok bir kemik değirmeninde partikül haline getirildikten sonra iliak krestten gelen bir bloktaki hücre sayısının partiküler materyaldeki hücre sayısından daha yüksek olduğu anlamına gelmektedir. Ancak bloklar partiküllü ise greftin sabitlenme olasılığı ortadan kalkar ve greftin mekanik stabilitesi azalır. Ek olarak, rezorpsiyon oranı önemli ölçüde artar(61). Deneysel ve klinik çalışmalardan elde edilen çok sayıda bilimsel kanıt, oldukça osteojenik bir greftin gerekli olduğu kemik rejenerasyonu prosedürleri için partiküllü otogreftlerin uygunluğunu belgelemektedir(36,62,63).

Kemik kazıyıcılar ile elde edilen otojen kemik, son birkaç yıldır, ekstraksiyon soketleri ve lokalize sinüs tabanı yükseltme prosedürleri gibi minör kemik rejenerasyon prosedürleri veya distraksiyon tipi defektlerin tek başına veya kemik yerine geçen materyallerle kombinasyon halinde kapatılması için savunulmaktadır(64–66). Bu teknikle, kemik yüzeyi kazınarak küçük kortikal kemik parçacıkları toplanır; bu, 5 cm³'e kadar kemiğin elde edilebildiği basit bir ağız içi yaklaşımdır(64). Canlı osteositlerin lakunalarında greftleme prosedüründen sağ çıktıkları gösterilmiştir, ancak greftin kortikal yapısı nedeniyle, çok az sayıda osteoblast ve osteoblast öncülerinin bulunması beklenmektedir. Küçük “parçacık” boyutu (1.0 ila 1.3 0.2 0.1 mm) nedeniyle rezorpsiyona karşı direnç muhtemelen düşüktür. Büyüme faktörlerinin içeriğine ilişkin veriler ise henüz mevcut değildir .

Kemik kolektörleri ile elde edilen otojen kemik, implant yatağının hazırlanması sırasında kullanılan aspirasyon cihazına bağlanan bir filtre vasıtasıyla kemik tozunun toplandığı bir hasat yöntemidir. Bu yöntemin en avantajlı yönü otojen kemik grefti alınması hasta için ek bir rahatsızlığa neden olmamasıdır. Piyasada farklı toplama verimliliklerine sahip birkaç farklı kemik toplayıcı vardır, ancak toplanabilecek kemik miktarının yalnızca küçük implant çevresi defektlerini kapsaması beklenebilir(67).

Greft materyali sıklıkla ağız boşluğundan gelen bakterilerle kontamine olabilmektedir. Bu kontaminasyon, hastanın ameliyat öncesi klorheksidin ile gargara yaptırılması ile azaltılabilmekte ancak ortadan kaldırılamamaktadır (68,69) .

Alkalın fosfataz ve osteokalsin eksprese eden canlı osteositler ve osteoblast benzeri hücreler, kemik toplayıcılardan alınan greftlerde tanımlanmıştır. Bununla birlikte, bu hücreler, diğer otogreftlerden açıkça daha düşük sayılarda bulunur ve yalnızca sınırlı büyüme potansiyeline sahiptir(60,66). Kemik kolektörlerinden alınan greftlerin rezorbsiyon direnci ve mekanik stabilitesi araştırılmamıştır, ancak toz benzeri parçacık boyutu sebebiyle hemen hemen hiç olmaması beklenmemektedir.

Otogreftler, kemik rekonstrüktif cerrahide hala altın standart olarak kabul edilmektedir(70). Ancak otogreft kullanımına ilişkin önemli dezavantajlar, alternatif arayışlarını yoğunlaştırmıştır. İlk olarak, kortikokanselöz blok greftlerin %60'ına kadar öngörülemez bir rezorbsiyon söz konusudur(59). İkincisi, donör saha morbiditesi olabilmektedir. Bu, en çok ekstraoral donör bölgeleriyle ilgili olarak belirgindir(71), ancak aynı zamanda intraoral greftleme prosedürlerinde de önemli olabilmektedir. Son olarak, otojen kemiğin sınırsız miktarda bulunamaması otojen kemik greftinin dezavantajlarından biridir.

2.2.3.2. Allogreftler

Allogreftler, bir donörden elde edilen ve aynı tür içindeki başka bir bireyde kullanılan kemikten oluşmaktadır. 120 yılı aşkın bir süredir ortopedik cerrahide bir kişiden diğerine kemik nakli yapılmaktadır(72).

Allogreftler genellikle kemik bankalarında saklanır ve taze donmuş kemik (TDD), dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti (DKKA) veya demineralize dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti (DDKKA) olarak kullanılabilir. TDD, yüksek immünolojik rejeksiyon ve hastalık bulaşma riski nedeniyle YKR prosedürlerinde nadiren kullanılırken, DDKA ve DDKKA'nın dondurularak kurutulmasının, materyalin immünojenitesini azalttığı ve klinik sonucu potansiyel olarak iyileştirdiği bildirilmektedir. Allogreftler, hem kortikal hem de süngerimsi kökenlerden bloklar halinde veya partikül formunda elde edilebilmektedir(73,74).

DKKA ve DDKKA'nın biyouyumlu olduğu ve BMP'ler gibi osteoindüktif moleküller içerdiği deneysel çalışmalar ile ortaya koyulmuştur(35). Allogreftlerin demineralizasyonu, BMP'leri açığa çıkarmak ve ek olarak onların anında osteoindüktif potansiyellerini artırmak için tasarlanmıştır. Bununla birlikte, demineralizasyon işlemi sırasında, DKKA mekanik stabilitesinin bir kısmını kaybeder ve bu nedenle DDKKA,

kendi kendine yeterli olmayan kemik defektlerinde kullanılıyorsa, yer tutucu bir malzeme ile birlikte kullanılmalıdır. Farklı DDKKA grupları ile yapılan çalışmalarda çok farklı BMP konsantrasyonları içerdiği gösterilmiştir(75,76). Bu nedenle osteoindüktivitenin bu duruma göre değişkenlik göstermesi beklenmektedir.

Domuzların mandibulalarında yapılan deneysel bir karşılaştırmalı çalışmadan elde edilen histolojik kanıtlar, allogreftlerin otogreftlere (pozitif kontrol) ve pıhtıya (negatif kontrol) kıyasla yeni kemik oluşumunu yavaşlattığını göstermiştir. DDKKA osteokondüktif özellikler göstermiş, ancak olası bir osteoindüktif potansiyelin bir etkisi olamamıştır(62). Bu nedenle, TDD, DKKA ve DDKKA, tartışmasız olarak osteoindüktif moleküller içerir. Bununla birlikte, bu BMP'lerin konsantrasyonlarının klinik olarak anlamlı bir osteoindüktif potansiyel ortaya çıkarmak için yeterli olup olmadığı ve aktif bir formda bulunup bulunmadığı hala tartışmalıdır.

Allogreftler Amerika Birleşik Devletleri'nde yaygın olarak kullanılırken, Avrupa'daki yerel düzenlemeler, klinisyenler arasındaki yaygın popülerliğini sınırlayan insan kemiğinin toplanmasını kısıtlamaktadır. Otogreftlerin sınırlamaları ile karşılaştırıldığında, donör saha morbiditesinin bir sorun teşkil etmemesi ve yüksek miktarda elde edilebilmeleri allogreftlerin avantajlarından. Ancak otogreftlerde görüldüğü gibi rezorbsiyonun gerçekleştiği bildirilmektedir(73).

2.2.3.3. Zenogreftler

Zenogreftler veya zenojenik kemik ikameleri, hayvanlardan elde edilen kemik mineralinin, immünojenik reaksiyon ve hastalık bulaşması riskini ortadan kaldırmak için organik bileşenin çıkarıldığı kalsifiye kemiğe benzer minerallerden oluşur.

Mercan türevi kemik ikameleri, 1980'lerin sonlarında ortopedik ve kraniyofasiyal cerrahide popülerlik kazanmıştır. Kalsifiye mercanların farklı türlerinin, insan süngerimsi kemiğine benzer bir geometriye sahip kalsiyum karbonat iskeletine sahip olduğu ve birbirine bağlı 200 ila 600 µm makro gözeneklere sahip olduğu bulunmuştur. Koralin kalsiyum karbonat, fosfor ile hidrotermal değişim reaksiyonu ile hidroksi apatite dönüştürülmüştür. Koralin hidroksi apatit kemiğin mineral bileşeni ile hemen hemen aynı olmasına rağmen, deneysel uygulamalar osteokondüktif potansiyelin başka ikame malzemelerinkinden az olduğunu bildirmiştir(62,77). Günümüzde

koralin hidroksi apatit, geç komplikasyon oranlarının yüksek olması nedeniyle YKR prosedürlerinde onlay greftler için nadiren kullanılmaktadır(78).

Parçacık olarak kullanıldığında, granüller göç etme eğilimindedir ve büyütülmüş bölgede tutulanlar ağırlıklı olarak fibröz doku tarafından kapsüllenir. Öte yandan bloklar, çoğunlukla artırılmış hacim boyunca kemik oluşumu gösterir, ancak geç ayrılma geliştirmeye eğilimlidir(55).

Kalsiyum karbonattan yapılmış kalsifiye bir dış iskeletten oluşan bir grup deniz yosunu da vardır. Doğal malzeme, yaklaşık 700°C'de amonyum fosfat ile bir değişim reaksiyonu yoluyla florhidroksiapatite dönüştürülür. Morfolojik yapı, ortalama 10 µm çapında paralel olarak düzenlenmiş ve mikro deliklerle birbirine bağlanmış gözeneklerden oluşur. Bu nedenle gözenek konfigürasyonu vasküler içe büyüme için ideal değildir, ancak gözeneklerin hücrel istilası ve doğrudan malzeme yüzeyinde kemik birikimi belgelenmiştir(79,80). Bunun yerine neovaskülarizasyonun kemik ikame partikülleri arasında gerçekleşmesi beklenir. Koralin hidroksi apatitlerin aksine, fikojenik florapatit enzimatik ve hücrel bozunma yoluyla yavaş rezorpsiyona uğrar, ancak otogreftlerden daha düşük orandadır(79).

Doğal kemik kaynaklarından elde edilen zenogreftler, çok sayıda deneysel ve klinik çalışmada kapsamlı bir şekilde araştırılmıştır. Özellikle süngerimsi sığır kemiği, süngerimsi insan kemiğine yakın benzerliği nedeniyle bu kemik ikame malzemeleri için bir kaynak olarak kullanılmaktadır. Organik bileşen, immünolojik reaksiyon ve hastalık bulaşma riskini ortadan kaldırmak için ısıl işleme, kimyasal ekstraksiyon yöntemiyle veya ikisinin bir kombinasyonu ile çıkarılmaktadır(75,81). Bununla birlikte, sığır kemiği ikamelerinde organik kalıntıların varsayımsal riskine rağmen, bu materyallerden hastalık bulaştığına dair herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Buna karşılık, allojenik materyallere bağlı insan immün yetmezlik virüsü ve hepatitin bulaştığı birkaç vaka bildirilmiştir(42).

Deproteinize sığır kemik mineralleri (DBBM'ler), üretim yöntemlerinin biyolojik davranışları üzerinde güçlü bir etkisi olmasına rağmen, genel olarak biyouyumlu ve osteokondüktif olarak bilinmektedir. Sığır süngerimsi kemiğinden türetilen, biri yüksek sıcaklıklarda ve diğeri esas olarak kimyasal ekstraksiyon yöntemleriyle proteini giderilmiş iki sığır kemiği ikamesi, in vivo ve in vitro olarak çok farklı osteokondüktif ve resorptif özellikler gösterebilmektedir(77,80,82). Bu fark,

büyük olasılıkla, yüzey özelliklerinde üretimle ilgili değişiklikleri yansıtmaktadır. 1.000°C'yi aşan sıcaklıklar, apatit kristallerinin büyüdüğü ve kristaller arası boşlukların büyük ölçüde ortadan kalktığı doğal hidroksi apatitlerin sinterlenmesine neden olur. Bu, kemik ikamesinin mikro pürüzlülüğünü ve gözenekliliğini azaltır ve kristalinitesini arttırmaktadır(83).

Deproteinize sığır kemik minerallerinin gerçekten emilebilir olup olmadığı konusunda tartışmalar devam etmektedir(84). İn vitro olarak osteoklast progenitör hücrelerinin Deproteinize sığır kemik mineralleri yüzeylerinde çoğalabildiği ve daha sonra osteoklast benzeri hücreler olarak rezorbsiyon çukurları ürettiği gösterilmiştir. Bununla birlikte, doğal sığır kemiği ile karşılaştırıldığında, DBBM'nin daha az ve daha küçük osteoklastları vardır ve emilim çukurları daha az belirgin olarak gözlemlenmiştir(82). Deneysel in vivo çalışmalar ayrıca Deproteinize sığır kemik mineralleri yüzeylerinde tartrata dirençli asit fosfataz (TRAP) için pozitif boyanmış çok çekirdekli hücreler göstermiştir(52,85). Bu, bu hücrelerin osteoklast benzeri özelliklere sahip olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, aynı çalışmalar histomorfometrik olarak 1 yıla kadar gözlem periyotları boyunca deproteinize sığır kemik mineralleri hacminde herhangi bir azalma göstermemektedir(52). Sinüs ogmentasyonundan sonra yapılan insan biyopsileri, sığırdan türetilmiş kemik ikamelerinin partiküllerinin ameliyat sonrası 10 yıla kadar hala bulunabileceğini doğrulamaktadır(84).

2.2.3.4. Alloplastik Greft Materyalleri

Alloplastik kemik materyallerinin en önemli avantajı, tamamen sentetik yapıları nedeniyle hastalık bulaşma riski taşımayan olmalarıdır. Alloplastların son 40 yılda artan bilimsel ve klinik ilgiyi kazanmasının diğer ana nedeni, belirli bir klinik endikasyon için her bir malzeme karakteristiğinin ayrı ayrı tasarlanmasının mümkün olmasıdır. Günümüzde malzemelerin kimyasal bileşimi moleküler düzeyde kontrol edilebilmektedir. Örneğin makro gözeneklerin boyutu ve birbirine bağlılığı vasküler iç büyüme için optimize edilebilmekte; kristal ve amorf malzeme arasındaki faz dağılımı değiştirilebilmekte; ve blokların ve granüllerin morfolojisi uyarlanabilmektedir.

Ancak ideal alloplastik kemik ikamesinin tüm özellikleri tanımlanmamıştır. Örneğin, proteinlerin ve diğer makromoleküllerin serumdan ilk adsorpsiyonunun, osteojenik hücrelerin ve onların öncüllerinin bağlanması için çok önemli olduğuna inanılmaktadır. Bu, diğer kemik ikame malzemeleri için de geçerli olmaktadır. Bununla

birlikte, bu malzeme-doku etkileşiminden sorumlu olan yüzey özelliklerine ilişkin bilgiler sınırlıdır(86). Ayrıca, teknik sınırlamalar şimdiye kadar, istenen malzeme özelliklerinin üretilmesini engellemiştir. Bu nedenle, doğal kemik mineralini simüle eden bir yüzey pürüzlülüğüne sahip makro gözenekli bir malzeme hazırlamak şimdiye kadar mümkün olmamıştır(39,87,88).

Bugün piyasada bulunan malzemeler; kalsiyum fosfatlar, biyoaktif camlar ve polimerler olarak üç gruba ayrılmaktadır. Bunlardan kalsiyum fosfatlar ve trikalsiyum fosfat (TCP), kemiğin inorganik fazına benzer bileşimleri nedeniyle daha sık olarak kullanılmaktadır(89). Doğal kemik mineraline yakın bir kimyasal bileşime sahip olmanın bir materyali kemik ikamesi olarak uygun hale getirmek için yeterli olduğu yanlış varsayımı nedeniyle eksikliklerin çoğu başarısız sonuçlar ortaya çıkardığı gözlemlenmiştir. Mikro gözeneklilik, kristallik, kristal boyutu ve yüzey pürüzlülüğü gibi farklı malzeme özelliklerinin öneminin daha iyi anlaşılması, aynı kimyasal bileşimlere ve makromorfolojilere sahip malzemelerin neden in vivo biyolojik olarak bu kadar farklı performans gösterdiğini açıklamaya yardımcı olmuştur.

Bununla birlikte genel olarak, hidroksi apatit osteokondüktif ve emilemez olarak kabul edilirken, TCP osteokondüktif özellikler gösterir ancak hızla emilmektedir. Korunan kemik defektlerinde, TCP bazlı kemik ikame malzemeleri, hidroksi apatit bazlı malzemelerden daha hızlı kemik iyileşmesi göstermektedir(63). Bunun açıklaması, bozunma işlemi sırasında TCP materyalinden kalsiyum ve fosfat iyonlarının salınmasının kemik rejenerasyonu amacıyla “hammadde” olarak kullanılmasıdır. Ek olarak, TCP'nin emilmesi, sürünen ikame süreci boyunca iyileşen kemik için yer açması olarak açıklanmaktadır. Ancak, lateral kret ogmentasyonları gibi daha zorlu defekt morfolojilerinde, TCP'nin rezorpsiyon hızı yeni kemik oluşumuna izin vermeyecek kadar yüksek olarak gözlemlenmiştir. TCP malzemesinin yer açma kapasitesi, yeni oluşturulan kemik artırılmış hacmi stabilize etmeden önce kaybolmaktadır(90).

Bu nedenle, hidroksi apatit ve TCP kombinasyonları (bifazik kalsiyum fosfatlar) hem hidroksi apatitin defekti koruma özelliklerinden hem de TCP'nin osteojenik, emilebilir özelliklerinden yararlanmak için geliştirilmiştir. Deneysel çalışmalarda hidroksi apatit-TCP oranını değiştirerek materyallerin ikame oranı ve biyoaktivitesi araştırılmıştır(36,52). Gelecekteki perspektifler, bireysel klinik endikasyonlara uyacak

şekilde iki ila üç bifazik kalsiyum fosfat seçimi geliştirmek için bu bulguların uygulanmasını içermektedir.

Kalsiyum fosfatların genel olarak osteokondüktif olduğu düşünülse de doğal süngerimsi kemik yüzeyinin osteoiletkenliğini elde etmek için optimal yüzey özelliklerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte alloplastik materayaller insan veya hayvan kaynaklı materyal implante etmekte tereddüt eden klinisyenler ve hastalar için değerli bir alternatif olmuştur.

Alloplastik materyallerin bir başka türü olan biyoaktif camlar, ilk olarak 1970'lerin başında tanıtılan silika bazlı malzemelerdir. Biyocamlar; yüzey reaktif silika, kalsiyum ve fosfat gruplarının karakteristik özelliklerinin bir sonucu olarak kemik ile kaynaşmaktadır. Silikanın biyoaktivitede kritik bir rol oynadığına inanılmaktadır. Biyoaktif camlar çok biyouyumlu malzemelerdir. Sinüs yükseltme gibi YKR prosedürlerinde kullanımlarını destekleyen bazı deneysel veriler bulunmaktadır. Bununla birlikte, şu anda mevcut olan biyocam ürünlerinde doğal sınırlamalar vardır. Granüler ve gözeneksiz yapıları nedeniyle, son zamanlarda ilk makro gözenekli cam seramik sunulmuş olmasına rağmen, güvenilir bir şekilde defekt koruma materyalleri olarak hizmet edememektedirler(91).

Silika ve hidroksi apatit bazlı alloplastik kemik greftlerinin kompozitleri de mevcuttur. Bu tür bir malzeme, bir silika jel matrisine gömülü sinterlenmemiş, nanokristalin hidroksi apatitten oluşmaktadır. Bu materyal tipi deproteinize sığır kemik mineralleri gibi birbirine bağlı gözeneklere sahip yüksek gözenekliliği nedeniyle proteinleri almaya yatkındır(92).

2.3. Bariyer Membranlar

Rekonstrüktif cerrahide, dokuların iyileşmesi için anatomik bir bölgeyi fiziksel olarak kapatma ve doku rejenerasyonunu bir tür mekanik bariyerle yönlendirme ilkesi, 1950'lerin ortalarından beri kullanılmaktadır(93,94). kemik rejenerasyonunda bariyer membranlar temel olarak yumuşak bağ dokusunun kemik defektlerine girmesini önlemek için kullanılır. Prensip, bariyer membran defekti çevreleyen kemik yüzeyi ile doğrudan temas halinde yerleştirilmelidir. Mukoperiosteal flep daha sonra yeniden konumlandırılmalı ve dikilimeli, bu da yalnızca komşu kemikten hücrelerin göç edebileceği bir alan oluşturmaktadır(95).

Bariyer membranların kullanımı, yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) ve yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) uygulanan alveol cerrahisi prosedürlerinde periodontal kemik defektleri ve periimplant defektlerinin rejenerasyonunda bir standart haline gelmiştir(96). Literatürde ve uygulamada, YDR ve YKR terimleri sıklıkla karıştırılmakta ve eş anlamlı olarak kullanılmaktadır. YDR, sement, periodontal ligament ve alveolar kemik dahil olmak üzere destekleyici periodontal dokuların rejenerasyonunu tanımlamaktadır. YKR, yalnızca kemik rejenerasyonunu ifade etmektedir(97).

2.3.1. Bariyer Membranların Temel Özellikleri

Günümüzde klinisyenler YKR ve YDR prosedürleri için çok çeşitli membran malzemelerine erişebilmektedir. Klinik uygulamada en uygun materyali seçmek için, farklı endikasyonlarda kullanılan membran materyallerinin temel özelliklerini anlamak gerekmektedir. Bu temel özellikler, biyouyumluluk, hücre oklüzyonu, doku entegrasyonu, boşluk oluşturabilme, klinik kullanım sırasında kolaylık gibi faktörlerdir(95,98).

2.3.1.1. Biyouyumluluk

Biyoyumluluk, vücuda yerleştirilebilir herhangi bir tıbbi malzemenin işlevi için temel bir gerekliliktir. Terim, bir malzemenin klinik uygulama sırasında ve sonrasında işlev görme yeteneğinin uygun bir konak yanıtı oluşturması olarak tanımlanmaktadır. Biyouyumlu malzemeler hasta için herhangi bir risk oluşturmamalıdır. Bariyer membranların biyouyumluluğu, sitotoksosite, histo-uyumluluk, genotoksosite, mutajenite ve mikrobiyal etkiler gibi birçok farklı parametre ile karakterize edilir. Bu nedenle, belirli bir malzemenin biyolojik davranışını tek bir test yöntemiyle karakterize etmek imkansızdır(95).

Aksine, özelliklerin yapılandırılmış bir yaklaşımla bir dizi in vitro ve in vivo testler kullanılarak araştırılması gerekmektedir(99). Prensip olarak, yeni ve/veya prototip malzemeler belirli bir test sırasına tabi tutulmalıdır. Bu test yöntemleri in vitro çalışmalardan hayvan testine ve klinik öncesi testten insanlarda klinik teste kadar uzanmaktadır(100).

Bariyer membranlarla çalışan klinisyenler, inert materyallerin (fizyolojik bir ortamda bozunmayanlar) genellikle bozunabilir materyallere göre daha az karmaşık bir

güvenlik durumu sunduğu gerçeğinin farkında olmalıdırlar. Bozunabilir materyaller, yıkım ürünlerini çevreleyen konak dokuya salıvermektedirler bu durum lokal ve sistemik advers reaksiyonlara neden olabilmektedir. Bu nedenle, rezorbe olma sürecinin nihai ürünleri biouyumlu olmalıdır ve ilk malzeme tasarımında ara bozulma ürünleri dikkate alınmalı ve kontrol edilmelidir(101).

2.3.1.2. Hücre Oklüzyonu

Bariyer membranların hücre oklüzyonu özelliğinin birincil amacı, bağ dokusu hücrelerini kemik rejenerasyonunun gerçekleşmesinin amaçlandığı bölgeden uzaklaştırmaktır. Bu kavram, 1980'lerde, yumuşak bağ dokusunun ve dentogingival epitelin uzaklaştırılmasının, etkilenen dişlerin kök yüzeyleri çevresinde periodontal rejenerasyonu mümkün kılmayı amaçlanması olarak periodontolojide kapsamlı bir şekilde test edilmiştir.

Öte yandan, bariyer membran boyunca besin transferinin başarılı bir rejenerasyon süreci için önemli olabileceği gerçeğiyle, toplam hücre oklüzyonu teorisine bir şekilde meydan okunmuştur(102). Diğer çalışmalar, makro gözenekli membranların YDR prosedürleri için daha öngörülebilir sonuçlarının olduğu ve bariyer membranlardan daha komplike olmayan klinik tedavi için daha elverişli olduğu bulunmuştur(103,104). Ayrıca, her ikisi de ana kemikten kaynaklanan yeterli vasküler besleme ve osteojenik hücre kaynağı gibi diğer lokal faktörler eşit veya daha büyük öneme sahiptir(105).

2.3.1.3. Doku entegrasyonu

Bariyer membranın biyouyumluluk özellikleri, materyalin doku entegrasyonu üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Bir bariyer membranın yüzey topografyası, gözenekliliği ve kimyasal özellikleri öncelikle iyileşme sırasında dokunun içe büyümesinin veya yüzey bağlanmasının olup olmadığını belirlemektedir. Yumuşak dokuya implante edilen gözeneksiz, dokusuz bir biyomateryal, malzemeye doğrudan bağlanmayan fibröz bir bağ dokusu kapsülü oluşmasına ve iyileşme döneminde yaranın mekanik desteğinin azalmasına neden olmaktadır(106). İdeal doku entegrasyon kapasitelerine sahip membranlar, iyi bir mekanik stabilite sağlamaktadır(107).

2.3.1.4. Alan Yapımı ve Alan Bakımı

YKR ve YDR prosedürleri için tasarlanmış bir zarın yer açma kabiliyeti, in vivo koşullar altında çökmeye direnme ve dolayısıyla iyileşme periyodu sırasında yeterli hacim ve boşluk oluşturma ve sürdürme kapasitesi olarak tanımlanmaktadır. Bir bariyer membranının çökmeye direnme yeteneğini belirleyen önemli bir faktör, kullanılan malzemenin sertliğidir(104).

Biyo-çözünür bariyer membranlarını etkileyen önemli bir problem, bozunabilir malzemelerin mekanik mukavemetini ve dolayısıyla membranın yerleştirilmesinden kısa bir süre sonra yer açma yeteneklerini kaybetmesidir(108). Çözünebilir membranların takviyeli emilmeyen bariyer membranlara kıyasla bu bakımdan elverişsiz mekanik özelliklerinden dolayı, kullanılan membranın çökmesini önlemek için destekleyici materyallerin (örn., otolog blok greftler, kemik dolgu maddeleri) kullanılması önerilmektedir(109). Günümüzde titanyumla güçlendirilmiş politetrafloroetilen (PTFE) membranlar bile YKR prosedürlerinde daha iyi sonuçlar elde etmek için greft materyalleri ile desteklenmektedir(110).

2.3.1.5. Ameliyat Sırasında Klinik Kullanım

Ameliyat sırasında, bariyer membranlar genellikle defekt alanını kaplayacak şekilde kırılmakta, kesilmekte ve şekillendirilmektedir. Bu prosedürün uygulanabilmesi için membranların kullanımı kolay olmalıdır. Emilmeyen zarlar, sertlikleri ve hidrofobik özellikleri nedeniyle, vidalar ve pimler kullanılarak yerinde tutulmaktadır(111,112). Emilebilen zarlar, özellikle kollajen membranlar, daha esnektir ve hidrofiliklikleri nedeniyle çevredeki kemiğe yapışabilmektedirler(113). Emilmeyen bariyer membranlar, membranın erken dönemde açığa çıkması ve enfeksiyon nedeniyle çıkarılması gereken durumlarda veya ikinci aşama cerrahi ile implant yerleştirme durumunda genellikle bir sorun oluşturmamaktadır. Emilmeyen membranlar yapısal bütünlüklerini korurlar ve bu da klinisyenin membranı tamamen çıkarmasını sağlamaktadır. Öte yandan, emilebilir membranlar, enfeksiyon oluşması gibi durumlarda çıkarılması gerektirdiğinde bir sorun oluşturabilmektedir. Parçalanma ve ardından malzeme bütünlüğünün kaybı nedeniyle, bariyer membranın tüm kalıntılarının çıkarılması bazen klinisyen için oldukça sorunlu olabilmektedir.

2.3.1.6. Komplikasyonlara Duyarlılık

Bariyer membranlar, materyallerinin doğasına bağlı olarak iyileşme sürecinde farklı tipte komplikasyonlar sergileyebilmektedir. Özellikle emilemeyen membranlar, erken membran maruziyeti açısından önemli bir riske sahiptir(114) . Bu, bir yara enfeksiyonuna ve daha sonra kemik rejenerasyonu açısından kötü bir sonuca neden olabilmektedir(115). Biyo-çözünür membranlar ise özellikle çapraz bağlı değilse, yönetimi daha kolaydır ve erken membran maruziyeti riski bakımından daha düşük bir riske sahiptir. Sentetik polimerik malzemeler kullanıldığında bariyer membranın emilim sürecinde bazen inflamatuvar ve yabancı cisim reaksiyonları ile karşılaşmaktadır(116) .

2.3.2. Rezorbe Olmayan Membranlar

2.3.2.1. Genişletilmiş Politetrafloroetilen (e-PTFE) Membran

Genişletilmiş politetrafloroetilen (ePTFE) ilk olarak 1969'da geliştirilmiştir(117). ePTFE çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır, deneysel hayvan çalışmaları, kardiyovasküler, ürojinekolojik tıp ve rekonstrüktif cerrahi alanları bu membran türünün kullanıldığı alanlara örnektir(118–120).

Kimyada PTFE karbon ve flor arasında son derece güçlü bir bağla oluşmuş biyolojik olarak inert, bozunmaz sentetik bir floropolimerdir. Vücutta karbon-flor bağlarını parçalayabilen bilinen bir enzim bulunmamaktadır. Malzemenin ilave sertliği, yani ePTFE florlu etilen propilen ile takviye edilerek elde edilmektedir(29).

Diş hekimliğinde, ePTFE membranları 1980'lerde ve 1990'ların başında YDR ve YKR prosedürleri için bir standart haline gelmiştir(111,112,120,121). ePTFE membranın yanı sıra, titanyumla güçlendirilmiş ePTFE olarak emilmeyen bariyerler de mevcuttur(122). Klasik olarak rezorbe olmayan bariyerlerle YKR ilkesini açıklayan makale, Dahlin ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmadır. Çalışmada 30 yetişkin sıçanın mandibulalarında mukoperiosteal flepleri kaldırılmış ve bilateral kemik defektleri oluşturulmuştur. Çenenin bir tarafında defekt bir ePTFE membranı ile kaplanırken, diğer taraftaki defekt kontrol görevi görmüştür. İyileşme sonrası histolojik analiz, test (ePTFE) tarafında, hayvanların yarısında 3 hafta sonra ve tamamında 6 hafta sonra tam iyileşme olduğunu göstermiştir. 22 haftalık bir gözlem döneminden sonra bile kontrol taraflarında çok az iyileşme belirtisi gözlemlenmiştir(123).

Sıçanlarda osteogenez için yüksek potansiyel nedeniyle hayvanlardaki bu olumlu sonuçlar klinik duruma zorunlu olarak aktarılamayacağından, aynı grup tarafından benzer bir çalışma primatlar kullanılarak yapılmıştır. Tam dişsiz alanlarda iki taraflı kemik defektleri oluşturulmuştur. Bir taraftaki kusurlar, ePTFE bariyer membranları ile kapatılmış, diğer taraftaki kusurlar kontrol görevi görmüştür. 3 aylık bir iyileşme döneminden sonra tüm test bölgelerinde tam kemik iyileşmesi görülmüştür. Kontrol bölgelerinde kemik iyileşmesi tamamlanmamış ve çeşitli derecelerde bağ dokusu büyümesi gözlemlenmiştir(111).

Yumuşak doku alanı ePTFE membranları tarafından bölümlere ayrılmakta ve bu dokuların entegrasyonu gerçekleşmektedir. Bariyer membranın içindeki ve dışındaki yumuşak dokular belirgin şekilde farklı olarak görülmektedir. Membranın dışındaki doku, keratinize edici bir epitel ile kaplanmış yumuşak bağ dokusundan oluşmaktadır. Lamina propriadaki kolajen liflerinin yoğunluğu ve çapı bariyer membrana doğru artmakta, böylece kaba kolajen lif demetleri ePTFE zarının yüzeyi ile temas halinde olmaktadır(124).

Membranla kapanan iç bölmede, hassas kollajen lifleri olan gevşek bağ dokusu baskındır. Bu doku iyi vaskülarize olmuş ve damar sayısı kemik yüzeyine doğru artmıştır. Makrofajlar, lenfositler ve granülositler genel olarak zarın iç yüzeyi ile temas halinde bile oldukça nadirdir. Bu bulgular yine ePTFE zarının mükemmel doku uyumluluğunun bir göstergesidir.

ePTFE membranların tasarımı, yaklaşık 50 µm çapa ulaşan boşluklu yapısı ile çevrede belirli bir gözeneklilik sağlamaktadır. Bu gözenek boyutu, hücreler ve küçük damarlar tarafından istilaya izin verir ve pratik olarak tüm gözenekli kısımlar canlı hücrelerle doldurulduğundan üçüncü bir intramembranöz bölmeyi tanımlamak uygundur. Bu hücrelerin çoğu, ince kolajen lifleri ve küçük kılcal damarlarla ilişkili fibroblastlardan oluşmaktadır.

Titanyum takviyeli ePTFE membranların uygulanması sonrasında ise osteopromotive performansı açısından, bariyer membranın altında, yüzeysel bir bağ dokusu tabakası ile birlikte büyük miktarlarda yeni oluşmuş kemik gözlemlenmektedir. Yapılan çalışmalar sayesinde ePTFE membranlarının titanyum ile güçlendirilmesinin, iyileşme süresi boyunca rejenerasyonun orijinal formunun üstün korunmasını sağladığı sonucuna varmıştır(122).

Klinik ve deneysel çalışmalar, YDR ve YKR prosedürlerinde emilmeyen membran kullanımının mükemmel sonuçlarını gösterse de(111,112,120,121,124,125), yara iyileşme komplikasyonları ve dehisens gibi tablolar da görülmektedir(114,125,126). Bir dizi çalışma, ePTFE membranların ekspoz olmasının ardından yara enfeksiyonu sekelleri ve ardından kemik rejenerasyonunda kötü sonuçlar bildirmiştir(115,127,128). Bariyer membranların ekspoz olması ve ardından bakteriyel kolonizasyon, membranların erken alınmasını bile gerektirebilmektedir. Emilmeyen membranlarla ilgili bir diğer önemli dezavantaj, biyoinert membranı çıkarmak için ikinci bir ameliyata ihtiyaç duyulmasıdır. Bu işlem flep genişletme gereksinimi, belirli bir miktarda krestal kemik rezorpsiyonu, hasta için artan maliyet ve rejenere kemiğin bir kısmını kaybetme riski gibi sonuçlar açığa çıkarmaktadır(129).

2.3.2.2. Yüksek Yoğunluklu Politetrafloroetilen (d-PTFE) Membran

Rezorbe olmayan yüksek yoğunluklu bir politetrafloroetilen (d-PTFE) membran, son zamanlarda, membran ağız boşluğuna maruz kaldığında bile iyi bir kemik rejenerasyon sürecini garanti ediyor olması özelliği ile kemik rejenreasyonu prosedürlerinde kullanılmak üzere özel olarak tasarlanmıştır. Yoğun politetrafloroetilen (d-PTFE), kemik greftlerinin yerleştirilmesinden sonra birincil kapatmaya ulaşma gerekliliğini ortadan kaldıran ve böylece hasta morbiditesini azaltan bir tür rezorbe olmayan bariyerdir.

Yüksek yoğunluklu PTFE membranların en önemli avantajı, yumuşak doku kaplama gerektirmemesidir. Ancak bu membranların yaklaşık 30 gün sonra çıkarılması gerekmektedir.(76) Bu membran türünün; Düşük maliyetli bir polimer olmaması, üretim aşamaları sırasında seri üretim yapılamaması sebebiyle üretiminin zor bir hale gelmesi ve yüksek basınç altında şekil değiştirebilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır(130).

2.3.3. Rezorbe Olabilen Membranlar

Klinisyenler ve araştırmacılar, rezorbe olabilen membranlarının kullanımının rezorbe olmayan membranlara kıyasla daha avantajlı olduğunu savunmaktadır. Rezorbe olabilen membranın ekspoz olma riskinin az olması, membranı çıkarmak için ikinci bir ameliyata ihtiyaç duyulmaması, basitleştirilmiş cerrahi prosedür, daha geniş bir cerrahi teknik yelpazesi, daha düşük maliyet ve azaltılmış hasta morbiditesi gibi etmenler literatürde bildirilmiştir(97). Halihazırda, emilebilir membranların üretiminde esas

olarak iki malzeme kullanılmaktadır bunlar; sentetik alifatik polyesterler ayrıca değişik hayvansal kaynaklardan sağlanan kolajendir(131). Her iki madde de biyomalzeme olarak kabul edilse de, her birinin kendine özgü özellikleri ve biyolojik etkileri bulunmaktadır(55,103).

2.3.3.1. Polimerik membranlar

Bariyer membran malzemeleri olarak kullanılan sentetik polyesterler, poliglikolitler (PGA), polilaktitler (PLA'lar) veya bunların kopolimerleridir. Kullanılan diğer alifatik polyesterler, polidioksanonlar(132) ve trimetilen karbonatlardır. Bu sentetik malzemeler, kontrollü koşullar altında yeniden üretilebilmekte neredeyse sınırsız miktarlarda sunulabilmektedir. Bu durum, kolajen gibi doğal olarak oluşan malzemelere göre açık avantajlarıdır. Diğer bir avantaj, PGA, PLA ve bunların kopolimerlerinin krebs döngüsü yoluyla tamamen biyolojik olarak karbondioksit ve suya bozunma yeteneğinin olmasıdır(133).

Polimerik membranların biyolojik olarak parçalanma kabiliyetlerini etkileyen pek çok faktör bulunmaktadır. Yapıları ve kimyasal bileşimleri, moleküler ağırlıkları, şekilleri, işleme koşulları, sterilizasyon işlemleri, fizikokimyasal faktörler ve hidroliz mekanizması gibi etkenlerin polimerlerin bozunmasını etkilediği bilinmektedir(134,135). Polimerik membranların ortopedik ve maksillofasiyal cerrahi ve implant diş hekimliğinde kullanımı zaman zaman inflamatuvar ve yabancı cisim reaksiyonları ile ilişkilendirilmiştir. Bazı durumlarda, cerrahi debridman ve materyalin çıkarılması bile gerekli olabilmektedir(116,136). PLA membranlarının yerleştirilmesine yönelik erken doku reaksiyonları yapılan çeşitli bilimsel çalışmalar ile de analiz edilmiştir(137).

Bariyer membranların ağız boşluğuna erken dönemde ekspoze olmasını inceleyen Simion ve arkadaşları(138), ekspoze olduklarında PLA/PGA membranlarının neredeyse anında rezorbe olmaya başladığını ve 3 ila 4 hafta sonra emilim sürecinin sona erdiğini bulmuştur. Yazarlar, bu karakteristik davranışı, kendiliğinden iyileşmeye ve dokunun kapanmasına yol açabileceğinden, emilmeyen membranlara göre bir avantaj olarak görmüşlerdir. Öte yandan, çok hızlı bir bozunma süreci, bariyer işlevi süresini ve yer oluşturma yeteneğini azaltabilmektedir. Bu, tüm YKR prosedürünün sonucunu olumsuz etkileyebilmektedir.

2.3.3.2. Kollajen membranlar

Ticari olarak elde edilen kolajen membranların birçoğu, periodontal bağ dokusunun baskın bir bileşeni olan tip I kolajenden veya tip I ve tip III kolajenin bir kombinasyonundan geliştirilmiştir. Kollajen kaynakları değişkenlik gösterir, sığır tendonu, sığır dermisi, baldır derisi veya domuz dermisi gibi kaynaklardan kollajen elde edilebilmektedir(96). Literatürde kollajen materyallerin uygulanmasının birçok avantajı bildirilmiştir. Hemostaz, periodontal ligament ve diş eti fibroblastları için kemotaksi(139,140), zayıf immünojenisite(141), kolay manipülasyon, kemik oluşumu üzerinde doğrudan bir etki(142) ve doku kalınlığını artırma yeteneği(143) gibi özellikleri bu materyalin avantajlarındandır. Dolayısıyla, kollajen materyali biyolojik olarak emilebilir bir YDR veya YKR bariyeri için ideal bir seçim gibi görünmektedir.

Öte yandan, kolajen membranlar daha doku dostu olarak kabul edilirken, makrofajların ve polimorfonükleer lökositlerin enzimatik aktiviteleri yoluyla hızlı biyolojik bozunmaları nedeniyle elverişsiz mekanik özelliklere sahip oldukları(144) ve yetersiz bir bariyer işlevi gördükleri de bildirilmiştir(145,146). Ultraviyole radyasyon, glutaraldehit, difenilfosforil-azid ve heksametilen diizosiyanat gibi çeşitli çapraz bağlama teknolojileri, kolajen membranların bariyer işlevini uzatmak için kullanılmıştır(147,148). Bu kimyasal çapraz bağlama tekniklerinden en yaygın kullanılanı glutaraldehittir. Ancak bu tekniğin, işlem sırasında sitotoksik kalıntı bıraktığı bildirilmiştir(149).

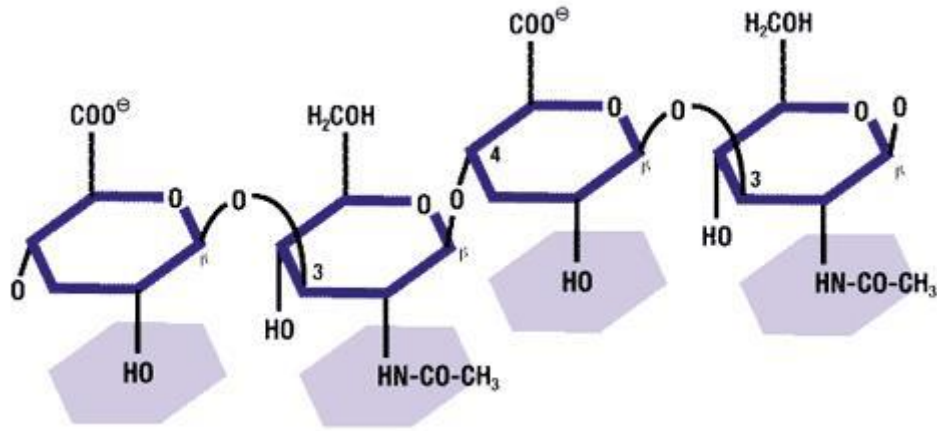
Von Arx ve ark.(90) tarafından tavşan kalvaryumunda yapılan deneysel bir çalışmada, üç farklı çapraz bağlı prototip kollajen membran, klinik kullanımda çapraz bağlı olmayan bir kollajen ve iki sentetik polimer membran ile karşılaştırılmıştır. Test edilen iki sentetik membran için fibröz kapsülleme gözlemlenirken, GLTC membranı 2 haftada marjinal bir inflamatuvar hücre infiltratı ve 12 haftada membranın çatlaklarında çok çekirdekli yabancı cisim dev hücreleri ortaya çıkarmıştır. Buna karşılık, çapraz bağlanmamış kollajen membran ve üç kollajen prototip membran yabancı cisim reaksiyonu belirtileri göstermemiştir. Bununla birlikte, tüm kollajen membran tiplerinin çevresindeki yumuşak doku, inflamatuvar hücreler tarafından istila edilmiştir. Bu hücre infiltrasyonu, kollajen membranların hücresel degradasyonu için gerekli bir olay olarak yorumlanmıştır. Klinik olarak, ağız boşluğuna maruz kaldıktan sonra çapraz bağlı

olmayan kollajen membranların hızlı bozulmasının kemik rejenerasyonu prosedürlerinde bir avantaj olduğu bildirilmiştir(113).

Hem kolajen materyaller hem de sentetik polyesterler, (güçlendirilmiş) emilmeyen bariyer membranlara kıyasla elverişsiz mekanik özelliklerinden dolayı bariyer çökmesini önlemek için destekleyici materyallere (otolog kemik greftleri veya kemik ikame materyalleri) ihtiyaç duymaktadır. Greft ve ikame materyalleri biyolojik olarak emilebilir membranlarla kombinasyon halinde kullanıldığında, YKR prosedürlerinin sonuçları genellikle olumlu ve hatta emilmeyen ePTFE bariyerleri ile elde edilen sonuçlarla kıyaslanabilir nitelikte gözlemlenmiştir(150).

2.4. Hyalüronik Asit

Kimyasal yapısı ($C_{14}H_{21}NO_{11}$) dır. Polisakkarit olup, tekrarlayan D-glukuronik asit ile D-N-asetik-glukozamin dimerik ünitelerden oluşan sulfur içermeyen bir glikozaminoglikandır. Her iki molekül β -1,4 ve β -1,3 glikozid bağları ile birbirine bağlıdır. Bunlar hyalüronik asit (HA) molekülü boyunca tekrarlamaktadır(151).



Şekil 1: Hyalüronik asitin moleküler yapısı

HA' nın polimerik oluşumu bu kimyasal yapılanma sayesinde. Polimerin boyutsal büyüklüğü 5,000 – 20,000,000 Dalton aralığında olabilmektedir. HA' nın boyutları insanda anatomik bölgeye göre değişiklik gösterebilmektedir. Örnek olarak eklemeler arası sinoviyal sıvıda 3–4 milyon Dalton iken göbek kordunda 3,140,000 Daltondur.

1934'te Karl Meyer ve John Palmer, JBC'de, sığır gözlerinin vitreusundan izole edilen son derece yüksek moleküler ağırlığa sahip olağandışı bir polisakkarit hakkında

yazmışlardır. Bundan ilk bahseden kişi olarak, yeni maddeye, "hyaloid" (camsı cam benzeri) ve "üronik asit"ten türetilen hyaluronik asit (HA, modern adı "hyaluronan") adını vermişlerdir. Meyer ve Palmer'ın genellikle hyaluronik asidi keşfettikleri düşünülürken, 1918'de Levene ve Lopez-Suarez'in vitreus gövdesinden ve kordon kanından 'mukoitin-sülfürik asit' olarak adlandırdıkları yeni bir polisakkarit izole ettiklerini belirtmiştir. Bu polisakkarit, glukozamin, glukuronik asit ve az miktarda sülfat iyonlarından oluşmaktaydı. Bu maddenin aslında sülfatlanmış glikozaminoglikanların bir karışımı ile birlikte ekstrakte edilen hyaluronik asit olduğu artık açıktır(152).

Hyaluronanın keşfi sırasında polisakkaritler zaten oldukça iyi bilinmekteydi. Halihazırda glikozaminoglikanlar olarak bilinen bir dizi sözde mukopolisakkarit zaten keşfedilmiştir. Mukopolisakkaritler, viskozite özellikleri verdikleri mukustan izole edilmiştir. Bu özellikler glikozaminoglikanın suya bağlanma yeteneği ile ilgilidir.

Artan uygulamaları nedeniyle hyaluronana olan talep, keşfedildiği andan bugüne kadar artmıştır. Tıp dalları genişledikçe, bağ dokusunun pasif yapısal matrisinden bu makromolekülün birçok önemli fizyolojik süreçteki birincil rolünün anlaşılmasına kadar HA'nın rolü yeniden ele alınmaktadır. Bu süreçler, hücre iletişimi, göç, farklılaşma, hücre dışı matriste süreç düzenlemesi ve hücre yapısı metabolizmasının aktivasyonunu içermektedir.

Şu anda, HA'nın bağ dokusunun aktif olmayan bir makromolekül değil, metabolik olarak oldukça aktif bir biyopolimer olduğu bilinmektedir. Eklemlerdeki yarı ömrü 1-30 hafta, epidermis ve dermada 1-2 güne kadar ve kan dolaşımında sadece 2-5 dakikadır. Başka bir deyişle, 70 kg ağırlığındaki yetişkin bir erkeğin vücudunda bir günde yaklaşık 5 g kuru HA sentezlenebilir ve parçalanabilir, bu da vücuttaki tüm HA miktarının üçte biri kadardır(153).

2.4.1. Hyalüronik Asitin Kimyasal Özellikleri

HA'nın kimyasal yapısı incelendiğinde D-glukuronik asit ve DN-asetil glukozamin olarak disaakarit yapılı iki şeker molekülünün glikozidik bağlarla birbirine bağlandığı görülmüştür. Yapılan moleküler incelemeler sonucunda bükülmüş bir şerit yapısına benzeyen ve sarmal yapı olarak isimlendirilen yapının polar olmayan hidrojen

atomlarının eksenel bir yüz ve polar olan yan zincirlerin ise ekvatorial bir yüzden oluştuğu düşünülmüştür(154).

Yapısal nitelikler genel olarak bu rastgele sarmal yapıya bağlıdır. HA'nın konstanttrasyon oranı çok düşük olduğunda dolanmış halde bulunan zincirlerin de gösterdiği viskozite de hafiftir. Bununla birlikte çözeltilerdeki HA konsantrasyon oranı yükseldikçe kaymaya bağlı olarak sarmal yapının zincirinin büyümesi sebebi ile viskozite oranı da artmaktadır(155). Viskoelastisite HA'nın konsantrasyonu ve molekül ağırlığı gibi molekül etkileşimlerine bağlıdır. Örneğin, molekül ağırlığı yüksek olan (örneğin %1 'lik) bir HA çözeltisi jöle gibi davranabilir, fakat kesme gerilimi uygulandığında kolaylıkla bükülmektedir(156).

Yukarıda da anlatıldığı gibi gözlemlenen viskoelastisite çözelti içindeki HA sarmallarının rastgele bir şekilde dolanması ve birleşmesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum eşsiz viskozite özelliğinin de sebebidir. Bu moleküler kendinden olan birleşmenin demetler ve anti-paralel çift sarmallar sayesinde oluştuğu ileri sürülmüştür. Oluşan HA ağlarının sertleşmesinin ise bitişik sakkaritler arasında bulunan hidrojen bağının, karboksil gruplarının arasındaki karşılıklı elektrostatik itme kuvveti sayesinde sağlandığı yapılan çalışmalar ile ileri sürülmektedir. Sonuç olarak ortaya koyulmuştur ki çözelti içindeki HA konsantrasyonu ve molekül ağırlığı gibi etmenlerin etkileşimi HA'nın viskoelastisitesi üzerinde oldukça etkili olmaktadır(157).

2.4.2. Hyalüronik Asitin Biyolojik Özellikleri

Hacimsel olarak dokuların büyük bir bölümünü farklı makro moleküllerin oluşturduğu "hücre dışı matriks" (extracellular matrix, ECM) kaplamaktadır. ECM fazlaca çeşitli protein ve polisakkaritlerden meydana gelmektedir. Bu moleküler yapılar salgılandıkları hücre yüzeylerinde ağ formunda katman oluşturmaktadırlar. ECM'nin en fazla bulunduğu doku bağ dokudur. Bulunduları dokulardaki fiziksel özellikler sıklıkla matriks tarafından belirlenmektedir. Matrikste bulunan makromoleküller değişik tip ve miktarlarda olabilmektedir. Matriksteki bu düzenleme çeşitliliği birbirinden farklı yapıların oluşturulmasını sağlamaktadır." Örneğin, matriks kemik ve dişte sert bir yapı halini almışken, korneada ışığı geçirecek bir yapıda, tendonlarda ise ip benzeri ve oldukça kuvvetlidir." ECM makromolekülleri matriksteki hücrelerden salgılanmaktadır. Bir çok bağ dokuda, matriks makromolekülleri en fazla fibroblastlar tarafından salgılanır. Kemik ve kıkırdak gibi özelleşmiş bağ doku tiplerinde, bu makromoleküller

yine fibroblastlar tarafından salgılanır. ECM yara iyileşmesi sürecinde de sinyal moleküllerini ortaya çıkarır ve haberci molekülleri serbest burakır. HA da bu bağlamda birçok yapısal görev görür ve bunu diğer biyolojik bileşenlere ve hücrelere spesifik etkileşimler ile bağlanarak gerçekleştirir(158).

RHAMM, TSG6, GHAP, CD44, ve LYVE-1 gibi reseptörler, HA ile bağlanma kapasitesi olan hücresel bileşenlerin örneklerindendir. Hücresel transdüksiyon gerçekleşmesinde bu ve bunlar gibi reseptörler ve spesifik moleküller önemli rol oynamaktadır(157).

HA hücresel yapıda birçok anlamda rol oynamaktadır. Kendine özgü yüksek molekül ağırlığı sayesinde hücresek bütünlüğü desteklemektedir. Enflamatuvar yanıtın başlamasında, yara iyileşmesi sırasında ve devamında skar oluşumunun engellenmesinde etkin görev almaktadır. Bunun yanında HA gen ekspresyonunu uyarmaktadır. Bu görevini ise endotelial hücrelerde, makrofajlarda, eozinofillerde ve bazı epitel hücrelerinde gerçekleştirir(159).

HA hücre infiltrasyonu ve hücre iyileşmesinde hücresel inflamatuvar yanıtın erken aşamalarından itibaren bulunur. Proinflamatuvar sitokin TNF-a, IL-1b ve IL-8'nin artışı CD44 aracılığı ile indüklenir HA'nın inflamatuvar yanıtın baskılanmasını engellenmesine katkıda bulunduğu da görülmektedir. Bu durumda antoksidatif özellikleri ve serbest radikalleri temizlemesi etkili olmaktadır(158).

Son zamanlarda HA için yeni reseptörler tanımlanmıştır. Örneğin RHAMM, öncelikle fibroblastlar olmak üzere hücre göçünde rol almaktadır ve büyüme faktörlerine karşı hücresel yanıtları düzenler. Bu görevleri sebebi ile hücre yüzeyinde ayrıca yanı sıra çekirdekte rastlanmıştır. Glial hiyalüronat bağlayıcı protein (GHAP) HA' ya bağlanır. GHAP doğal olarak oluşmuş myelinli optik sinir aksonlarını çevreleyerek ince bir ağ oluşturan bir tür bozunma ürünüdür.

Hücre içi yapışma molekülü-1 (ICAM-1) de HA'ya bağlanır ancak yapılan bir çalışmada endositozu indüklediği görülmüştür ve aktif bir hücre yüzey reseptörü olarak tanımlasa da bu durum bir reseptör olarak ICAM-A'nın görevini karmaşıktırmaktadır. ICAM-1 HA'nın lenfosit ve kan plazmasından uzaklaştırılmasını sağlar ve bu hücresel döngünün büyük kısmını kapsar. ICAM-1 endotel ve lenfositlerden eksprese edilir(158,159).

2.4.3. Biyomedikal Uygulamalarda HA'nın Yeri

Hyaluronan şu anda biyokimya, moleküler biyofizik, biyoorganik ve radyokimya ve polimer bileşiklerinin kimyasında bir çalışma nesnesidir. HA'nın tıbbi çalışmaları; döllenme, embriyogenez, bağışıklık tepkisinin gelişimi, yaraların iyileşmesi, onkolojik ve bulaşıcı hastalıklar, yaşlanma süreçleri ve estetik tıbbın problemlerindeki rolünü içermektedir.

Hyaluronanın çok çeşitli pratik tıbbi uygulamaları, anti-inflamatuar, dezenfektan ve yara iyileştirici etkilerine dayanmaktadır. HA epitelyal rejenerasyonu destekler; granülasyon dokusu, yapışıklıklar ve yara izlerinin oluşumunu engeller; şişme eğilimini azaltır; kan dolaşımını normalleştirir(160).

Hyaluronan, hiyalüronidaz enziminin kantitatif tayini için bir substrat olarak uygulamalı biyokimya ve enzimolojide yaygın olarak kullanılmaktadır. HA ve hyaluronat liyaz arasındaki olası ilişki ve bazı streptokokların patojenitesi hakkındaki bilimsel tartışmalar, görüldüğü gibi, kalıcı olarak yürütülecektir. Halihazırda, sulu çözeltiler ve biyolojik sıvılarda HA'nın ikincil ve üçüncül yapılarına ve dinamik konformasyonuna çok dikkat edilmektedir; proteinler, özellikle reseptör CD44 ve diğer hiyaladerinler ile HA etkileşimi; ve farklı hiyalüronidaz ile HA biyokatalitik bölünmesi; istenen özelliklere sahip rekombinant suşların ve kimera ürünlerinin yaratılmasına doğru ilerlemektedir.

Hem bakteriyel hem de memeli enzimleri ile polisakkarit biyosentezi üzerine teorik araştırma, başlangıçta reaksiyon mekanizmalarının anlaşılmasına odaklanmıştır, ancak son zamanlarda dikkat, rekombinant suşların ve HA üretebilen kimera organizmalarının yaratılması dahil olmak üzere uygulama problemlerinin çözümüne kaydırılmıştır.

Son birkaç yılda tıp ve farmakolojinin çok umut verici bir alanı büyük ilgi görmüştür: ilaçların belirli organlara veya dokulara hedefli teslimatı. Nanoteknolojinin gelişimi bu çalışmaları yeni bir düzeye taşımıştır çünkü 'nanokonteynerler' biyolojik olarak aktif bileşikleri vücuttaki belirli hücrelere ulaştırmayı hedefleme konusunda büyük potansiyele sahiptir. 100-300 nm çapında lipozomlar, polimerik ve lipid partiküller veya aynı boyutta nanokapsüller tipik olarak na nokaplar olarak kullanılır. Hyaluronan, makromoleküler bir kap oluşturmada alternatif bir yaklaşım olarak kullanılabilir. HA makromolekülleri, biyopolimer taşıyıcıya bağlı biyolojik olarak aktif

bileşikleri hedef almak için çeşitli hücrelerin sitoplazmik membranları üzerindeki reseptörlere bağlanabilmektedir.

Bir grup bilim adamı, süper yüksek basınç ve kesme deformasyonunun karşılıklı etkisini içeren polisakkaritlerin katı hal modifikasyonu teknolojisini kullanarak, hyaluronik asit içeren bir dizi benzersiz ürün üretmiştir. Yeni ürünler ilaçsız makromoleküler olarak kabul edilebilir. Bu araştırma alanları, modifiye edilmiş hyaluronana dayalı çok çeşitli yeni ürünleri mümkün kılmıştır ve tıbbın çeşitli alanlarında kullanılabilir(161).

Çeşitli uygulama alanlarında kullanılmak üzere HA türevleri üretiminin alternatif yolları türetilmiştir. Bunun için polisakkarit yapının spesifik grupları üzerinde kimyasal tepkimeler ve birleşme reaksiyonu ile hyaluronik asitin modifikasyonları geliştirilebilir. Bunlar; sülfatasyon, amidasyon ve esterleştirme gibi işlemlerdir. Bu konuda bir örneklendirme olarak HA hidratlı jeller polianyonik polisakkarit nükleofilik reaksiyonları ile elde edilebilir. HA'nın kimyasal modifikasyonları için moleküler yapısındaki 3 fonksiyonel grupta odaklanmaktadır. Glukuronik asit, karboksilik asit, primer ve sekonder hidroksil gurupları ve N –asetil gurup. En sık olarak karboksilik asit grup üzerinde modifikasyonu yapılmaktadır(161).

Esterleştirme reaksiyonları ile elde edilen hyaluronik asit türevlerinden biri de Hyafftır. Hyaff oluşturmak için hyalüronik asit zinciri boyunca tekrar eden glukronik asidin serbest karboksil grubunu farklı alkol türleriyle eşterleştirilmektedir. Bu kimyasal modifikasyon polimerin stabilitesini iyileştirmekte, hem polianyonik polisakkaridin hidrofilik negatif yüklü karboksil gruplarını azaltarak hem de hidrofobik bileşenlerini arttırarak etki etmektedir(88,162).

HYAFF® teknolojisi sayesinde tamamen biyouyumlu ve biyolojik olarak parçalanabilen 3 boyutlu iskeleler oluşturulmuştur. Bunlar, mikrokırık ve/veya perforasyon prosedürleri veya otolog kemik iliği aspiratı yoluyla mobilizasyonlarından sonra subkondral bölmede bulunan farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin yerinde bağlanması ve farklılaşması için uygundur. Bu, dokuların yönlendirilmiş rejenerasyonu konseptine göredir.

HYAFF11® polimerleri suda çözünmezler ve bu nedenle HYAFF® liflerinin dokunmamış yapı iskeleleri, süngerler, granüller ve membranlar dahil olmak üzere

birçok farklı 3D konfigürasyonda üretilebilirler. HYAFF®'ın benzersizliği, doğal HA ile karşılaştırıldığında yerinde uzun süreli kalış süresinde ve implant bölgesinde kendiliğinden bozunma üzerine HYAFF®'ın ana yan ürününün ana HA molekülü olması gerçeğinde bulunur. Bu, HYAFF® biyomalzemelerine benzersiz bir biyoyumluluk profili sağlar ve implant bölgesinde HA ile zenginleştirilmiş bir ortama yol açar. Bu tür HA açısından zengin bir ortamın embriyonik olayların tekrarlanmasını destekleyebileceğine ve dolayısıyla yetişkin organizmada doku onarımını kolaylaştırabileceğine inanılmaktadır. Dokumasız bir konfigürasyondaki HYAFF® liflerinin, kondrojenik veya osteojenik yol boyunca in vitro mezenkimal kök hücreler (MSC) farklılaşması için optimal bir iskele olduğu kanıtlanmıştır(163).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızın etik kurul onayı İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp ve Araştırma Enstitüsü Deney Hayvanları Etik Kurul’undan alınmıştır (29.01.2021 tarih ve 2021/02 sayılı karar).” “Bu çalışmanın deneysel kısmı İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü’nde, histolojik incelemesi ise İstanbul Üniversitesi Onkoloji Enstitüsü Klinik Onkoloji Anabilim Dalı’nda yapılmıştır.

3.1. Çalışma Dizaynı

Çalışmamızda örneklem sayısı saptamak için G*Power (v3.1.7) programı vasıtası ile güç analizi yapılmıştır. Çalışmanın gücü $1-\beta$ (β = II. tip hata olasılığı) olarak ifade edilir ve genel olarak araştırmaların %80 güce sahip olmaları gerekmektedir. C.Yılmaz’ın yaptığı doktora çalışması baz alınarak, yeni kemik oluşumu ölçümlerinde gruplar arasındaki klinik farklılık için en az ortalama 6,33 birim fark hesaplanmış olup, yapılan değerlendirmede etki büyüklüğü $d=2,191$ olarak bulunmuş $\alpha=0.05$ düzeyinde %80 güç eldesi amacıyla her bir grupta toplamda en az 5’er örneklem boyutu hesaplanmıştır. Çalışmamızın sonunda olabilecek kayıp vakaları öngörülerek örneklem boyutu 6 olarak saptanmıştır. Çalışmamız için toplam 36 adet Sprague Dawley soyu, 8-12 haftalık ve 250 ± 20 gr ağırlığa sahip erkek sıçan seçilmiştir. Sıçanlar İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü’nden temin edilmiştir ve çalışma süresi boyunca burada cerrahi işlemleri ve takipleri yapılmıştır. Sıçanların kafa kubbesinde 2 şer adet defekt hazırlanmıştır. Hazırlanan defektlere deney ve kontrol gruplarındaki biyomateryaller uygulanmıştır. 18 deney hayvanı 3. haftada; 18 deney hayvanı ise 6. haftada kurban edilerek histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler yapılmıştır.

3.2. Anestezi

Operasyon öncesi sıçanlar 12 saat beslenmemiştir. Deney hayvanlarının kiloları operasyon öncesi ölçülerek kilolarına uygun dozlarda anestezi madde verilmiştir. 50 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar® Flakon, Pfizer, Türkiye) ve 5 mg/kg Ksilazine Hidroklorid (Rompun® Flakon, Bayer Türk Kimya Sanayi Ltd.Şti, Türkiye) intraperitoneal yolla uygulanarak anestezi sağlanmıştır. Anestezinin devamı %2-3 izoflora ve %100 oksijen ile sağlanmıştır.



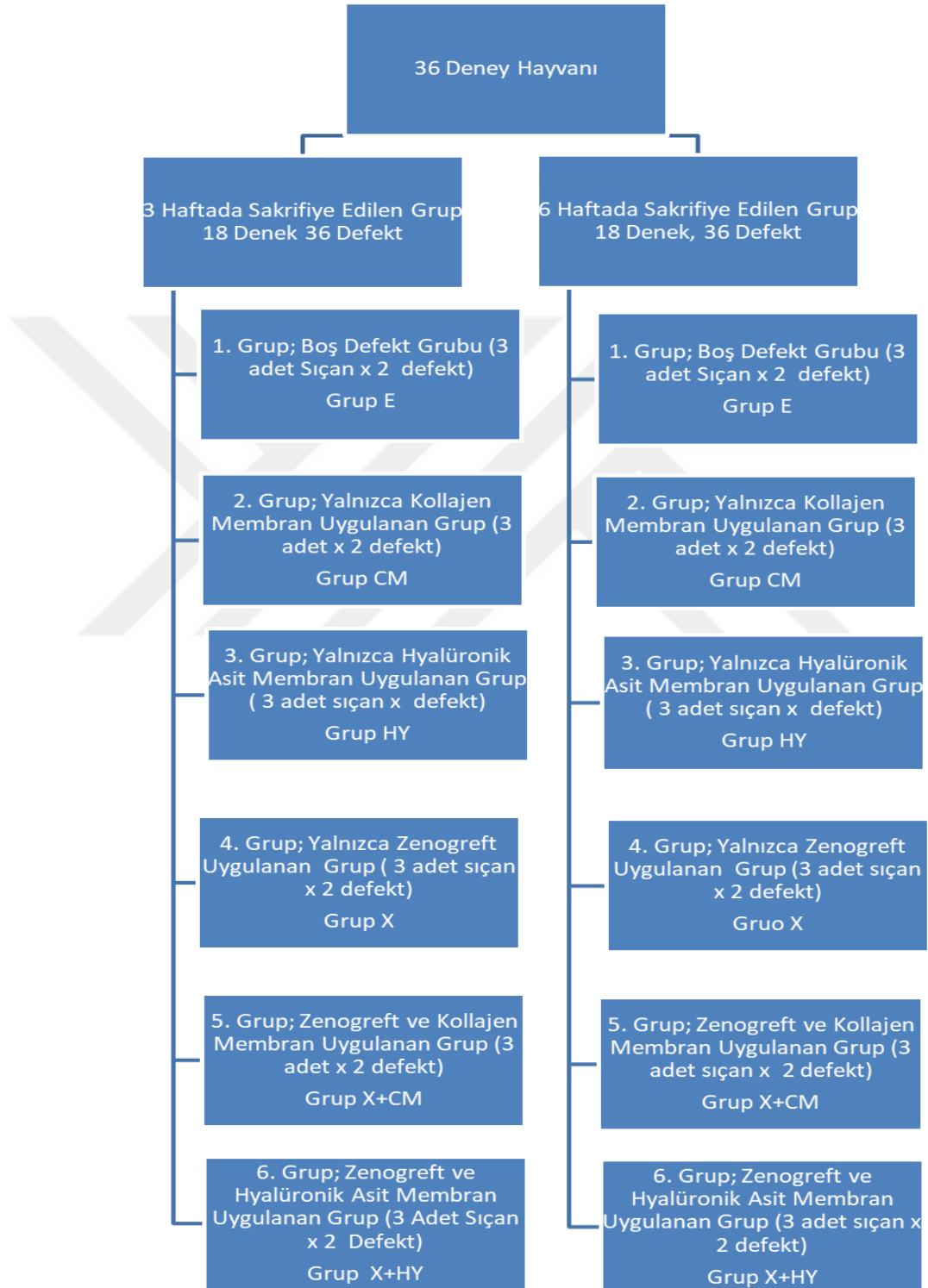
Şekil 2: Cerrahi aşama öncesi ameliyata hazırlanmış sıçan

3.3. Cerrahi Aşama

Sıçanların kafa kubbesindeki tüyler traşlanıp cilt, povidon iyodin solüsyonuyla (Poviseptin, Mertsel 110 Tic. A.Ş., Türkiye) silinerek asepsi sağlandıktan sonra (Şekil 2) kafa kubbesinin üzerinde orta hatta ön-arka (anteroposterior) yönde (nazofrontal bölgeden eksternal oksipital protuberansianın önüne kadar) 2,5cm deri insizyonu yapılmıştır.” “Cilt ve periosteum kaldırılarak kranyal kemik açığa çıkarılmıştır. Tur motoruna bağlı cerrahi anguldruvaya takılan 5mm çaplı trefin (trephine) (Salvin Dental Specialties, Inc., Charlotte, NC, USA) frezle devamlı serum irigasyonu altında, her iki parietal kemikte orta hattın sağ ve solunda duramater zedelenmeden 2 adet tam-kalınlıklı kemik defekti oluşturulmuştur (Şekil 3).” “Ameliyat sahası serum fizyolojik ile yıkandıktan ve gruplara uygun greftlerin defektlere doldurulmasından sonra periost ve kafa derisi 4-0 rezorbe olabilen sütür (Vicryl, Ethicon, Johnson & Johnson, New Jersey, 120 USA) dikilip primer yara kapanması sağlanmıştır. (Andreassen 2004, Gomes 2011). Yara bölgesi dikildikten sonra üzeri, hava geçiren cerrahi yara bandı (Nexcare First Aid Tape, 3M, USA) ile örtülmüştür.

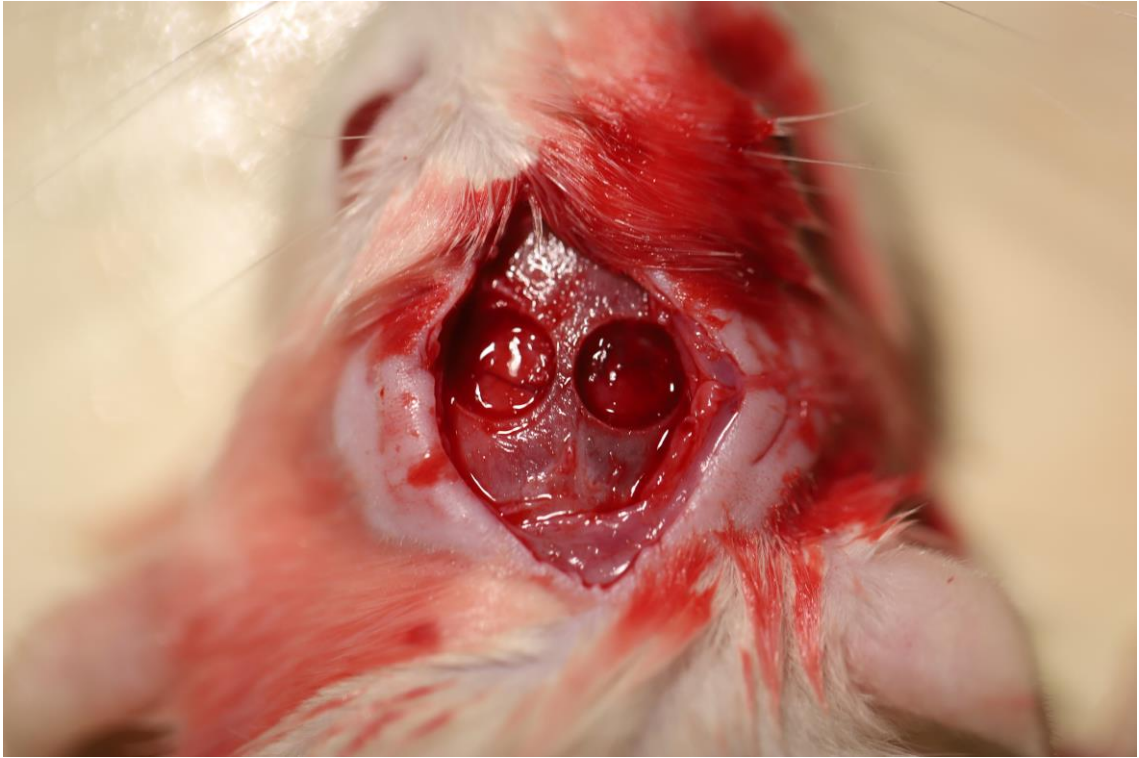


Şekil 3: Sıçan kalvaryumunda trefin frez ile defekt hazırlanması



Şekil 4: Deney grupları

Hayvan denekleri defektler içine yerleştirilen maddelere göre altı gruba ayrılmıştır ve deneklerin her birinin kalvaryumuna iki defekt açılmıştır (Şekil 6). Gruplar arasındaki farklar defektlerin boş bırakılması ve boş bırakılan defektlerin kollajen ya da hyalüronik asit membranlarla örtülmesi ya da sadece zenojen greft konması ya da greft konulan defektin kollajen membran veya hyalüronik asit membranlarla örtülmesi ile sağlanmıştır.



Şekil 6: Deneklerde oluşturulan kafa kubbesi üzerindeki iki defekt örneği

Deney hayvanlarının her birinde 2 defekt hazırlanmasıyla her deney grubunda 6 defekt olacak şekilde 3. haftada 18 ve 6. haftada 18 hayvan olmak üzere toplam 36 hayvan üzerinde 72 defekt hazırlanmıştır.

İn vivo deneye dahil edilecek olan gruplar ve açıklamaları aşağıda belirtilmiştir.

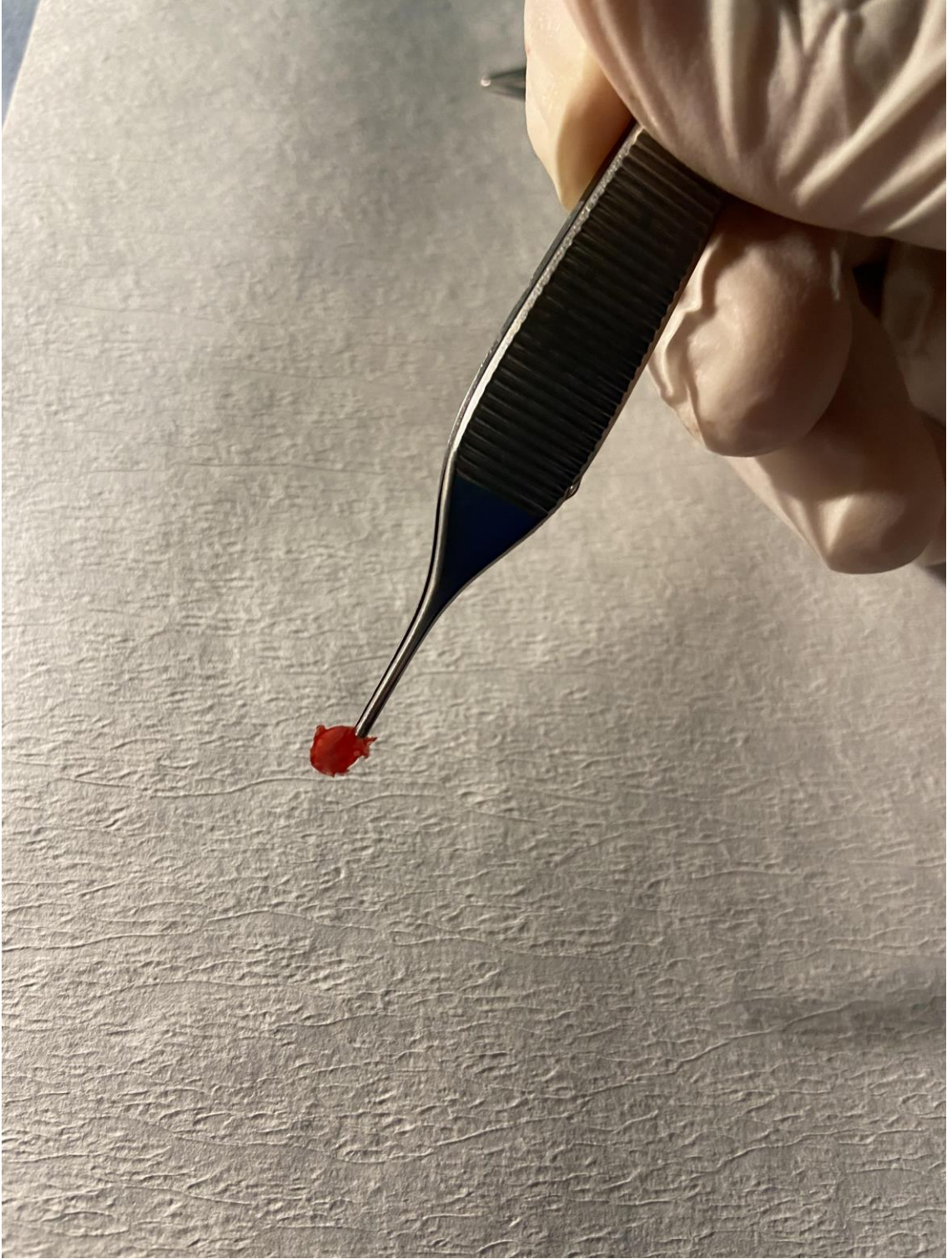
1. Grup; Boş defekt grubu (3 adet sıçan x 2 defekt).
2. Grup ; Boş bırakılan defekte yalnızca kollajen membranın uygulandığı grup (Bio-Gide® (Geistlich Pharma, İsviçre) (3 adet sıçan x 2 defekt).
3. Grup; Boş bırakılan defekte yalnızca hyalüronik asit membranın uygulandığı grup (Hyalonect (Anika Therapeutics Inc, ABD) (3 adet sıçan x 2 defekt).

4. deney grubu:Defekte yalnızca zenojen greft uygulanan grup (Bio-oss® (Geistlich Pharma, İsviçre) (3 adet sıçan x 2 defekt).

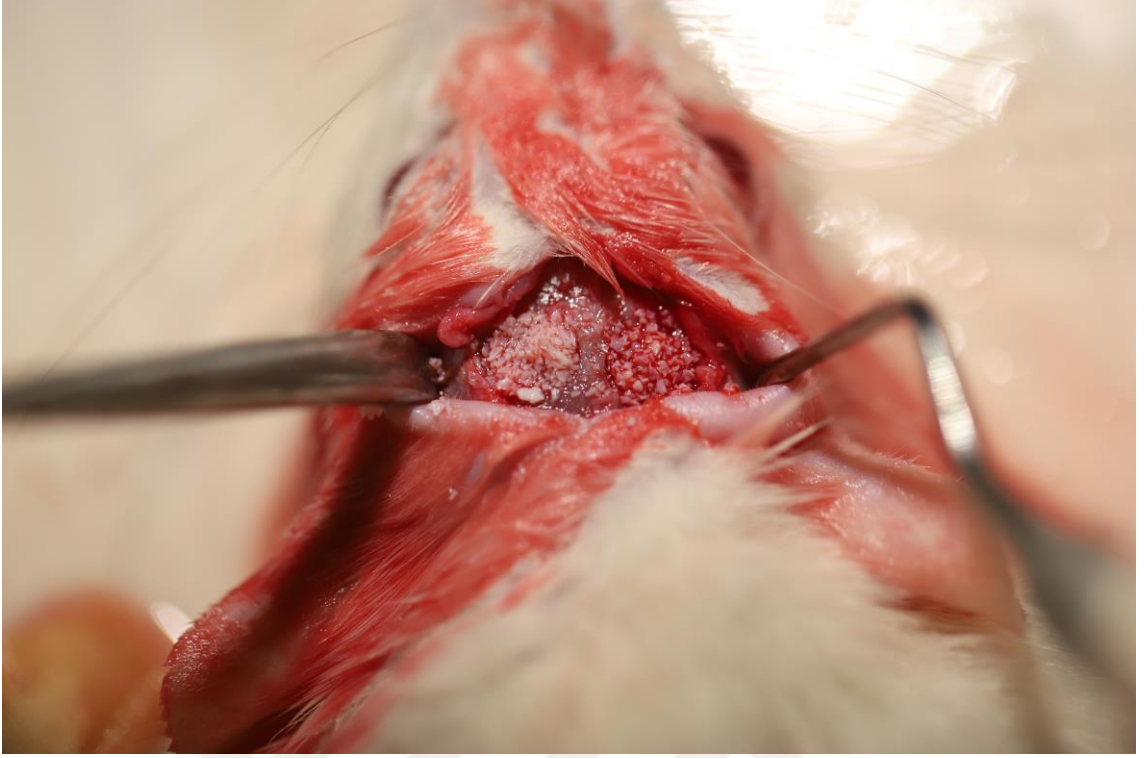
5. Grup: Defekte zenojen greft ve kollajen membran uygulanan grup (3 adet sıçan x 2 defekt).

6. Grup: Defekte zenojen greft ve hyalüronik asit membran uygulanan grup (3 adet sıçan x 2 defekt).

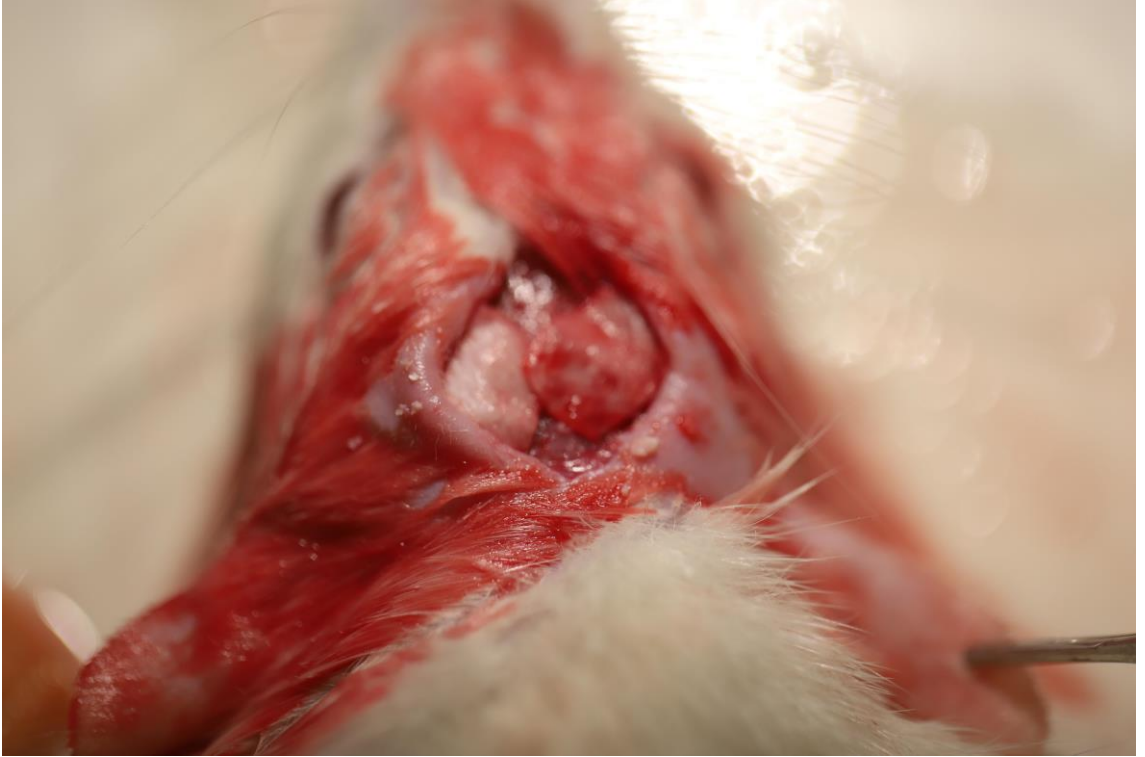




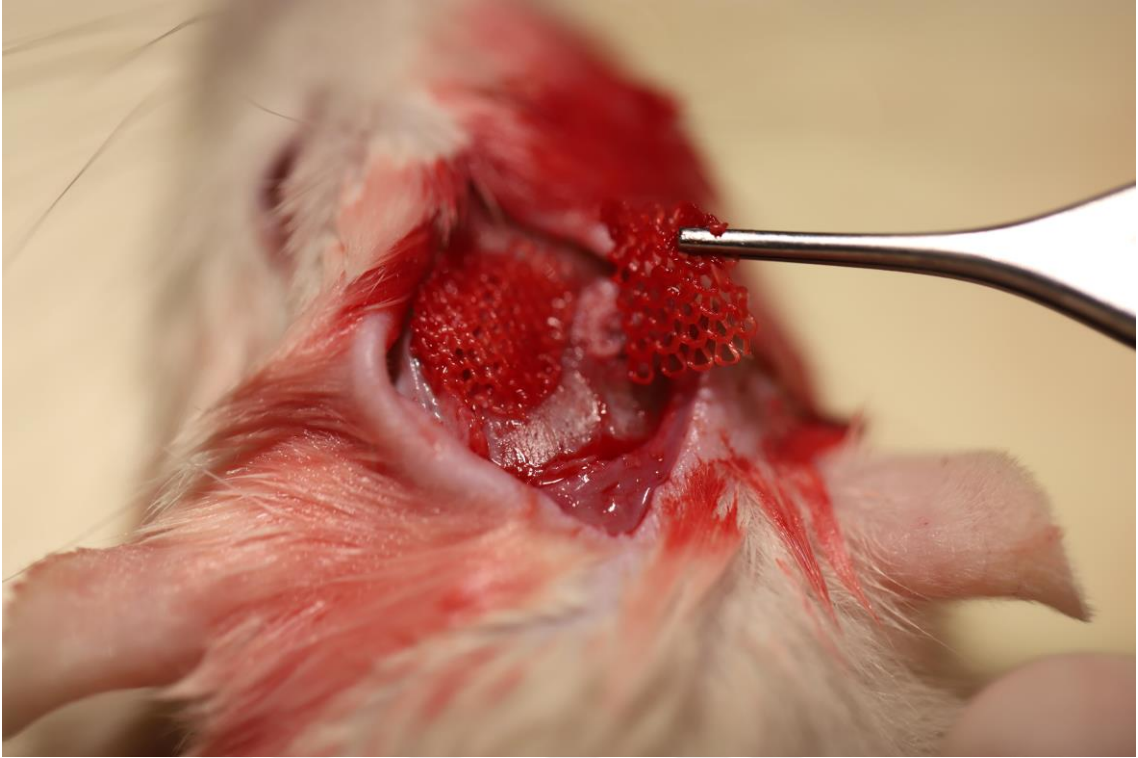
Şekil 7: Trephine frez ile elde edilen kemik örneği



Şekil 8: Yalnızca zenogreft uygulanmış denek



Şekil 9: Zenojen greft ve kollajen membran uygulanmış denek



Şekil 10: Zenojen greft ve hyalunik asit membran uygulanan denek



Şekil 11 : Çalışmada kullanılan hyaluronik asit membran

3.4. Post – operatif Bakım

Cerrahi işlem sonrası kafeslerine alınan sıçanlara enfeksiyona karşı profilaktik olarak postoperatif 3 gün boyunca günde 2 kez intraperitoneal yolla 3mg/kg Gentamisin (Gentamed 20 mg ampul, Koçak Farma, İlaç ve Kimya San. A.Ş. Türkiye) verilmiştir. Postoperatif analjezi için ise postoperatif 3 gün boyunca günde 2 kez intraperitoneal yolla 5mg/kg dozda Tramadol HCl (Tramadolor 100 mg Ampul, Sandoz

İlaç San. ve Tic. A.Ş. İstanbul, Türkiye) verilmiştir. Operasyondan sonraki 1 hafta boyunca günde 2 kez postoperatif analjezi ve ağrı kesici uygulamaları sırasında hayvanların yara bölgeleri kontrol edilerek gerekli durumda yara örtüleri yenilenmiştir.

Çalışmamızda hayvanlar bağıl nem oranı %50-55, 21°C sıcaklıkta 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ortamı, sessizliği, havalandırma ve ısıtma koşulları sağlanacak şekilde otomatize edilmiş odada, deney süreleri boyunca kafesler içinde muhafaza edilmiştir. Tek bireylik kafeslerde post operatif bakım uygulanmıştır. Deney hayvanları standart yem ve çeşme suyu ile ad libitum beslendirilmiştir.

3.5. Sakrifikasyon

Deney hayvanları cerrahi operasyonlardan 3 ve 6 hafta sonra 120 mg/kg sodyum pentotal anestezisi ile sakrifiye edilmiştir. Ötenazi işleminden sonra sıçanların defekti içeren kemik dokuları parçalanmadan bütünüyle diseke edilip çıkarılarak, araştırma laboratuvarında histolojik ve histomorfometrik incelemeleri yapılmıştır.

3.6. Histolojik ve Histomorfometrik Değerlendirme

Histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler tek kör olarak yapılmıştır. Tüm örnekler bir hafta boyunca %10 tamponlu formalin içinde sabitlenmiştir. Sonrasında örnekler %10 Formik asit + %10 Sodyum sitrat solüsyonunda bir ay süreyle dekalsifiye edilmiştir. Parafin bloklar rutin olarak işlenmiş kireçten arındırılmış örneklerden hazırlanarak 4 µm'lik dilimler halinde kesilmiştir. Bu kesitler, bilgisayara bağlı renkli bir video kamera eklenmiş ve ışık mikroskobu (Olympus® BX60, Tokyo, Japan) ile değerlendirilmiştir. Defekt kenarları kamera kullanılarak çekilmiş ve bilgisayar monitöründe görüntülenmiştir. Tüm ölçümler Olympus Image Analysis Sistem 5programı ile yapılmıştır. Bir mikroslopik alandaki hesaplamalar kesitler, x40 büyütme ile yeni kemik oluşumu ve kalan(rezidüel) greftler açısından değerlendirilmiştir.Yeni oluşan kemik tarafından işgal edilmiş ve kalan greft bulunan alan oranları ölçülmüştür ve toplam alan ile sınırlandırılmıştır. Ayrıca enfeksiyon, nekroz ve yabancı cisim reaksiyonu yoksa “-” olarak varsa “+” olarak değerlendirilmiştir.

Histomorfometrik değerlendirme elde edilen dijital fotoğraflar üzerinden yapılmıştır. Bu işlem için ışık mikroskobu (Olympus® BX60, Tokyo, Japan) ile kesitlerin görüntüleri Olympus analysis 5 programıyla dijital görüntüleri alınmıştır. İnceleme sırasında iltihap, nekroz, yabancı cisim, yeni kemik yapımı ve kemik

iyileşmesi kriterleri göz önüne alınmıştır. Kemik ve greft alanını içeren kesitler, kemiğe dikey yönlü olarak hazırlanmış, üzerinden alınan dijital görüntüler histomorfometri amaçlı yazılıma yüklenerek kemikleşme alanları, kalan (rezidüel) greft miktarları sayısal olarak hesaplanmıştır.

İltihap ve fibrozis değerleri 0: yok, +: hafif. ++: orta, +++: ağır olarak derecelendirilmiştir.

3.7. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodlar (ortalama, standart sapma, medyan, frekans, yüzde, minimum, maksimum) kullanılmıştır. Nicel verilerin normal dağılıma uygunlukları Shapiro-Wilk testi ve grafiksel incelemeler ile sınanmıştır. Normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin ikiden fazla grup arası karşılaştırmalarında Kruskal-Wallis test ve Dunn-Bonferroni test kullanılmıştır. Normal dağılım göstermeyen nicel değişkenlerin grup içi karşılaştırmalarında Wilcoxon signed-ranks test kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

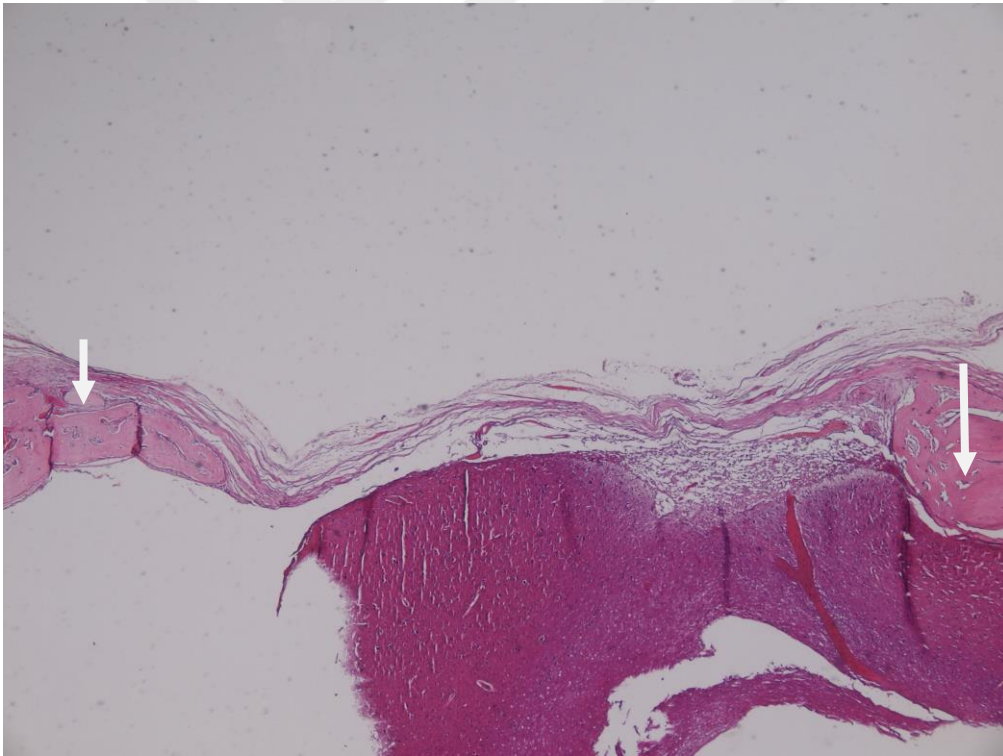
4. BULGULAR

Çalışmamız süresince hiçbir denekte komplikasyona rastlamamış ve kayıp yaşanmamıştır. 72 defektten oluşmakta olan 6 adet çalışma grubunda histolojik ve histomorfometrik değerlendirilmeler yapılmıştır.

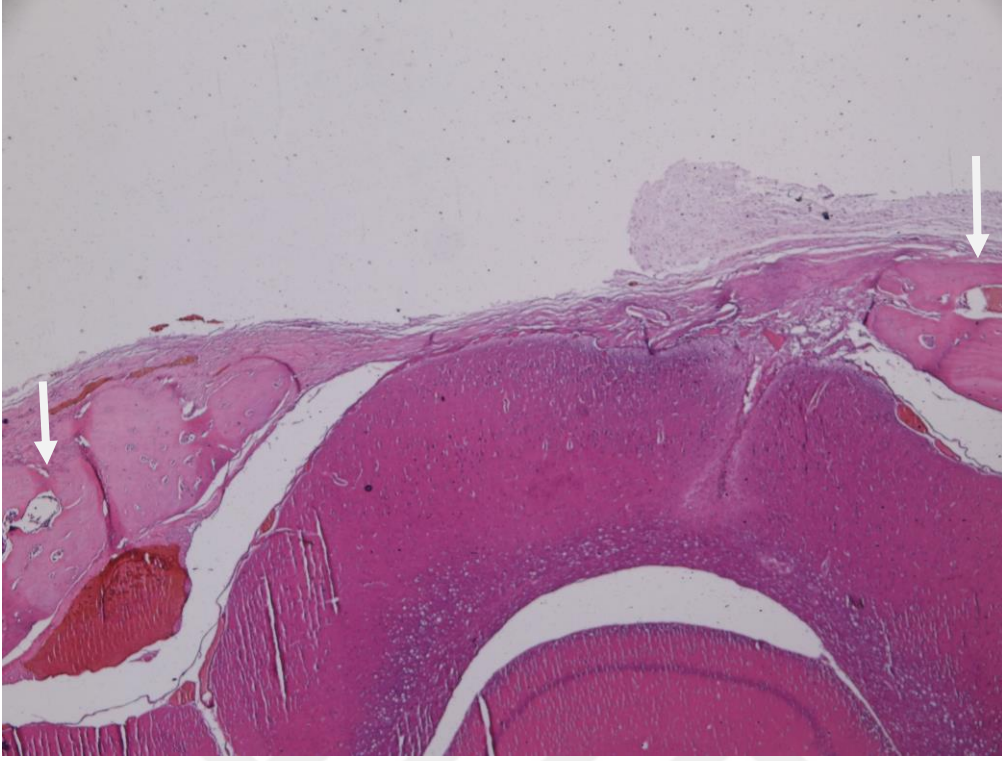
4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. İltihap Skorları, Yabancı Cisim Reaksiyonu ve Nekroz

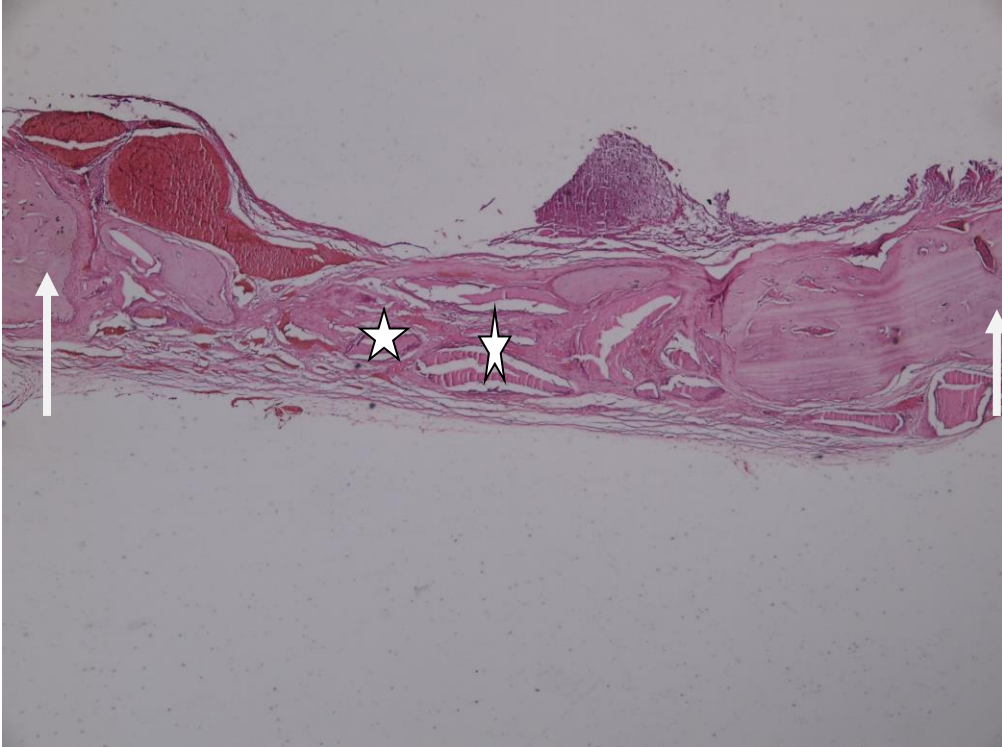
3. hafta ve 6. haftada sarıfiye edilen deneklerde yapılan incelemelerde herhangi bir inflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu ve nekroz gözlemlenmemiştir. Histolojik bulgular (Şekil 12-22)



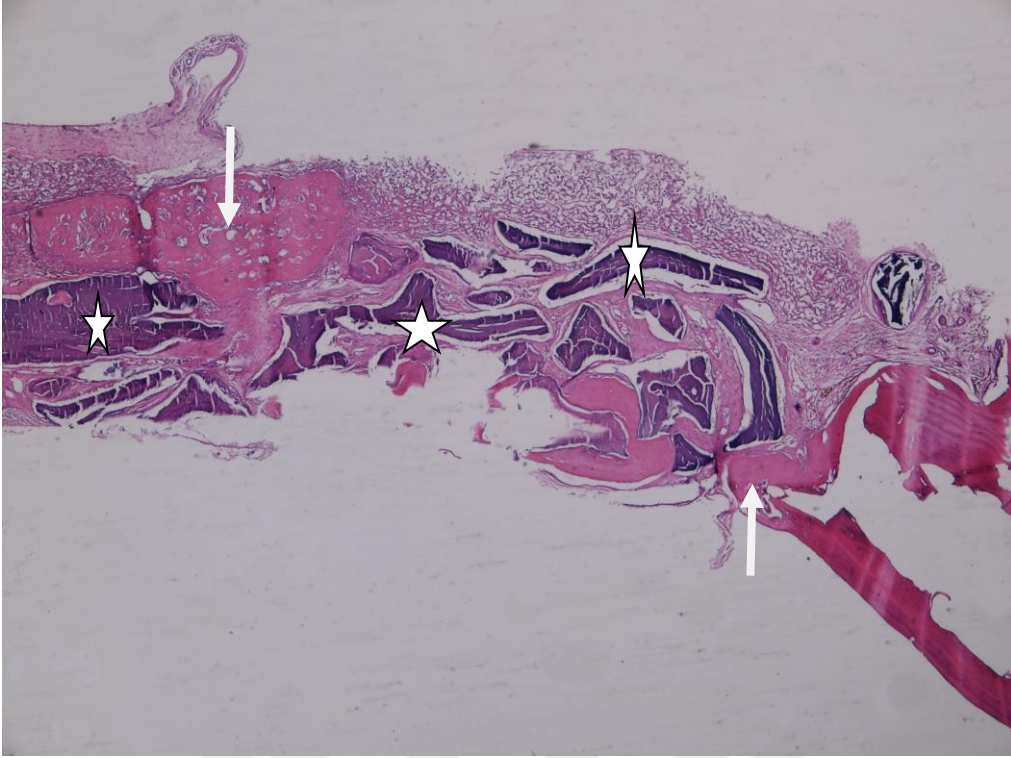
Şekil 12: 3. haftada grup E'de gözlemlenen defekt kenarlarından başlayan yeni kemik oluşumu. Oklar ile yeni kemik alanları gösterilmektedir (H&Ex40)



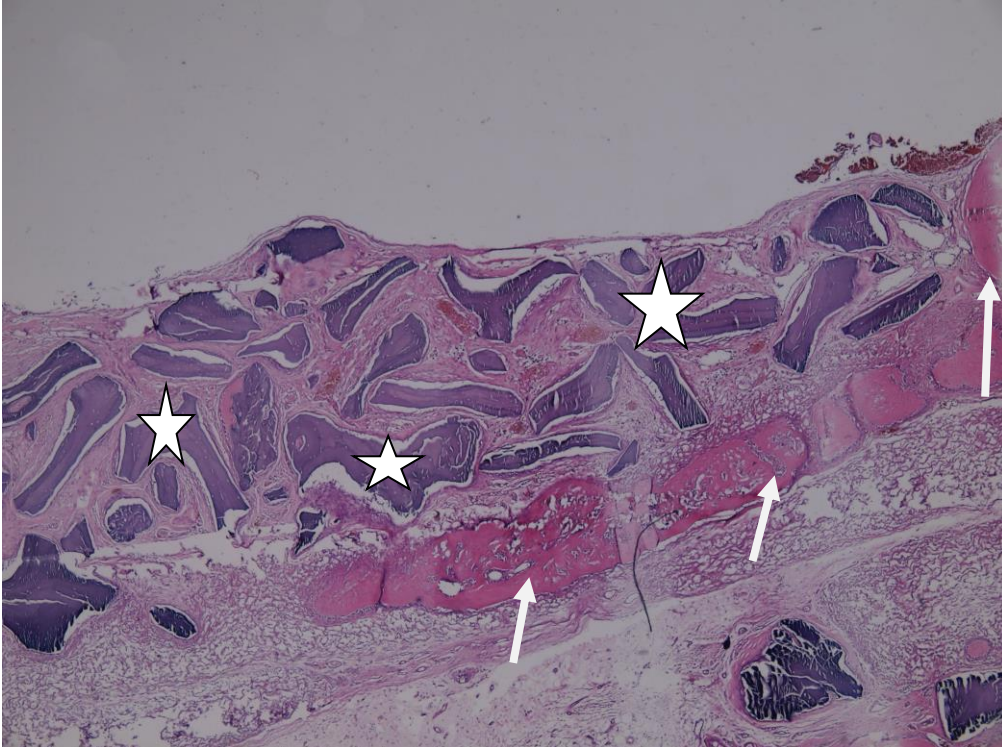
Şekil 13:3. haftada grup HY' de defekt kenarlarından başlayan ve ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları(H&Ex40).



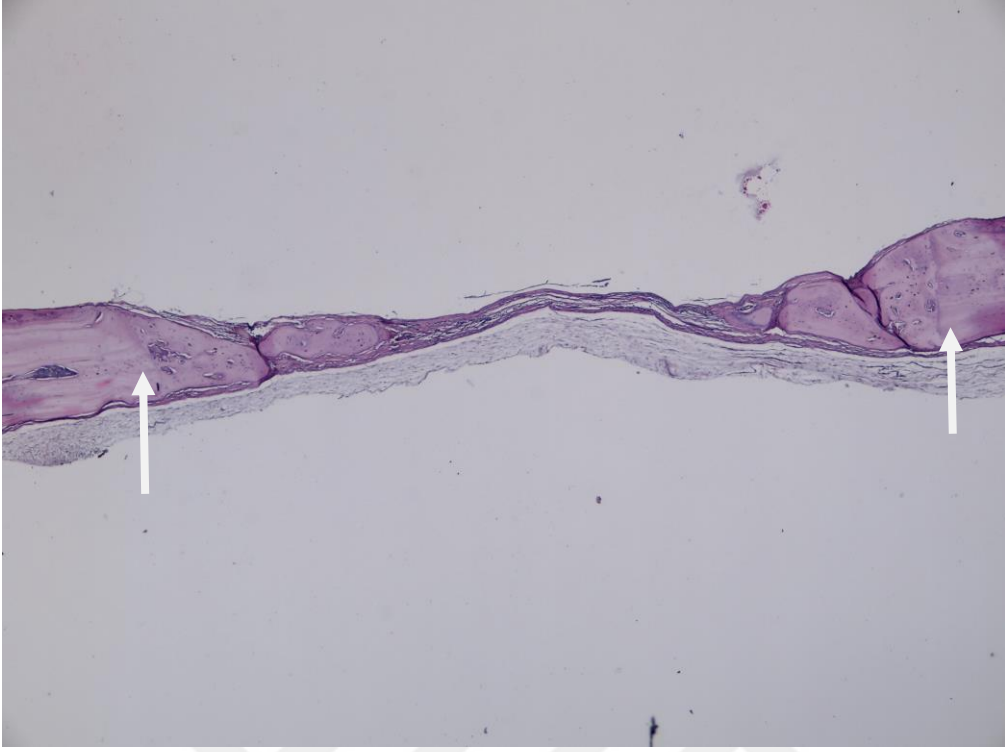
Şekil 14:3. haftada grup X'de defekt kenarlarından başlayan ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları. Rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmiştir (H&Ex40).



Şekil 15:3. haftada grup X+CM de defekt kenarlarından başlayan ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları. Rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmiştir (H&Ex40).



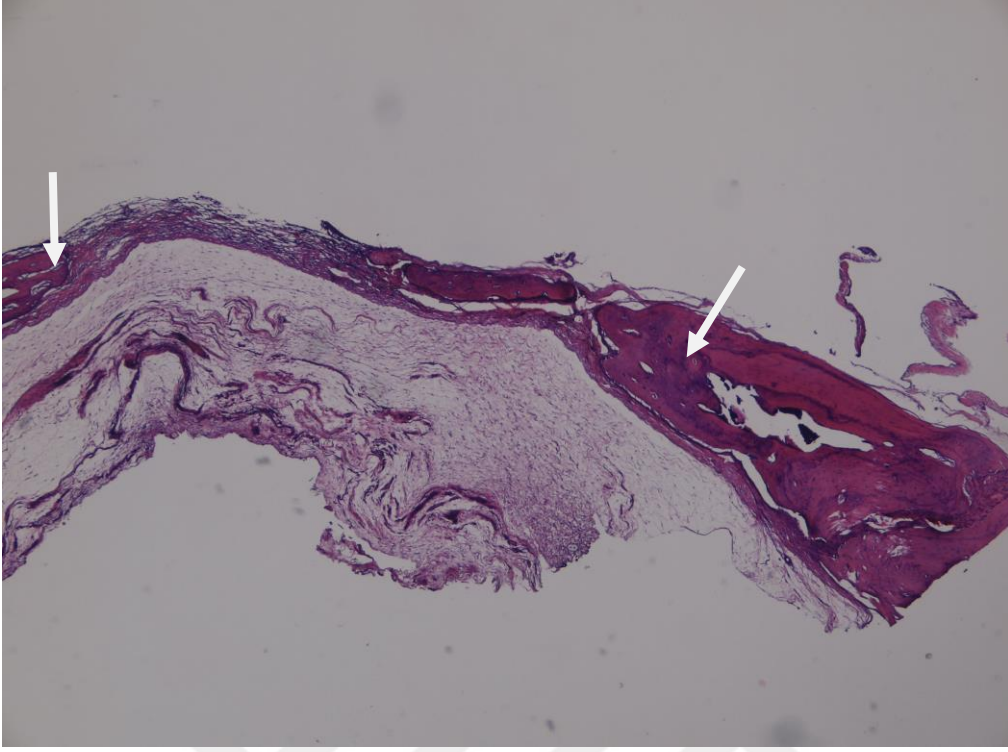
Şekil 16:3. haftada grup X+HY' de defekt kenarlarından başlayarak ok ile gösterilen yeni kemik oluşumu alanları. Rezidüel greft alanları yıldız işareti ile gösterilmiştir(H&Ex40)



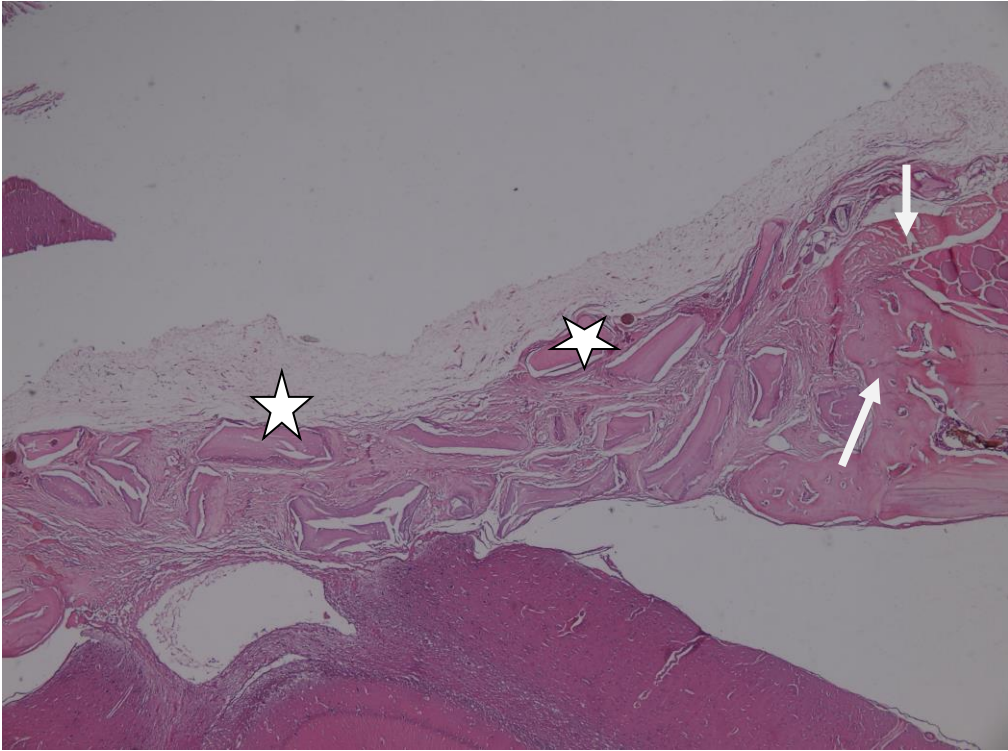
Şekil 17:6. haftada grup E’de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşumu alanları ok ile gösterilmektedir (H&EX40).



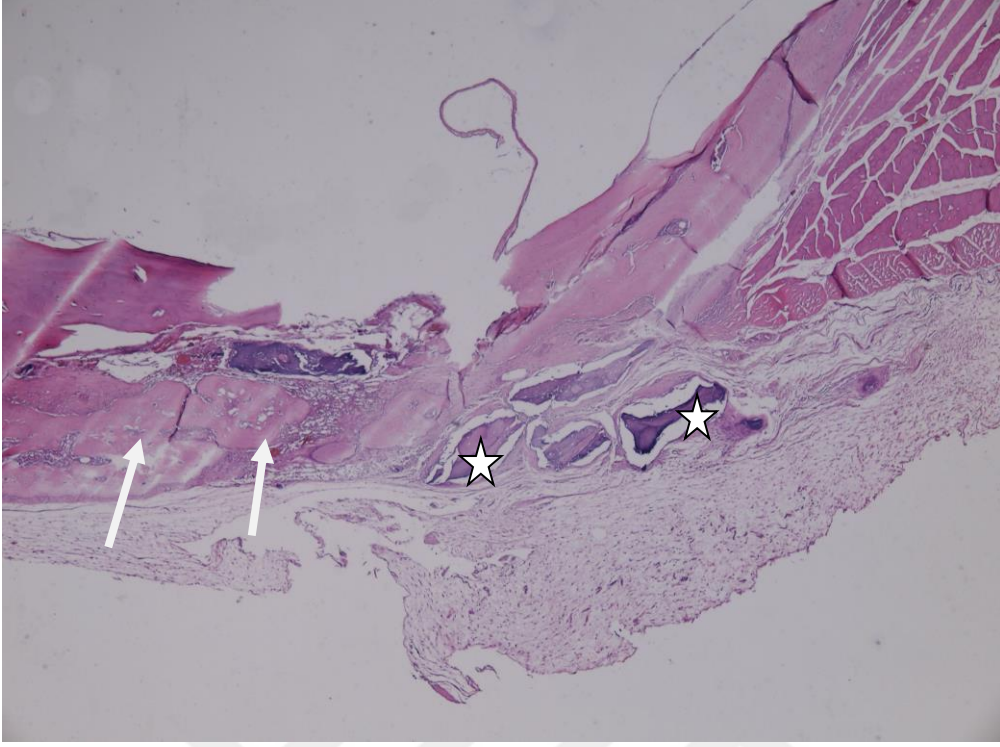
Şekil 18:6. haftada grup CM’de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşum alanları ok ile gösterilmektedir (H&Ex40)



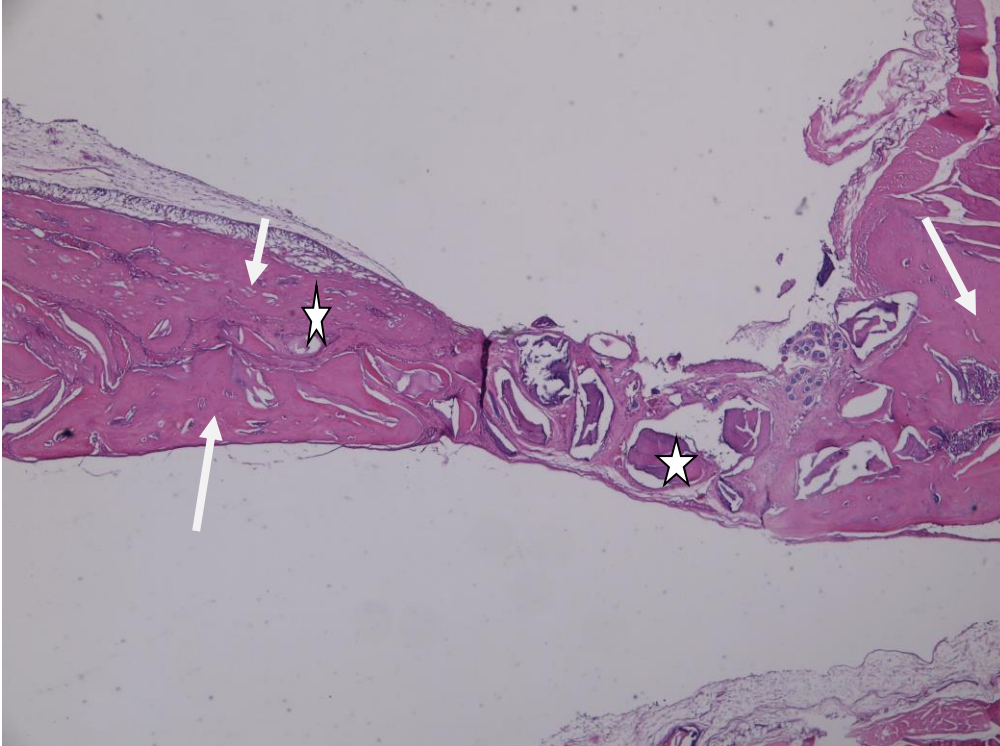
Şekil 19:6. haftada grup HY' de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşum alanları ok ile gösterilmektedir (H&Ex40).



Şekil 20:6. hafatada grup X'de gözlemlenen defekt kenalarından başlayan yeni kemik oluşumu alanları ok ile , rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmektedir (H&Ex40)



Şekil 21:6. haftada grup X+CM’ de defekt kenarlarından başlarak yeni kemik oluşumu alanları ok ile, rezidüel greft alanları yıldız ile gösterilmektedir (H&Ex40).



Şekil 22:6. haftada grup X+HY’de defekt kenarlarından başlayarak yeni kemik oluşu alanları ok ile, rzidüel greft alanları yıldız ile gösterilmektedir (H&Ex40).

4.1. Histomorfometrik Bulgular

4.1.1. Yeni Kemik Oluşumu

3. ve 6. haftalarda yapılan histomorfometrik değerlendirmelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p<0.05$) (Tablo 1). Yeni kemik oluşumu mm^2 olarak hesaplanmıştır.

Tablo 1: Gruplara Göre 3. ve 6. Hafta Yeni Kemik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi (birimi mm^2) *a*Kruskal Wallis Test *b*Wilcoxon Signed Ranks Test * $p<0,05$ ** $p<0,01$

		YENİ KEMİK		<i>p</i>	Fark
		3. Hafta	6. Hafta		
E (n=6)	<i>Ort±Ss</i>	0,16±0,15	0,27±0,16	<i>^b0,173</i>	0,12±0,24
	<i>Ortanca (Min-Maks)</i>	0,11 (0,07-0,45)	0,21 (0,14-0,55)		0,09 (-0,26-0,47)
CM (n=6)	<i>Ort±Ss</i>	0,46±0,34	0,77±0,57	<i>^b0,027*</i>	0,31±0,23
	<i>Ortanca (Min-Maks)</i>	0,28 (0,2-0,92)	0,46 (0,34-1,54)		0,19 (0,14-0,62)
HY (n=6)	<i>Ort±Ss</i>	0,34±0,19	0,51±0,17	<i>^b0,027*</i>	0,17±0,09
	<i>Ortanca (Min-Maks)</i>	0,28 (0,16-0,6)	0,54 (0,27-0,7)		0,12 (0,10-0,33)
X (n=6)	<i>Ort±Ss</i>	0,77±0,22	1,39±0,48	<i>^b0,028*</i>	0,62±0,32
	<i>Ortanca (Min-Maks)</i>	0,76 (0,41-1,07)	1,56 (0,55-1,79)		0,61 (0,14-0,98)
X + CM (n=6)	<i>Ort±Ss</i>	0,94±0,40	1,57±0,66	<i>^b0,075</i>	0,63±0,75
	<i>Ortanca (Min-Maks)</i>	0,90 (0,54-1,41)	1,5 (0,9-2,35)		0,45 (-0,41-1,79)
X + HY (n=6)	<i>Ort±Ss</i>	0,80±0,21	1,34±0,44	<i>^b0,046*</i>	0,54±0,33
	<i>Ortanca (Min-Maks)</i>	0,89 (0,5-1,0)	1,45 (0,5-1,72)		0,58 (-0,08-0,84)

E grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6.hafta yeni kemik oluşumu değerindeki ortalama $0,12\pm0,24$ birimlik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

CM grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6. hafta yeni kemik oluşumu değerindeki ortalama $0,31 \pm 0,23$ birimlik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,027$; $p<0,05$).

HY grubu deneklerde; 3.haftaya göre 6. hafta yeni kemik oluşumu değerindeki ortalama $0,17 \pm 0,09$ birimlik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,027$; $p<0,05$).

X grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6. Hafta yeni kemik oluşumu değerindeki ortalama $0,62 \pm 0,32$ birimlik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,028$; $p<0,05$).

X + CM grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6. Hafta yeni kemik oluşumu değerindeki ortalama $0,63 \pm 0,75$ birimlik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

X + HY grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6. hafta yeni kemik oluşumu değerindeki ortalama $0,54 \pm 0,33$ birimlik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,046$; $p<0,05$).

Gruplar arasında 3. hafta ve 6. Haftada oluşam yeni kemik miktarları karşılaştırıldığında en fazla artış X+CM grubunda görülmüştür. Bu grubu sırasıyle X , X+HY, CM, HY grubu takip etmiştir. Yeni kemik oluşumunda en az artış ise E grubu defektlerde görülmüştür (Şekil 12).

Gruplara göre deneklerin 3. hafta yeni kemik ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$; $p<0,01$). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Dunn-Bonferroni test sonuçlarına göre; E grubu deneklerin 3. hafta yeni kemik değeri, X, X+CM ve X+HY grubu deneklere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,001$; $p=0,001$; $p=0,001$; $p<0,01$). Aynı şekilde HY grubu deneklerin 3. Hafta yeni kemik oluşumu değeri, X, X+CM ve X+HY grubu deneklere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,045$; $p=0,015$; $p=0,028$; $p<0,05$)(Tablo 2).

Tablo 2: Gruplara Göre 3. Hafta Yeni Kemik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi(birimi mm ²)^aKruskal Wallis Test^{aa}Bonferroni Dunn test**p*<0,05***p*<0,01

YENİ KEMİK 3. Hafta						
	E (n=6)	CM (n=6)	HY (n=6)	X (n=6)	X + CM (n=6)	X + HY (n=6)
<i>Ort±Ss</i>	0,16±0,15	0,46±0,34	0,34±0,19	0,77±0,22	0,94±0,40	0,80±0,21
<i>Ortanca</i>	0,11	0,28	0,28	0,76	0,90	0,89
<i>(Min-Maks)</i>	(0,07-0,45)	(0,2-0,92)	(0,16-0,6)	(0,41-1,07)	(0,54-1,41)	(0,5-1,0)
<i>^ap</i>	0,001**					
	^{aa} Gruplara göre değerlendirmeler					
	E – CM		0,071			
	E – HY		0,223			
	E – X		0,001**			
	E – X + CM		0,001**			
	E – X + HY		0,001**			
	CM -HY		0,556			
	CM – X		0,158			
	CM– X + CM		0,064			
	CM – X + HY		0,109			
	HY - X		0,045*			
	HY - X+CM		0,015*			
	HY - X+HY		0,028*			
	X- X+CM		0,661			
	X – X+HY		0,848			
	X+CM-X+HY		0,805			

Gruplara göre deneklerin 6. hafta yeni kemik oluşumu ölçümleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,001$; $p<0,01$). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Dunn-Bonferroni test sonuçlarına göre; E grubu deneklerin 6. hafta New Bone değeri, X, X+CM ve X+HY grubu deneklere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,001$; $p=0,001$; $p=0,002$; $p<0,01$). Aynı şekilde HY grubu deneklerin 6. hafta yeni kemik oluşumu değeri, X ve X+CM grubu deneklere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,028$; $p=0,015$; $p<0,05$). CM grubu deneklerin 6. hafta yeni kemik değeri, X+CM grubu deneklere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,036$; $p<0,05$)(Tablo 3).

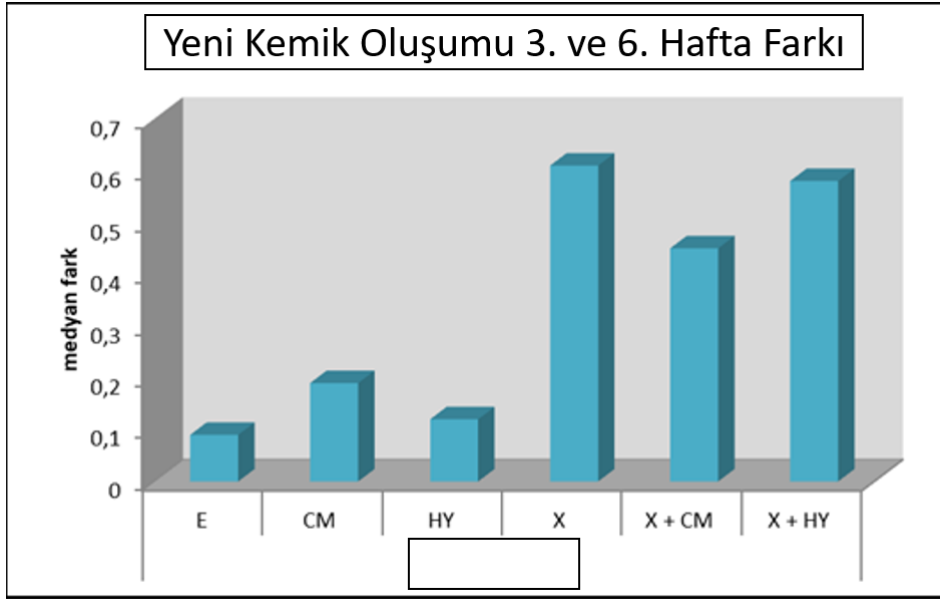
Tablo 3: Gruplara Göre 6. Hafta Yeni Kemik Ölçümlerinin Değerlendirilmesi (birimi mm ²)^aKruskal Wallis Test^{aa}Bonferroni Dunn test* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

	YENİ KEMİK 6. Hafta					
	E (n=6)	CM (n=6)	HY (n=6)	X (n=6)	X + CM (n=6)	X + HY (n=6)
<i>Ort±Ss</i>	0,27±0,16	0,77±0,57	0,51±0,17	1,39±0,48	1,57±0,66	1,34±0,44
<i>Ortanca</i>	0,21	0,46	0,54	1,56	1,5	1,45
<i>(Min-Maks)</i>	(0,14-0,55)	(0,34-1,54)	(0,27-0,7)	(0,55-1,79)	(0,9-2,35)	(0,5-1,72)
<i>^ap</i>	<i>0,001**</i>					
	^{aa} Gruplara göre değerlendirmeler					
E – CM	<i>0,132</i>					
E – HY	<i>0,244</i>					
E – X	<i>0,001**</i>					
E – X + CM	<i>0,001**</i>					
E – X + HY	<i>0,002**</i>					
CM -HY	<i>0,732</i>					
CM – X	<i>0,064</i>					
CM– X + CM	<i>0,036*</i>					
CM – X + HY	<i>0,109</i>					
HY - X	<i>0,028*</i>					
HY - X+CM	<i>0,015*</i>					
HY - X+HY	<i>0,052</i>					
X- X+CM	<i>0,805</i>					
X – X+HY	<i>0,805</i>					
X+CM-X+HY	<i>0,622</i>					

Gruplara göre deneklerin 3. haftaya göre 6. hafta yeni kemik değeriindeki değişimler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmıştır ($p=0,028$; $p<0,05$). Farklılığı belirlemek amacıyla yapılan Dunn-Bonferroni test sonuçlarına göre; E grubu deneklerin 3. haftaya göre 6. Hafta yeni kemik değeriindeki değişim, X, X+CM ve X+HY grubu deneklere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,008$; $p=0,044$; $p=0,018$; $p<0,05$). Aynı şekilde HY grubu deneklerin 3. haftaya göre 6. hafta yeni kemik değeriindeki değişim, X ve X+HY grubu deneklere göre anlamlı düzeyde düşük saptanmıştır ($p=0,014$; $p=0,030$; $p<0,05$) 3. haftaya göre 6. haftada greft materyallerinde belirgin yeni kemik oluşum alanları gözlenirken, 3. haftada Grup X, X + CM, X+HM'de greft partiküllerini çevreleyen bağ dokusunda kollajen lif belirgin olarak gözlemlenmiştir. Grup CM ve HY'de 3. haftada defekt bölgelerinin yan kesitlerinde kemik rejenerasyonu ve defekt bölgelerinde kontrol grubunu andıran gevşek bağ dokusu gözlemlenmiştir. 6. haftada bir defektin özellikle merkez bölümünde kısmen fibrozis gözlenirken, yeni kemik oluşumu daha belirgin olarak gözlenmiştir(Tablo 4)

Tablo 4: Gruplara Göre Yeni Kemik 3. Hafta ve 6.hafta Farklarının Değerlendirilme (birimi mm²) ^aKruskal Wallis Test ^{aa}Bonferroni Dunn test ^{*}p<0,05 ^{**}p<0,01

	YENİ KEMİK 3. Hf-6 Hf farkı (Δ)					
	E (n=6)	CM (n=6)	HY (N=6)	X (n=6)	X + CM (n=6)	X + HY (n=6)
Ort±Ss	0,12±0,24	0,31±0,23	0,17±0,09	0,62±0,32	0,63±0,75	0,54±0,33
Medyan	0,09	0,19	0,12	0,61	0,45	0,58
(Min-Maks)	(-0,26-0,47)	(0,14-0,62)	(0,10-0,33)	(0,14-0,98)	(-0,41-1,79)	(-0,08-0,84)
^ap	0,028*					
^{aa}Gruplara göre değerlendirmeler						
E – CM	0,179					
E – HY	0,848					
E – X	0,008**					
E – X + CM	0,044*					
E – X + HY	0,018*					
CM -HY	0,249					
CM – X	0,193					
CM– X + CM	0,502					
CM – X + HY	0,310					
HY - X	0,014*					
HY - X+CM	0,068					
HY - X+HY	0,030*					
X- X+CM	0,528					
X – X+HY	0,773					
X+CM-X+HY	0,732					



Şekil 23:Grupların 3hf- 6.hafta yeni kemik ölçümleri farklarının dağılımı

4.1.2. Rezidüel Greft

Gruplara göre deneklerin 3. ve 6. hafta rezidüel greft ölçümleri, istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

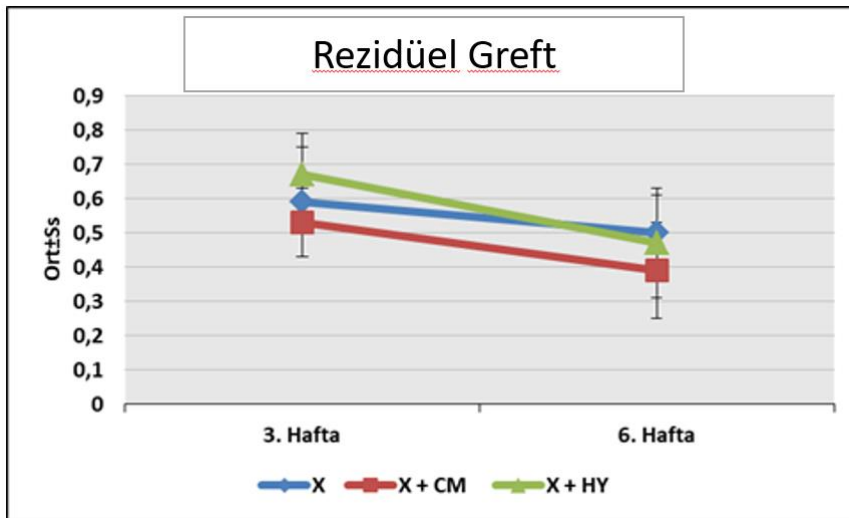
X grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6. hafta residuel greft değerindeki ortalama $0,09\pm0,25 \text{ mm}^2$ birimlik düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

X+CM grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6. hafta residuel greft değerindeki ortalama $0,14\pm0,23 \text{ mm}^2$ birimlik düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

X + HY grubu deneklerde; 3. haftaya göre 6. hafta residuel greft değerindeki ortalama $0,20\pm0,14 \text{ mm}^2$ birimlik artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,028$; $p<0,05$)(Tablo 5)

Tablo 5: Gruplara Göre 3. ve 6. Hafta Rezidüel Greft Ölçümlerinin Değerlendirilmesi (birimi mm²)

		Rezidüel Greft		p	Fark
		3. Hafta	6. Hafta		
X (n=6)	Ort±Ss	0,59±0,16	0,50±0,11	^b 0,600	-0,09±0,25
	Medyan (Min-Maks)	0,62 (0,36-0,75)	0,5 (0,3-0,6)		-0,08 (-0,45-0,24)
X + CM (n=6)	Ort±Ss	0,53±0,10	0,39±0,14	^b 0,116	-0,14±0,23
	Medyan (Min-Maks)	0,55 (0,41-0,65)	0,35 (0,25-0,62)		-0,16 (-0,4-0,2)
X + HY (n=6)	Ort±Ss	0,67±0,12	0,47±0,16	^b 0,028*	-0,20±0,14
	Medyan (Min-Maks)	0,67 (0,5-0,79)	0,53 (0,19-0,6)		-0,18 (-0,4- -0,01)
p		^a 0,226	^a 0,419		^a 0,652
X – X + CM		0,515	0,201		0,588
X – X + HY		0,290	0,724		0,357
X+CM-X+HY		0,088	0,355		0,705



Şekil 24: Gruplara Göre 3. ve 6. hafta rezidüel greft dağılımı

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda bir hyaluronik asitin benzil esteri olan HYAFF-11 den oluşan mesh (ağ) yapıdaki Hyalonect adındaki membranın kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisi histolojik ve histomorfometrik olarak incelenmiştir. Bu amaçla oluşturulan deney grupları ile kemik rejenerasyonunda sıklıkla kullanılan ksenogreftler ve kollajen membranlar kullanılarak kıyaslanmalar yapılmıştır. Deney sonunda yapılan incelemeler Hyalonect mesh uygulanan gruplarda kollajen membran uygulanan gruplara benzer sonuçlar göstermiştir.

Yılmaz ve ark. 2021 yılında yapmış oldukları çalışmada 6 adet koyun kullanılmıştır. Çalışmada sağ iliumda ilk defekt boş bırakılmıştır (boş grup), ardından sırasıyla iki defekt yalnızca kolajen membran ile örtülmüş (grup CM), son iki defekte otogreft uygulanmış ardından kollajen membran ile örtülmüştür (grup G+CM). Sol iliumda ilk defekt boş bırakılmış (boş grup), ardından sırasıya sadece Hyalonect membran (grup HY), son iki defekte otogreft uygulanmış ardından Hyalonect membran ile örtülmüştür (grup G+HY). Histolojik ve histomorfometrik değerlendirmeler 3. Ve 6. haftalarda 3'er denek sakrifiyesinden sonra yapılmıştır. Gruplar arasında gözlemlenen en iyi yeni kemik oluşumu grup G+HY ve G+CM'de görülmüştür. Değerlendirmeler sonucunda en düşük yeni kemik oluşum oranı 3. haftada boş defekt grubunda gözlemlenmiştir (19.67 ± 2.73). Grup HY ve grup CM benzer sonuçlar (sırasıyla 35.67 ± 4.55 ve 40.00 ± 3.41) elde edilirken, istatiksel olarak en yüksek değerlerin G + CM grubunda (52.83 ± 3.06) görüldüğü bildirilmiştir, bunu grup G + HY (46.33 ± 2.25) takip etmiştir. Yeni kemik oluşumu açısından istatiksel olarak grup boş, CM ve HY' ye kıyasla grup G + HY anlamlı şekilde daha yüksek olduğu bulunmuştur. Grup HY ve grup CM arasında istatiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu çalışma bizim çalışmamıza benzer bir çalışmadır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde en yüksek yeni kemik oluşum oranı zenojen greft ve kollajen membranın birlikte uygulandığı grupta (Grup X+CM) ($0,94 \pm 0,40 \text{ mm}^2$) görülmüştür. İkinci en yüksek kemikleşme oranı ise zenojen greft ve hyalüronik asit membranın birlikte uygulandığı grupta (Grup X+HY) ($0,80 \pm 0,21 \text{ mm}^2$) görülmüştür(164).

Rhodes ve ark. 2011 yılında yapmış oldukları çalışmada; rekonstrüktif cerrahi sonrası yumuşak dokuların kritik sorunlara neden olduğu belirtilmiştir. Bu

amaçla esterlenmiş hyalüronanın örülmüş liflerinden oluşan yeni bir membran olan Hyalitect (HYAFF11) kullanarak periosteal rekonstrüksiyon için uzun vadeli konak yanıtını ve büyük kemik defektlerinin kapanmasını incelemişlerdir. Çalışmada biyolojik karakterizasyon için, dorsal kas fasyasının bir bölümünün çıkarıldığı defekt modelinde 162 fare kullanılmıştır ve kontrol olarak sahte ameliyatlı fareler ile geleneksel histoloji kullanılarak 540 gün boyunca membran davranışı gözlemlenmiştir. Ek olarak, Hyalitect, 7 köpeğin humeruslarında yapılan, çeşitli geleneksel kemik dolgu bileşikleri ile doldurulmuş ve histoloji kullanılarak 6 hafta sonra gözlemlenen rejenerasyon süreci için kullanılmıştır. Dorsal kas fasya defekt modelinde, 30 günde meşin hücre kolonizasyonu, 120 günde vaskülarizasyon, 270 günde matriks lifi organizasyonu ve çevre dokuyla aynı bağ dokusunun görünümü ile düşük düzeyde inflamasyon gözlenmiştir. Hyalitect'in humerus defektleri içinde kemiğin rejenerasyonuna izin verirken fibrotik doku büyümesini önlediği ve 6 hafta itibarıyla doğal periosteal dokuya benzemeye başlayan dokunun rejenerasyonuna izin verdiği görülmüştür. Sonuç olarak; Hyalitect, özellikle periosteal dokunun rekonstrüksiyonunda, ortopedik ve travma rekonstrüktif cerrahi prosedürlerin son aşamalarının sonuçlarını iyileştirmek için uygun olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızda yumuşak dokunun iyileşmesi ile ilgili bir inceleme yapılmamıştır. Ancak postoperatif olarak takip edilen sıçanların ameliyat bölgelerinde enflamasyon belirtilerine rastlanmamıştır. Bunun yanında histolojik değerlendirme sırasında Hyalitect membranının kemik iyileşme bölgesine epitel hücre göçünü engellediği gözlemlenmiştir(165).

Ayanoğlu ve ark. 2015'te yapmış olduğu çalışmada; Hyalitect cerrahi meşin tavşan kaval kemiğinde oluşturulan metafizyel kemik defektlerinin iyileşme dinamikleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Çalışmada 80 erkek tavşanın proksimal tibial metafizinin ön yüzünde yaklaşık 5 mm'lik defektler oluşturulmuştur. Tavşanlar rastgele dört gruba ayrılmıştır: Grup I, kendi haline bırakılan kemik defektleri (kontrol grubu); Grup II, Hyalitect ile kapatılan kemik defekti; Grup III, allogreft ile doldurulmuş kemik defekti ve Grup IV, allogreft ile doldurulmuş ve Hyalitect ile kapatılmış kemik defekti. 3. ve 6. haftalarda Grup II ve III veya Grup III ve IV arasında anlamlı bir histolojik farklılık görülmemiştir. 3. haftada Grup II, III ve IV, Grup I'e göre anlamlı olarak daha iyi iyileşme göstermiştir ($p<0.05$). Ek olarak, Grup IV, 3. ve 6. haftalarda Grup II'den önemli ölçüde daha iyi iyileşme göstermiştir. 6. haftada sadece Grup IV, Grup I'den daha iyi iyileşme göstermiştir ($p<0.05$). Radyolojik olarak Grup II,

III ve IV, Grup I'e göre 3. ve 6. haftada daha iyi iyileşme göstermiştir ($p<0.05$). Sonuç olarak Hyalnect uygulaması ve kemik greftleme tek başına veya birlikte kullanıldığında iyileşme sürecini önemli ölçüde hızlandırmıştır. Kemik greftleme ile birlikte Hyalnect uygulaması, tek başına kemik greftlemeden daha iyi erken radyolojik iyileşme ile sonuçlanmıştır. Bizim çalışmamızda da sıçaan kalvaryumlarında 5 mm'lik defektler hazırlanarak kemik iyileşmesi gözlemlenmiştir. En düşük yeni kemik oluşu oranı 3. ve 6. haftalarda defektin boş bırakıldığı Grup E'de gözlemlenmiştir(166).

Mermerkaya ve ark. 2016'da yaptıkları çalışmada tavşan tibialarında oluşturulan 10 mm'lik defektlere deney grubu olarak bizim de çalışmamızda kullanmış olduğumuz Hyalnect(®) (Fidia Advanced Biopolymers SLR, İtalya), esterlenmiş hiyalüronanın (HYAFF11) örülmüş liflerini içeren membran, kırık veya greftlenmiş kemiği örtmek için kullanılmıştır. Bu zar ayrıca osteoprogenitör hücreleri yerinde tutmak için bir yapı iskelesi görevi görmesi için kullanılmıştır. Grup A'da hiyalüronan bazlı meş kullanılmamıştır. Grup B'de tibial segmental defektler hiyalüronan meş ile kapatılmıştır. Tavşanlar postoperatif 4 hafta takip edilmiş ve ardından osteoblastik aktiviteyi tespit etmek ve karşılaştırmak için her hayvan üzerinde kemik sintigrafik çalışmaları yapılmıştır. Hyalüronan bazlı meş grubunun kırık tarafındaki sayı (1649.2 ± 101.36), grup A'ninkine kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p = 0.019$). Bununla birlikte, sağlam kemik tarafındaki ortalama sayım açısından grup B ve kontrol tavşanları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0.437$). Kemik defekti (kırık)/sağlam kemik ortalama sayısı oranı, grup A'ya kıyasla grup B'de anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p = 0.008$). Hyalnect(®) osteoblastik aktiviteyi arttırmada rol oynadığı, periosteal membranın yapısal olarak bozuk veya yetersiz olduğu her durumda doku sürekliliğini yeniden sağlamaya yardımcı olduğu görülmüştür(167).

Yıldırım ve ark. 2022 yılında yapmış oldukları çalışmaya 2000-2500 kg ağırlığında, 8-12 haftalık 14 Yeni Zelanda tavşanı dahil edilmiştir. Anestezi altında orta hat insizyonu ile burun sırtları açığa çıkarılmış ve 2 mm keski ile her iki tarafa lateral osteotomiler yapılmıştır. Tüm tavşanların sol osteotomi bölgelerine hyaluronik asit bazlı ağ (Hyalnect®) (1x1 cm) gömülmüştür. Kontrol grubu olarak sağ osteotomi alanları boş bırakılmıştır. Kolajen yoğunluğu ve kılcal damar gelişimi kantitatif olarak karşılaştırılmıştır. Hyalnect® grubundan 10 örneğin 6'sında (%60), kontrol grubundan

10 örneğin 4'ünde (%40) kırık çizgilerinde birleşme gözlenmiştir. Hyalonnect® grubunda daha yüksek bir birleşme oranı görülmesine rağmen (%60'a karşı %40), fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p = 0.5$). Medyan kılcal damar sayısı değeri Hyalonnect® grubunda 4 (1-23) ve kontrol grubunda 3 (1-17) olarak bulunmuştur. Hyalonnect® grubunda kapiller sayım değerleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (sırasıyla $p = 0.023$ ve $p = 0.019$). Çalışmada sonuç olarak kollajen organizasyonu ve kapiller gelişimini kolaylaştıran bir materyal olarak hyaluronik asit bazlı meşlerin kemik iyileşme sürecine etkileri daha kapsamlı araştırmalarla araştırılması gerektiği bildirilmiştir(168).

Lisignoli ve ark. 2002' de yapmış oldukları çalışmada sıçan modelinde büyük segmental defektlerinin osteogenezisi incelenmiştir. Biyolojik olarak parçalanabilir, hyaluronik asit bazlı bir polimer yapı iskelesi (Hyaff 11), tek başına veya kemik iliği stromal hücreleri (BMSC'ler) ile birlikte implante edilmiştir. Kemik defektlerinin iyileşmesi 40, 80, 160 ve 200. günlerde radyolojik, histomorfometrik ve histolojik analizlerle incelenmiştir. Radyografik skorlar incelendiğinde tedavi edilmemiş defektlerde belirlenmemiştir (40. Gün 0.60 ± 0.55 60. Gün 0.60 ± 0.55). Hyaff11 ve Hyaff11+BMSCs+bFGF ile tedavi edilen lezyonlarda, radyografik skor 40. günden 200. günw yükselmiştir. Bunun tersine 40. günden 80. Güne (%55.6) ve 40. günden 160. güne (%50) önemli ölçüde azaldığı gözlemlenmiştir. En yüksek yeni kemik oluşumu 40. günde Hyaffs11+BMSCs+bFGF uygulanan grupta (97.38 ± 4.40) görülmüştür. Bu in vivo bulgulara göre Hyaff 11 yapı iskelesi, kemik defektlerinin onarımı için uygun bir araçtır; ayrıca BMSC'ler ve bFGF ile kombinasyon halinde kemik mineralizasyonunu önemli ölçüde hızlandırabilmektedir. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde Hyaff bazlı mambranın kullanıldığı gruplarda boş bırakılan defekt grubuna göre kemik rejenerasyonunun daha fazla olduğu gözlemlenmiştir(169).

Hyaluronik asitin farklı formları deneysel çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.

Damar yapısının onarılması kemik rejenerasyonu için önemli bir faktördür. Raines ve ark. 2011 de yapmış oldukları çalışmada hyaluronik asitin bir formu olan Sodyum hiyalüronat (NaHY), demineralize kemik matrisi (DBM) için bir taşıyıcı olarak kullanılmıştır. NaHY tek başına veya NaHY+DBM'nin farklı kombinasyonları ile birlikte kullanılmıştır. Kemik oluşumu ve iliğin rejenerasyonu

sırasında neovaskülarizasyonu değerlendirmek için bir sıçan tibial ilik ablasyon modeli kullanılmıştır. Test malzemeleri, kemik iliği boşluğuna şu şekilde enjekte edilmiştir: (A) boş defekt kontrolleri; (B) yüksek MW (700-800 kDa) NaHY + ısıyla inaktive edilmiş DBM; (C) PBS'de DBM; (D) düşük MW NaHY (35 kDa) + DBM; (E) yüksek MW NaHY + DBM; (F) Ö:E 50:50; (G) düşük MW NaHY; (H) yüksek MW NaHY; ve (I) G:H 50:50. Neovaskülarizasyonu değerlendirmek için, hayvanlara ablasyondan 3-, 6-, 14-, 21- ve 28 gün sonra ötenazi yapılmıştır. μ CT sonuçları, NaHY ilavesinin boş defektlere kıyasla damar sayısında artışa neden olduğunu ortaya koymuştur. Yalnızca NaHY gruplarının tümünde toplam kan damarı hacmi, tek başına DBM'ye benzer olarak gözlemlenmiştir. Sagital bölümlerin histomorfometrisi, NaHY'nin üç formülasyonunun da ilik boşluğu içindeki kan damarı sayısını arttırdığını göstermiştir(170).

Hyaluronik asit (hyaluronan), anti-inflamatuar ve antiödem özellikleri olan bir glikozaminoglikandır. Jentsch ve ark. 2003 yılında yapmış oldukları çalışmada plak kaynaklı diş eti iltihabının tedavisindeki etkisi için jel formülasyonunda HA değerlendirilmiştir. Yöntem olarak randomize çift-kör bir çalışmada, plak kaynaklı diş eti iltihabı olan 50 erkek denek iki gruba ayrılmıştır ve 3 haftalık bir tedavi süresi boyunca ağız hijyenine ek olarak günde iki kez HA içeren jel veya plasebo jeli kullanılmıştır. Klinik indeksler (API, Turesky indeksi, PBI) ve oluk sıvısı değişkenleri (peroksidaz, lizozim) sırasıyla 4, 7, 14 ve 21 gün sonra değerlendirilmiştir. Plasebo grubuyla karşılaştırıldığında, HA grubu, 4.günden itibaren plak indeksleri ($P = 0.011$) ve 7.günden itibaren PBI'de ($P = 0.001$) önemli bir gelişme göstermiştir. Oluk sıvısı değişkenleri, HA grubunda incelenen inflamasyon bölgesinin merkezinde önemli ölçüde iyileştirilmiştir. 7, 14 ve 21 gün sonra peroksidaz (176,72-128,75 ve 188,74-128,75 U/L) ve lizozim (1,27-0,27 ve 1,30-0,33 mg/L) aktivitelerinde önemli düşüşler olmuştur ($P = 0,034$ ile $< 0,001$ arasında) Plasebo grubunda sadece bir bölge 7 ve 21 gün sonra lizozim için anlamlı bir düşüş (1.74-0.75 mg/L) göstermiştir ($P = 0.048$ ve 0.025). Bu çalışma HA'nın yara iyileşmesi üzerindeki etkisi açısından önemli bilgiler vermektedir(171).

Hyaluronik asit (HA), yumuşak periodontal dokuların hücre dışı matrisinde en bol bulunan yüksek moleküler ağırlıklı glikozaminoglikandır. Yapılan çalışmalarda periodontal hastalıkta lenfoplazmosit enflamatuar infiltratta HA kaynaklı bir azalma göstermiştir. Mesa ve ark. 2005 yılında yaptıkları çalışmada yüksek

moleküler ağırlıklı bir HA jelinin hücre çoğalması, iltihaplanma ve farklı periodontal lezyon parametreleri üzerindeki etkisini incelemiştir. Periodontal hastalığı olan 28 hastadan alınan diş eti biyopsilerinde HA jelinin hücre proliferasyonu üzerindeki etkisi üzerine çift kör bir klinik çalışma yürütülmüştür. Jeli rastgele bir bölgeye ve plaseboyu kontralateral alana uygulamışlardır. Hücre proliferasyon antijeni Ki-67'nin ekspresyonunu belirlemek ve inflamatuvar infiltratı değerlendirmek için histopatolojik ve immünohistokimyasal çalışma için dişeti biyopsisi alınmıştır. HA jel tedavisi, tedavi edilen numunelerde mm² başına 276 (aralık 234-317) Ki-67-pozitif hücreye karşılık kontrollerde mm² başına 514 (aralık 158-876) ile diş eti indeksinde önemli bir azalmaya neden olduğu gözlemlenmiştir. (p<0.003). 13 hastada Ki-67-pozitif fibroblastik hücre sayısı tedavi ile azalırken, 6 hastada fark bulunmamıştır. 10 hastada lamina propriyada bulunan kronik inflamatuvar infiltratta Ki-67-pozitif hücreler azalırken, 6 hastada fark bulunmamıştır (p=0,054). Yüksek moleküler ağırlıklı HA jelinin fibroblastlar ve lenfositler gibi epitel hücrelerinde hücre proliferasyonunu azalttığı ve inflamatuvar süreci azalttığı, ayrıca kronik periodontitisli hastalarda periodontal lezyonu iyileştirdiği sonucuna varılmıştır(172).

2015 yılında Polepalle ve ark. yapmış oldukları çalışmada kronik periodontitisli hastalarda yapılan küretaj tedavileri sonrasında mikrobiyolojik ve klinik değerlendirmeler yapılmıştır. Tedavi sonrasında %0,8'lik HA içeren jel periodontitisli bölgeye (0.2 ml) uygulanarak kontrol grubuyla karşılaştırılmıştır. Plak indeksi ve sondalamada kanama değerleri kıyaslanmıştır HA içeren jel kullanılan grupta büyük ölçüde azamla gözlemlenmiştir. Klinik incelemelerde HA'nın cep derinliğinde azalmayı sağladığı ve ataçman seviyesinde artma sağladığı görülmüştür(173).

Briguglio ve ark. 2013 yılında yapmış oldukları randomize klinik çalışmada 24 aylık bir süre boyunca kemik içi periodontal defektleri tedavi etmek için hyaluronik asit kullanımını incelenmiştir. Yöntem ve materyal olarak iki duvarlı kemik altı defekti olan (sondalama derinliği (PD) ≥ 7 mm; klinik bağlanma düzeyi [CAL] ≥ 7 mm) kırk hasta seçilmiştir. Defektler rastgele iki gruba ayrılmıştır: hyaluronik asit uygulanan bölgeler (test grubu) ve açık flep debridmanı uygulanan bölgeler (kontrol grubu). 12 ve 24 aylık değerlendirmeler klinik ve radyografik parametrelere dayanmaktadır. Test defektleri ortalama $1,9 \pm 1,8$ mm'lik bir CAL kazancı gösterirken, kontrol defektleri $1,1 \pm 0,7$ mm'lik önemli ölçüde daha düşük bir kazanç sağlamıştır. PD

azalması da test grubunda ($1,6 \pm 1,2$ mm) kontrol grubundan ($0,8 \pm 0,5$ mm) önemli ölçüde daha yüksek olarak gözlemlenmiştir. Çalışma sonuçlarının frekans dağılımı analizi, kontrollerle karşılaştırıldığında test grubunda hyaluronik asidin klinik olarak anlamlı sonuçların (CAL kazanımları ≥ 2 mm ve PD azalması ≥ 2 mm) öngörülebilirliğini artırdığını göstermiştir. Kemik içi defektlerin hyaluronik asit ile tedavisi, açık flep debridmanı ile karşılaştırıldığında CAL kazanımı, PD azalması ve öngörülebilirlik açısından ek bir fayda sağladığı görülmüştür(174).

Nobre ve ark. 2007 yılında yaptıkları çalışmada hastanın bakım protokolünde HA veya klorheksidin (CHX) jelleri kullanılarak, immediat implantlarının iyileşme süresi boyunca peri-implant kompleksinin (implantı çevreleyen sert ve yumuşak dokular) sağlık durumunu karşılaştırmışlardır. Alt çeneye yerleştirilmiş dört immediat implanta (toplam 120 implant) sahip otuz tam dişsiz hasta, günlük bakımlarında yalnızca bu iki kimyasal kullanılarak rastgele iki gruba (HA ve CHX) ayrılmıştır. Her iki grup da ameliyat sonrası 10. gün, 2. ay, 4. ay ve 6. ayda klinik gözlemlerle 6 ay boyunca takip edilmiştir. Çalışma süresince HA ve CHX, dişsiz alt çenede peri-implant kompleksinin korunmasında iyi sonuçlar vermiştir. İkinci gözlemde modifiye kanama indeksinde HA grubu lehine istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p=0.003$). Altıncı ayda değerlendirilen aksiyal implantlarda fark daha belirgin olarak gözlemlenmiştir ($p=0.05$). Plak ve kanama indeksi arasındaki korelasyon katsayısı, 6 ayda CHX için potansiyel olarak daha iyi bir sonuç ortaya koymuştur. Bulgular, her iki kimyasal da implant bakımı için geçerli araçlardır. Çalışmada post operatif olarak HA'nın bakteriyostatik özelliği sebebiyle enflamasyon oranını azalttığını ve bunun da ödem de azalma sağladığı görülmüştür. Bizim çalışmamızda da erken dönem iyileşme histolojik olarak incelendiğinde kemik rejenerasyonuna bu açıdan katkı sağladığı görülmektedir(175).

Vanden Bogaerde'nin 2009'da yaptığı çalışmada, derin periodontal defektleri tedavi etmek için esterlenmiş hyaluronik asit kullanılmıştır. 18 kemik içi ve bir mandibular molar furkasyon olmak üzere 19 defekt tedavi edilmiştir. Sondalama cep derinliği (PPD) en az 6 mm olan defektler ardışık olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Tedaviden önce ve ameliyattan 1 yıl sonra her defekte PPD, dişeti çekilmesi ve klinik ataşman düzeyi (CAL) değerlendirilmiştir. Operasyon bölgesinde tam kalınlıkta bir flep kaldırılmıştır. Daha sonra lif formundaki hyaluronik asit (Hyaff), boşluğu tamamen

doldurmak için defekte sıkıştırılmıştır. Tedaviden bir yıl sonra, ortalama PPD 5,8 mm (SS: 0-10 mm), dişeti çekilmesi 2,0 mm (SS: 0-6 mm) ve ataçman kazancı 3,8 mm (SS: 0-7mm) olarak gözlemlenmiştir(176).

Ballini ve ark. 2005'te yaptıkları çalışmada hyaluronik asidin (HA) osteoindüktif etkisini incelemişlerdir. Bunun için ağız içi bölgelerden elde edilen otojen kemiğin kemik rejenerasyonu için kullanımında yardımcı olarak esterlenmiş düşük moleküler HA preparatı (EHA) (Hyaloss Matriks) kullanarak incelenmiştir. EHA ve otolog greftleme ile tedavi edilen periodontal defektli 9 hasta rapor edilmiştir. Veriler başlangıçta tedaviden önce ve 10 gün sonra ve ardından tedaviden 6, 9 ve 24 ay sonra elde edilmiştir. Klinik sonuçlar, radyografik değerlendirme ile doğrulanan tedavi edilen bölgelerde 2,6 mm'lik bir ortalama klinik bağlantı kazancı (gCAL) göstermiştir. Bu tür sonuçlar, EHA ile birleştirilmiş otojen kemiğin, kemik içi defektlerde yeni kemik oluşumunu hızlandırmada iyi yeteneklere sahip olduğunu göstermektedir(177).

Koray ve ark. 2014'te yaptıkları çalışmada gömülü alt üçüncü molar dişlerinin ekstraksiyonunun ardından şişlik, ağrı ve trismusun azaltılmasında iki farklı oral spreyn etkinliğini karşılaştırmıştır. Bu çalışma 34 hasta içermektedir. Çekim alanına 7 gün boyunca günde üç kez hyaluronik asit veya benzidamin hidroklorür spreyn (iki pompa) uygulanmıştır. Değerlendirmeler ameliyat gününde ve sonrasında 2. ve 7. günlerde yapılmıştır. Ameliyat sonrası ikinci günde iki tedavi grubu arasında şişlik ve trismus değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (sırasıyla $p=0.002$ ve $p=0.03$). Hyaluronik asit spreyn uygulamasının şişliği ve trismusunu azaltmada benzidamin hidroklorür spreyn daha etkili olduğu gözlemlenmiştir. Ağrı düzeylerinde azalmaya dair bir kanıt saptanmamasına rağmen hyaluronik asit gömülü üçüncü molar cerrahisini takiben hemen postoperatif dönemde şişlik ve trismusun tedavisinde faydalı bir etki sunduğu savunulmaktadır. Bizim çalışmamızda da ameliyat bölgelerinde herhangi bir komplikasyona rastlanmamıştır(178).

Silva ve ark. 2017'de yaptığı çalışmada HA'nın emilebilir zarlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. %1 HA jeli (HA grubu) veya basitçe kan pıhtısı ile doldurulmuş (kontrol grubu) ve BioGide® veya OsseoGuard™ ile kaplanmış sıçanların kalvarialarında kemik defektleri oluşturulmuştur. Hayvanlar 1, 30 ve 60 gün sonra ötenazi edilmiş ve histolojik olarak incelenmiştir. Çalışma sonunda BioGide® hem HA hem de kontrol gruplarında 30 ve 60. günlerde vaskülarizasyon, yoğun hücre

kolonizasyonu, kemik oluşumu ve doku entegrasyonu göstermiştir. Buna karşılık Osseoguard™, minimal hücre kolonizasyon ve yabancı cisim reaksiyonuyla ilişkili enflamatuvar reaksiyon göstermiştir. BioGide®'ın HA grubu, 60 günde kontrol grubuna ($269,1 \pm 70,83$) göre daha yüksek hücre kolonizasyonu ($574,9 \pm 137,6$) göstermiştir ($p < 0,05$). Bu bulguya rağmen, HA ve kontrol gruplarında yapı ve bozunma paterni BioGide® ve Osseoguard™ için benzer olarak görülmüştür. Sonuçlar, HA'nın BioGide® ve Osseoguard™ membranlarının doku entegrasyonuna ve yapısal bozulmasına müdahale etmediğini göstermektedir (179).

Yapılan çalışmalar ışığında HA'nın yara iyileşmesi sırasında enflamasyonun azalmasına ve hücre migrasyonu, adezyonuna ve hücresel farklılaşmaya etki ederek doku yeniden şekillenmesi ve vaskülarizasyona fayda sağladığı bunun yanında kemik rejenerasyonu sırasında ise osteoindüktif rol oynadığı ve bütün bunlarla birlikte bu süreçler içindeki önemli görevleri diğer başlıklarda da anlatıldığı üzere ortaya koyulmaktadır. Doku rejenerasyonunda ekstrasellüler matriks yapı elemanı olarak iyileşmeyi hızlandırıcı ve artırıcı olarak büyük rol oynayan HA'nın yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda da önemli görevler alabileceği öne sürülmüştür. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu sırasında özellikle bir çatı oluşturmak ve bölgeyi korumak adına ve diğer özellikleri sebebiyle bariyer membran kullanılması zorunluluk olarak gösterilmektedir. Buna karşılık olarak üstün özelliklere sahip HA türevlerinin membran olarak kullanıldığı çalışmalar oldukça sınırlı olarak gözlemlenmektedir. Ancak bu aynı zamanda gelişime açık bu alanda yapılacak deneysel çalışmalar sayesinde yapısı ve biyolojik aktivitesi sayesinde HA'nın diğer formları yanında membran olarak kullanımının da gelişerek artacağını sinyallerini vermektedir. Yapmış olduğumuz çalışma ile de bu alandaki kısıtlı çalışmalara büyük bir katkı sağlanmıştır. Çalışmamız ile elde edilen histolojik ve histomorfometrik incelemeler ile hyaluronik asit membranların yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda sıklıkla kullanılan ve altın standart olarak kabul edilen kollajen membranlar ile yakın başarısız sonuçlar ortaya çıkardığını gördük.

Bu çalışmada deney hayvanı olarak erkek sıçanlar tercih edilmiştir. Erkek tercih edilmesinin sebebi, menstural döngünün kemik iyileşmesi üzerine olumsuz etkilerinden kaçınmak içindir. Ayrıca vücut ağırlığıyla orantılı olarak kemik hacmi ve

yoğunluğu erkek sıçanlarda biraz daha fazla olduğu da göz önüne alınarak sıçanların erkek cinsiyette olması talep edilmiştir.

Yapmış olduğumuz çalışmada oluşturulan defektler için kritik boyut 5 mm olarak belirlenmiştir. Çalışmamızın sonucunda en az kemik oluşumunun gözleendiği grup boş defekt grubu olmuştur. Bu da seçtiğimiz defekt çapının grupları değerlendirmek için uygun olduğunu göstermektedir. Defektlerin planlaması mevcut literatür taramalarımız ile belirlenmiş olup buradaki temel amaç tek bir rat kalvaryimunda orta hattın her iki yanında birbirlerine olan mesafesi de ayarlanarak iki defekt oluşturmak ve böylece deneyde kullanılacak hayvan sayısını azaltmaktır. Hayvansal deney çalışmalarının da temeli olan 3R prensibi ile hareket etmek de etik açıdan da çalışmamızı desteklemektir. Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu işlemlerinde membranların yanı sıra kullanılam kemik grefti materyalinin özellikleri de sonuçları etkilemektedir. Bizim çalışmamızda greft olarak zenojen graft kullanımıdır. Yeni yapılacak çalışmalarda Hyalonect ile birlikte diğer greft materyallerinin de kullanılması ve etkinliğinin değerlendirilmesi faydalı olacaktır.

Yönlendirmiş kemik rejenerasyonunun klinik uygulamalarında yumuşak dokunun tam kapanmması ve vaskülarizasyonun yetersiz olması gibi sebeplerle membrane yüzeyinde enfeksiyon gelişebilmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada hyalüronik asit membran ve kollajen membran uygulanan gruplarda enfeksiyon veya açıklık gözlemlenmemiştir. Bu bilgi Hyalonect membranının klinikte YKR prosedürlerinde kullanımı ile defekt alanındaki enfeksiyon veya açıklık arasındaki ilişkiyi değerlendirmek açısından faydalı olabilir.

Çalışmamızda sıçanlarda iyileşme süresi insane göre daha hızlı olduğu için membranların rezorbe olma süreleri de dikkate alınarak (Hyalonect için yaklaşık 40 gün Bio Gide için yaklaşık 24 hafta) takip süresi 6 hafta olatak belirlenmiştir. Membranların kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi için uzun dönemli deneysel çalışmalara ve klinik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

SONUÇLAR

1. 3. hafta ve 6. Hafta deneysel gruplarında hiçbir denekte enflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu, fibrozis ve nekroz görülmemiştir.

2. Rezidüel greft miktarı 3. haftada en fazla X+HY grubunda 6. haftada ise X grubunda bulunmuştur. Grup X, X+CM ve X+HY'de 6. haftada kalan greft alanının 3. haftaya göre daha küçük olduğu gözlemlenmiştir. 3. ve 6. haftalarda kalan greft miktarı açısından 3 grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur.

3. 3. ve 6. haftalarda en düşük yeni kemik oluşum miktarı boş defekt grubunda gözlenmiştir. 3. haftada en fazla yeni kemik oluşumu grup X+CM'de ($0,94 \pm 0,40 \text{ mm}^2$), ardından X+HY grubunda ($0,80 \pm 0,21 \text{ mm}^2$) görülmüştür. Ancak iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p=0,805$). Grup CM'de ($0,46 \pm 0,34 \text{ mm}^2$) daha fazla yeni kemik oluşum alanı gözlenirken, HY grubu ($0,34 \pm 0,19 \text{ mm}^2$) ile anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p=0,557$). Sadece HY membran uygulanan defekt grubu sadece zenojen greft grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha düşük yeni kemik oluşumuna sahip olduğu görülmüştür (sırasıyla $0,34 \pm 0,19 \text{ mm}^2$; $0,77 \pm 0,22 \text{ mm}^2$; $p=0,045$). Sadece zenogreft (grup X) yerine defektlere greft uygulanması ve yüzeylerinin HY ile kapatılmasının (grup X+HY) bir avantajı olmadığı gözlemlenmiştir ($p=0,848$).

4. Tüm defektlerin 6. haftada daha yüksek miktarda yeni kemik oluşumu ile dolduğu gözlenirken, en düşük miktar yine boş defekt grubunda gözlenmiştir. 6. haftada en yüksek yeni kemik oluşumu X+CM ($1,57 \pm 0,66 \text{ mm}^2$) grubunda ölçülmüştür, bunu X grubu ve X+HY izlemiştir ($1,39 \pm 0,48 \text{ mm}^2$; $1,34 \pm 0,44 \text{ mm}^2$, sırasıyla). HY ve CM grupları yeni kemik oluşum miktarı değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır ($p=0,064$).

5. Bu çalışma ile hyalüronik asit membranın kemik rejenerasyonu üzerine etkisini incelemiştir. Hyalonnect® YKR sürecinde olumlu etkileri olmasının yanında hyalüronik asit membranlar üzerinde deneysel ve klinik çalışmaların devam etmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. Horiuchi N, Maeda T. Statins and bone metabolism. *Oral Dis.* 2006 Mar;12(2):85–101.
2. Jee WSS. *Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology.* . Florida; 2001. 1–68 p.
3. Stewart AJ, Roberts SJ, Seawright E, Davey MG, Fleming RH, Farquharson C. The presence of PHOSPHO1 in matrix vesicles and its developmental expression prior to skeletal mineralization. *Bone.* 2006 Nov;39(5):1000–7.
4. Daculsi G, Fella BH, Miramond T, Durand M. Osteoconduction, Osteogenicity, Osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes. *IRBM.* 2013 Nov;34(4–5):346–8.
5. Chanavaz M. Anatomy and histophysiology of the periosteum: quantification of the periosteal blood supply to the adjacent bone with ⁸⁵Sr and gamma spectrometry. *J Oral Implant.* 1995;21(3):214–9.
6. Huller T, Nathan H. Does the periosteum contribute to bone strength? *Isr J Med Sci.* 1970;6(5):630–4.
7. Eyre-Brook AL. The periosteum: its function reassessed. *Clin Orthop Relat Res.* 1984 Oct;(189):300–7.
8. Jacobsen FS. Periosteum: its relation to pediatric fractures. *J Pediatr Orthop B.* 1997 Apr;6(2):84–90.
9. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone.* 2004 Nov;35(5):1003–12.
10. Goldberg VM, Stevenson S, Schaffer JW. Bone and cartilage allografts. In: Friedlaender G.E., Goldberg V.M., editors. *American Academy of Orthopaedic Surgeons Symposium.*, Park Ridge, IL,; 1991. p. 3–12.
11. Goldberg VM. Selection of bone grafts for revision total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res.* 2000 Dec;(381):68–76.
12. Lin KY, Bartlett SP, Yaremchuk MJ, Fallon M, Grossman RF, Whitaker LA. The effect of rigid fixation on the survival of onlay bone grafts: an experimental study. *Plast Reconstr Surg.* 1990 Sep;86(3):449–56.
13. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and

- function. *Nat Rev Genet*. 2003 Aug;4(8):638–49.
14. Minkin C. Bone acid phosphatase: tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcif Tissue Int*. 1982 May;34(3):285–90.
 15. Nanci A. Content and distribution of noncollagenous matrix proteins in bone and cementum: relationship to speed of formation and collagen packing density. *J Struct Biol*. 1999 Jun 30;126(3):256–69.
 16. Robey PG. Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function. *Connect Tissue Res*. 1996;35(1–4):131–6.
 17. Marks SC, Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *Am J Anat*. 1988 Sep;183(1):1–44.
 18. Qiu S, Rao DS, Palnitkar S, Parfitt AM. Relationships between osteocyte density and bone formation rate in human cancellous bone. *Bone*. 2002 Dec;31(6):709–11.
 19. Ferretti M, Muglia MA, Remaggi F, Canè V, Palumbo C. Histomorphometric study on the osteocyte lacuno-canalicular network in animals of different species. II. Parallel-fibered and lamellar bones. *Ital J Anat Embryol*. 1999;104(3):121–31.
 20. Suda T, Nakamura I, Jimi E, Takahashi N. Regulation of osteoclast function. *J Bone Miner Res*. 1997 Jun;12(6):869–79.
 21. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004 Feb;83(2):166–9.
 22. Aubin JE, Triffitt J. *Principles of Bone Biology*. New York Academic Press; 2002. 59–81 p.
 23. Harada S, Rodan GA. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. *Nature*. 2003 May 15;423(6937):349–55.
 24. Lamoureux F, Baud'huin M, Duplomb L, Heymann D, Rédini F. Proteoglycans: key partners in bone cell biology. *Bioessays*. 2007 Aug;29(8):758–71.
 25. Hay ED. *Cell Biology of Extracellular Matrix*. New York: Plenum Press; 1991. 437–444 p.
 26. Christoffersen J, Landis WJ. A contribution with review to the description of mineralization of bone and other calcified tissues in vivo. *Anat Rec*. 1991 Aug;230(4):435–50.
 27. Yang X, Karsenty G. Transcription factors in bone: developmental and

- pathological aspects. *Trends Mol Med*. 2002 Jul;8(7):340–5.
28. Kearns AE, Khosla S, Kostenuik PJ. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand and osteoprotegerin regulation of bone remodeling in health and disease. *Endocr Rev*. 2008 Apr;29(2):155–92.
 29. Ham J, Miller PJ. Expanded polytetrafluoroethylene implants in rhinoplasty: literature review, operative techniques, and outcome. *Facial Plast Surg* [Internet]. 2003 Nov [cited 2022 Dec 14];19(4):331–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14737702/>
 30. Noble BS, Reeve J. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol*. 2000 Jan 25;159(1–2):7–13.
 31. Bianco P. Structure and mineralization of bone. 1 st. CRC Press; 1992. 243–268 p.
 32. Weiner S, Traub W, Wagner HD. Lamellar bone: structure-function relations. *J Struct Biol*. 1999 Jun 30;126(3):241–55.
 33. FROST HM. Micropetrosis. *J Bone Joint Surg Am*. 1960 Jan;42-A:144–50.
 34. Parfitt AM. The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1982;4(1):1–6.
 35. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am*. 1987 Apr;18(2):207–12.
 36. Jensen SS, Yeo A, Dard M, Hunziker E, Schenk R, Buser D. Evaluation of a novel biphasic calcium phosphate in standardized bone defects: a histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2007 Dec [cited 2022 Dec 12];18(6):752–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17888014/>
 37. Harris WH, White RE, McCarthy JC, Walker PS, Weinberg EH. Bony ingrowth fixation of the acetabular component in canine hip joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 1983 Jun;(176):7–11.
 38. Abrahamsson I, Berglundh T, Linder E, Lang NP, Lindhe J. Early bone formation adjacent to rough and turned endosseous implant surfaces. An experimental study in the dog. *Clin Oral Implants Res*. 2004 Aug;15(4):381–92.
 39. Buser D, Broggini N, Wieland M, Schenk RK, Denzer AJ, Cochran DL, et al. Enhanced bone apposition to a chemically modified SLA titanium surface. *J Dent*

- Res. 2004 Jul;83(7):529–33.
40. Langer R, Tirrell DA. Designing materials for biology and medicine. *Nature* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2022 Dec 12];428(6982):487–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15057821/>
 41. Miron RJ, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt DD, et al. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *J Dent Res* [Internet]. 2011 Dec [cited 2022 Dec 12];90(12):1428–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21940523/>
 42. Bender SA, Rogalski JB, Mills MP, Arnold RM, Cochran DL, Mellonig JT. Evaluation of demineralized bone matrix paste and putty in periodontal intraosseous defects. *J Periodontol* [Internet]. 2005 May [cited 2022 Dec 12];76(5):768–77. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15898938/>
 43. Park CH, Rios HF, Jin Q, Sugai J V., Padial-Molina M, Taut AD, et al. Tissue engineering bone-ligament complexes using fiber-guiding scaffolds. *Biomaterials* [Internet]. 2012 Jan [cited 2022 Dec 12];33(1):137–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21993234/>
 44. Matsuno H, Yokoyama A, Watari F, Uo M, Kawasaki T. Biocompatibility and osteogenesis of refractory metal implants, titanium, hafnium, niobium, tantalum and rhenium. *Biomaterials*. 2001 Jun;22(11):1253–62.
 45. Mahan KT. In *Comprehensive Textbook of Foot Surgery*,. McGlamry E.D., Banks A S., Downey M.S., editors. Baltimore: Williams&Wilkins; 1992. 1232–13254 p.
 46. Glowacki J, Mulliken JB. Demineralized bone implants. *Clin Plast Surg*. 1985 Apr;12(2):233–41.
 47. Roberts TT, Rosenbaum AJ. Bone grafts, bone substitutes and orthobiologics: the bridge between basic science and clinical advancements in fracture healing. *Organogenesis* [Internet]. 2012 Oct [cited 2022 Dec 12];8(4):114–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23247591/>
 48. BURWELL RG. Studies in the transplantation of bone. V. The capacity of fresh and treated homografts of bone to evoke transplantation immunity. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 1963 [cited 2022 Dec 12];45-B:386–401. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14041204/>

49. Muschler GF, Lane JM. In Bone Grafts and Bone Substitutes. In: Habaland M.B., Reddi A H., Saunders W.B., editors. Orthopedic surgery. Philadelphia; 1992. p. 375–407.
50. Eggli PS, Müller W, Schenk RK. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. Clin Orthop Relat Res. 1988 Jul;(232):127–38.
51. Yamada S, Heymann D, Bouler JM, Daculsi G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. Biomaterials [Internet]. 1997 Aug [cited 2022 Dec 12];18(15):1037–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9239465/>
52. Jensen SS, Bornstein MM, Dard M, Bosshardt DD, Buser D. Comparative study of biphasic calcium phosphates with different HA/TCP ratios in mandibular bone defects. A long-term histomorphometric study in minipigs. J Biomed Mater Res B Appl Biomater [Internet]. 2009 [cited 2022 Dec 12];90(1):171–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19085941/>
53. Buser D, Martin W, Belser UC. Optimizing esthetics for implant restorations in the anterior maxilla: anatomic and surgical considerations. Int J Oral Maxillofac Implants. 2004;19 Suppl:43–61.
54. Burchardt H. The biology of bone graft repair. Clin Orthop Relat Res. 1983 Apr;(174):28–42.
55. Pallesen L, Schou S, Aaboe M, Hjørtting-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. 2002;17(4):498–506.
56. Pinholt EM, Solheim E, Talsnes O, Larsen TB, Bang G, Kirkeby OJ. Revascularization of calvarial, mandibular, tibial, and iliac bone grafts in rats. Ann Plast Surg [Internet]. 1994 [cited 2022 Dec 12];33(2):193–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7979053/>
57. Gordh M, Alberius P. Some basic factors essential to autogeneic nonvascularized onlay bone grafting to the craniofacial skeleton. Scand J Plast Reconstr Surg hand Surg [Internet]. 1999 [cited 2022 Dec 12];33(2):129–46. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10450569/>
58. Widmark G, Andersson B, Ivanoff CJ. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 12];26(2):106–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9151163/>
 59. Johansson B, Grepe A, Wannfors K, Hirsch JM. A clinical study of changes in the volume of bone grafts in the atrophic maxilla. *Dentomaxillofac Radiol* [Internet]. 2001 [cited 2022 Dec 12];30(3):157–61. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11420628/>
 60. Springer ING, Terheyden H, Geiß S, Härle F, Hedderich J, Açıl Y. Particulated bone grafts--effectiveness of bone cell supply. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2004 Apr [cited 2022 Dec 12];15(2):205–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15008932/>
 61. Chiapasco M, Abati S, Romeo E, Vogel G. Clinical outcome of autogenous bone blocks or guided bone regeneration with e-PTFE membranes for the reconstruction of narrow edentulous ridges. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1999 [cited 2022 Dec 12];10(4):278–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10551070/>
 62. Buser D, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane--protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1998 [cited 2022 Dec 12];9(3):137–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10530128/>
 63. Jensen SS, Broggini N, Hjørtting-Hansen E, Schenk R, Buser D. Bone healing and graft resorption of autograft, anorganic bovine bone and beta-tricalcium phosphate. A histologic and histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2006 Jun [cited 2022 Dec 12];17(3):237–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672017/>
 64. Peleg M, Garg AK, Misch CM, Mazor Z. Maxillary sinus and ridge augmentations using a surface-derived autogenous bone graft. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2004 Dec [cited 2022 Dec 12];62(12):1535–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15573355/>
 65. Malchiodi L, Scarano A, Quaranta M, Piattelli A. Rigid fixation by means of

- titanium mesh in edentulous ridge expansion for horizontal ridge augmentation in the maxilla. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1998;13(5):701–5.
66. Zaffe D, D'Avenia F. A novel bone scraper for intraoral harvesting: a device for filling small bone defects. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2007 Aug [cited 2022 Dec 12];18(4):525–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17441981/>
 67. Kainulainen VT, Kainulainen TJ, Oikarinen KS, Carmichael RP, Sándor GKB. Performance of six bone collectors designed for dental implant surgery. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2006 Jun [cited 2022 Dec 12];17(3):282–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16672023/>
 68. Kim YK, Kim SG, Lim SC, Lee HJ, Yun PY. A clinical study on bone formation using a demineralized bone matrix and resorbable membrane. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* [Internet]. 2010 [cited 2022 Dec 12];109(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20417135/>
 69. Etcheson AW, Miley DD, Gillespie MJ. Osseous coagulum collected in bone traps: potential for bacterial contamination and methods for decontamination. *J Oral Implantol*. 2007;33(3):109–15.
 70. Hjørtting-Hansen E. Bone grafting to the jaws with special reference to reconstructive preprosthetic surgery. A historical review. *Mund Kiefer Gesichtschir* [Internet]. 2002 [cited 2022 Dec 12];6(1):6–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11974547/>
 71. Summers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Br* [Internet]. 1989 [cited 2022 Dec 12];71(4):677–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2768321/>
 72. Tomford WW. Bone allografts: past, present and future. *Cell Tissue Bank* [Internet]. 2000 [cited 2022 Dec 12];1(2):105–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15256954/>
 73. Lyford RH, Mills MP, Knapp CI, Scheyer ET, Mellonig JT. Clinical evaluation of freeze-dried block allografts for alveolar ridge augmentation: a case series. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003 Oct;23(5):417–25.
 74. Block MS, Degen M. Horizontal ridge augmentation using human mineralized particulate bone: Preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2004 Sep [cited 2022 Dec 12];62(SUPPL. 2):67–72. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15332183/>
75. Schwartz Z, Weesner T, Van Dijk S, Cochran DL, Mellonig JT, Lohmann CH, et al. Ability of deproteinized cancellous bovine bone to induce new bone formation. *J Periodontol* [Internet]. 2000 Aug [cited 2022 Dec 12];71(8):1258–69. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10972641/>
 76. Boyan BD, Ranly DM, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z. Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol* [Internet]. 2006 Sep [cited 2022 Dec 12];77(9):1555–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16945034/>
 77. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjørtting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(1):55–66.
 78. Piecuch JF, Ponichtera A, Nikoukari H. Long-term evaluation of porous hydroxyapatite blocks for alveolar ridge augmentation. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 1990 [cited 2022 Dec 12];19(3):147–50. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2164073/>
 79. Ewers R. Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: a clinical report of long-term results. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2005 Dec [cited 2022 Dec 12];63(12):1712–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16297691/>
 80. Thorwarth M, Wehrhan F, Srouf S, Schultze-Mosgau S, Felszeghy E, Bader RD, et al. Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments. *Br J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2007 Jan [cited 2022 Dec 12];45(1):41–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16713040/>
 81. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* [Internet]. 2001 Jun 15 [cited 2022 Dec 12];22(12):1599–606. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11374460/>
 82. Taylor JC, Cuff SE, Leger JPL, Morra A A, GI. No Title. *Int J Oral Maxillofac Implant*. 2002;17:321–30.
 83. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in

- dental applications. *J Prosthodont Res* [Internet]. 2013 Jan [cited 2022 Dec 12];57(1):3–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23347794/>
84. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1999;14(6):835–40.
 85. Hämmerle CHF, Chiantella GC, Karring T, Lang NP. The effect of a deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration around titanium dental implants. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1998 [cited 2022 Dec 12];9(3):151–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10530129/>
 86. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng* [Internet]. 2005 Jan [cited 2022 Dec 12];11(1–2):1–18. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15738657/>
 87. Buser D, Schenk RK, Steinemann S, Fiorellini JP, Fox CH, Stich H. Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *J Biomed Mater Res* [Internet]. 1991 [cited 2022 Dec 12];25(7):889–902. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1918105/>
 88. Bagnò A, Di Bello C. Surface treatments and roughness properties of Ti-based biomaterials. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2004 Sep [cited 2022 Dec 12];15(9):935–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15448401/>
 89. Böhner M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* [Internet]. 2000 [cited 2022 Dec 12];31 Suppl 4(SUPPL. 4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11270080/>
 90. von Arx T, Brogini N, Jensen SS, Bornstein MM, Schenk RK, Buser D. Membrane durability and tissue response of different bioresorbable barrier membranes: a histologic study in the rabbit calvarium. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(6):843–53.
 91. Vitale-Brovarone C, Verné E, Robiglio L, Martinasso G, Canuto RA, Muzio G. Biocompatible glass-ceramic materials for bone substitution. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2008 Jan [cited 2022 Dec 12];19(1):471–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17607523/>

92. Götz W, Gerber T, Michel B, Lossdörfer S, Henkel KO, Heinemann F. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone(r)) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2008 Oct [cited 2022 Dec 12];19(10):1016–26. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18828818/>
93. BASSETT CA, CAMPBELL JB, GIRADO JM, ROSSI JP, SEYMOUR RJ. Application of monomolecular filter tubes in bridging gaps in peripheral nerves and for prevention of neuroma formation; a preliminary report. *J Neurosurg* [Internet]. 1956 [cited 2022 Dec 14];13(6):635–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13377217/>
94. HURLEY LA, STINCHFIELD FE, BASSETT AL, LYON WH. The role of soft tissues in osteogenesis. An experimental study of canine spine fusions. *J Bone Joint Surg Am*. 1959 Oct;41-A:1243–54.
95. Buser D., Dahlin C., Schenk RK. Guided Bone Regeneration in Implant Dentistry. In: Hardwick R., Scantlebury TV., Sanchez R., Whitley N., Ambruster J., editors. *Membrane design criteria for guided bone regeneration of the alveolar ridge*. Chicago: Quintessence; 1994. p. 101–36.
96. Bunyaratavej P, Wang H-L. Collagen membranes: a review. *J Periodontol* [Internet]. 2001 Feb [cited 2022 Dec 14];72(2):215–29. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11288796/>
97. Hämmerle CHF, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol 2000* [Internet]. 2003 [cited 2022 Dec 14];33:36–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12950840/>
98. McAllister BS, Haghighat K. Bone augmentation techniques. *J Periodontol* [Internet]. 2007 Mar [cited 2022 Dec 14];78(3):377–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17335361/>
99. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2022 Dec 14];36(2):75–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12657150/>
100. Autian J. The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. *Int Dent J*. 1970 Sep;20(3):481–90.
101. Ignatius AA, Claes LE. In vitro biocompatibility of bioresorbable polymers:

- Poly(L, DL-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide). *Biomaterials* [Internet]. 1996 [cited 2022 Dec 14];17(8):831–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8730968/>
102. Boyne PJ. Restoration of osseous defects in maxillofacial casualties. *J Am Dent Assoc* [Internet]. 1969 [cited 2022 Dec 14];78(4):767–76. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/4975262/>
 103. Zellin G, Linde A. Effects of different osteopromotive membrane porosities on experimental bone neogenesis in rats. *Biomaterials* [Internet]. 1996 [cited 2022 Dec 14];17(7):695–702. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8672631/>
 104. Sigurdsson TJ, Hardwick R, Bogle GC, Wikesjö UME. Periodontal repair in dogs: space provision by reinforced ePTFE membranes enhances bone and cementum regeneration in large supraalveolar defects. *J Periodontol* [Internet]. 1994 Apr [cited 2022 Dec 12];65(4):350–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8195980/>
 105. Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, Nicoli Aldini N, Cordioli G. Role of intramarrow penetration in osseous repair: a pilot study in the rabbit calvaria. *J Periodontol* [Internet]. 1999 Dec [cited 2022 Dec 14];70(12):1501–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10632526/>
 106. Claffey N, Motsinger S, Ambruster J, Egelberg J. Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs. *J Clin Periodontol* [Internet]. 1989 [cited 2022 Dec 14];16(1):12–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2915047/>
 107. Haney JM, Nilvéus RE, McMillan PJ, Wikesjö UME. Periodontal repair in dogs: expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes support wound stabilization and enhance bone regeneration. *J Periodontol* [Internet]. 1993 Sep [cited 2022 Dec 14];64(9):883–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8229625/>
 108. Lundgren D, Sennerby L, Falk H, Friberg B, Nyman S. The use of a new bioresorbable barrier for guided bone regeneration in connection with implant installation. Case reports. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1994 [cited 2022 Dec 14];5(3):177–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7827233/>
 109. Von Arx T, Kurt B. Implant placement and simultaneous ridge augmentation

- using autogenous bone and a micro titanium mesh: a prospective clinical study with 20 implants. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1999 [cited 2022 Dec 14];10(1):24–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10196787/>
110. Lorenzoni M, Pertl C, Polansky RA, Jakse N, Wegscheider WA. Evaluation of implants placed with barrier membranes. A retrospective follow-up study up to five years. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2002 Jun [cited 2022 Dec 14];13(3):274–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12010157/>
 111. Dahlin C, Gottlow J, Linde A, Nyman S. Healing of maxillary and mandibular bone defects using a membrane technique. An experimental study in monkeys. *Scand J Plast Reconstr Surg hand Surg* [Internet]. 1990 [cited 2022 Dec 14];24(1):13–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2389116/>
 112. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt HP, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993;13(1):29–45.
 113. Von Arx T, Buser D. Horizontal ridge augmentation using autogenous block grafts and the guided bone regeneration technique with collagen membranes: a clinical study with 42 patients. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2006 Aug [cited 2022 Dec 14];17(4):359–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16907765/>
 114. Machtei EE. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans: a meta-analysis. *J Periodontol* [Internet]. 2001 Apr [cited 2022 Dec 14];72(4):512–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11338304/>
 115. Nowzari H, Slots J. Microbiologic and clinical study of polytetrafluoroethylene membranes for guided bone regeneration around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(1):67–73.
 116. Dupoirieux L, Pourquier D, Picot MC, Neves M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2001 [cited 2022 Dec 14];30(1):58–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11289623/>
 117. Hanel KC, McCabe C, Abbott WM, Fallon J, Megerman J. Current PTFE grafts: a biomechanical, scanning electron, and light microscopic evaluation. *Ann Surg* [Internet]. 1982 [cited 2022 Dec 14];195(4):456–63. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7065749/>

118. Schoenrock LD, Chernoff WG. Subcutaneous implantation of Gore-Tex for facial reconstruction. *Otolaryngol Clin North Am*. 1995 Apr;28(2):325–40.
119. Bordenave L, Fernandez P, Rémy-Zolghadri M, Villars S, Daculsi R, Midy D. In vitro endothelialized ePTFE prostheses: clinical update 20 years after the first realization. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2005;33(3):227–34.
120. Becker W, Dahlin C, Lekholm U, Bergstrom C, van Steenberghe D, Higuchi K, et al. Five-year evaluation of implants placed at extraction and with dehiscences and fenestration defects augmented with ePTFE membranes: results from a prospective multicenter study. *Clin Implant Dent Relat Res* [Internet]. 1999 [cited 2022 Dec 14];1(1):27–32. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11359308/>
121. Tatakis DN, Promsudthi A, Wikesjö UME. Devices for periodontal regeneration. *Periodontol 2000* [Internet]. 1999 [cited 2022 Dec 14];19(1):59–73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10321216/>
122. Jovanovic SA, Schenk RK, Orsini M, Kenney EB. Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(1):23–31.
123. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1988 [cited 2022 Dec 14];81(5):672–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3362985/>
124. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1994;9(1):13–29.
125. Simion M, Baldoni M, Rossi P, Zaffe D. A comparative study of the effectiveness of e-PTFE membranes with and without early exposure during the healing period. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1994 Apr;14(2):166–80.
126. Zitzmann NU, Naef R, Schärer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1997;12(6):844–52.
127. Gher ME, Quintero G, Assad D, Monaco E, Richardson AC. Bone grafting and guided bone regeneration for immediate dental implants in humans. *J Periodontol* [Internet]. 1994 Sep [cited 2022 Dec 14];65(9):881–91. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7990026/>
128. Augthun M, Yildirim M, Spiekermann H, Biesterfeld S. Healing of bone defects in combination with immediate implants using the membrane technique. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(4):421–8.
 129. Rasmusson L, Sennerby L, Lundgren D, Nyman S. Morphological and dimensional changes after barrier removal in bone formed beyond the skeletal borders at titanium implants. A kinetic study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 14];8(2):103–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9758961/>
 130. Maiorana C, Santoro F, Rabagliati M, Salina S. Evaluation of the use of iliac cancellous bone and anorganic bovine bone in the reconstruction of the atrophic maxilla with titanium mesh: a clinical and histologic investigation. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2001;16(3):427–32.
 131. Hutmacher D, Hürzeler MB, Schliephake H. A review of material properties of biodegradable and bioresorbable polymers and devices for GTR and GBR applications. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1996;11(5):667–78.
 132. Ray JA, Doddi N, Regula D, Williams JA, Melveger A. Polydioxanone (PDS), a novel monofilament synthetic absorbable suture. *Surg Gynecol Obstet*. 1981 Oct;153(4):497–507.
 133. Hürzeler MB, Quiñones CR, Hutmacher D, Schüpbach P. Guided bone regeneration around dental implants in the atrophic alveolar ridge using a bioresorbable barrier. An experimental study in the monkey. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 14];8(4):323–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9586480/>
 134. Vert M, Li S, Garreau H. New insights on the degradation of bioresorbable polymeric devices based on lactic and glycolic acids. *Clin Mater* [Internet]. 1992 [cited 2022 Dec 14];10(1–2):3–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10171200/>
 135. Vert M, Mauduit J, Li S. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity. *Biomaterials* [Internet]. 1994 [cited 2022 Dec 14];15(15):1209–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7703316/>
 136. Schmitz JP, Lemke RR, Zardeneta G, Hollinger JO, Milam SB. Isolation of particulate degradation debris 1 year after implantation of a Guidor membrane for

- guided bone regeneration: case report. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2000 [cited 2022 Dec 14];58(8):888–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10935589/>
137. Piattelli A, Scarano A, Coraggio F, Matarasso S. Early tissue reactions to polylactic acid resorbable membranes: a histological and histochemical study in rabbit. *Biomaterials* [Internet]. 1998 May [cited 2022 Dec 14];19(10):889–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9690830/>
 138. Simion M, Maglione M, Iamoni F, Scarano A, Piattelli A, Salvato A. Bacterial penetration through Resolut resorbable membrane in vitro. An histological and scanning electron microscopic study. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 14];8(1):23–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9586453/>
 139. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1978 [cited 2022 Dec 14];75(2):871–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/204938/>
 140. Locci P, Calvitti M, Belcastro S, Pugliese M, Guerra M, Marinucci L, et al. Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration. *J Periodontol* [Internet]. 1997 Sep [cited 2022 Dec 14];68(9):857–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9379330/>
 141. Schlegel AK, Möhler H, Busch F, Mehl A. Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®). *Biomaterials* [Internet]. 1997 Apr [cited 2022 Dec 14];18(7):535–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9105592/>
 142. Rothamel D, Schwarz F, Sculean A, Herten M, Scherbaum W, Becker J. Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2004 Aug [cited 2022 Dec 14];15(4):443–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15248879/>
 143. Pitaru S, Tal H, Soldinger M, Noff M. Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs. *J Periodontal Res* [Internet]. 1989 [cited 2022 Dec 14];24(4):247–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2528624/>

144. Hürzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, et al. Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 1998 [cited 2022 Dec 14];27(4):315–20. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9698183/>
145. N M, J P, B F, H M, P A, M P. Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes. A histomorphometric study in a rabbit model. *J Clin Periodontol* [Internet]. 1996 [cited 2022 Dec 14];23(12):1051–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8997647/>
146. Owens KW, Yukna RA. Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study. *Implant Dent* [Internet]. 2001 [cited 2022 Dec 14];10(1):49–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11307648/>
147. Minabe M, Kodama T, Hori T, Watanabe Y. Effects of atelocollagen on the wound healing reaction following palatal gingivectomy in rats. *J Periodontal Res* [Internet]. 1989 [cited 2022 Dec 14];24(3):178–85. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2528617/>
148. Quteish D, Dolby AE. The use of irradiated-crosslinked human collagen membrane in guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol* [Internet]. 1992 [cited 2022 Dec 14];19(7):476–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1430283/>
149. Speer DP, Chvapil M, Eskelson CD, Ulreich J. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J Biomed Mater Res* [Internet]. 1980 [cited 2022 Dec 14];14(6):753–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6820019/>
150. Lundgren AK, Sennerby L, Lundgren D, Taylor Å, Gottlow J, Nyman S. Bone augmentation at titanium implants using autologous bone grafts and a bioresorbable barrier. An experimental study in the rabbit tibia. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 1997 [cited 2022 Dec 14];8(2):82–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9758958/>
151. Meyer K, Palmer JW. The polysaccharide of the vitreous humor. *J Biol Chem*. 1934;629–34.
152. Levene PA, Lopez-Suarez J. Mucin and mucoids. *J Biol Chem*. 1918;105–26.
153. Fraser JR, Laurent TC, Pertoft H, Baxter E. Plasma clearance, tissue distribution

- and metabolism of hyaluronic acid injected intravenously in the rabbit. *Biochem J*. 1981 Nov 15;200(2):415–24.
154. Mouta Carreira C, Nasser SM, di Tomaso E, Padera TP, Boucher Y, Tomarev SI, et al. LYVE-1 is not restricted to the lymph vessels: expression in normal liver blood sinusoids and down-regulation in human liver cancer and cirrhosis. *Cancer Res*. 2001 Nov 15;61(22):8079–84.
 155. Jackson DG. The lymphatics revisited: New perspectives from the hyaluronan receptor LYVE-1. *Trends Cardiovasc Med* [Internet]. 2003 [cited 2022 Dec 26];13(1):1–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12554094/>
 156. Prevo R, Banerji S, Ferguson DJP, Clasper S, Jackson DG. Mouse LYVE-1 is an endocytic receptor for hyaluronan in lymphatic endothelium. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Jun 1 [cited 2022 Dec 26];276(22):19420–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11278811/>
 157. Aigner J, Tegeler J, Hutzler P, Campoccia D, Pavesio A, Hammer C, et al. Cartilage tissue engineering with novel nonwoven structured biomaterial based on hyaluronic acid benzyl ester. *J Biomed Mater Res*. 1998 Nov;42(2):172–81.
 158. Shu XZ, Liu Y, Palumbo F, Prestwich GD. Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: A covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials* [Internet]. 2003 [cited 2022 Dec 26];24(21):3825–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12818555/>
 159. Ibrahim S, Kang QK, Ramamurthi A. The impact of hyaluronic acid oligomer content on physical, mechanical, and biologic properties of divinyl sulfone-crosslinked hyaluronic acid hydrogels. *J Biomed Mater Res A* [Internet]. 2010 [cited 2022 Dec 26];94(2):355–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20186732/>
 160. Radaeva IF, Kostina GA, Zmievskii A V. [Hyaluronic acid: biological role, structure, synthesis, isolation, purification, and application (review)]. *Prikl Biokhim Mikrobiol*. 1997;33(2):133–7.
 161. Garg H.G. HCA. *Chemistry and Biology of Hyaluronan*. Amsterdam: Elsevier Science Ltd; 2004.
 162. Fisher GJ, Varani J, Voorhees JJ. Looking older: fibroblast collapse and therapeutic implications. *Arch Dermatol* [Internet]. 2008 May [cited 2022 Dec 26];144(5):666–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18490597/>

163. Benedetti L, Bellini D, Renier D OM. No. In: Williams DF, editor. Novel biomaterials based on hyaluronic acid and its derivatives. pisa: Proceedings of a Workshop held at the Annual Meeting of the European Society for Biomaterials; 1994. p. 9–20.
164. Yilmaz C, Ersanli S, Karabagli M, Olgac V, Bolukbasi Balcioglu N. May Autogenous Grafts Increase the Effectiveness of Hyalonect Membranes in Intraosseous Defects: An Experimental In Vivo Study. *Medicina (Kaunas)*. 2021 Apr 29;57(5).
165. Rhodes NP, Hunt JA, Longinotti C, Pavesio A. In vivo characterization of Hyalonect, a novel biodegradable surgical mesh. *J Surg Res* [Internet]. 2011 Jun 1 [cited 2022 Dec 26];168(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21074784/>
166. Ayanoğlu S, Esenyel CZ, Adanir O, Dedeoğlu S, Imren Y, Esen T. Effects of hyaluronic acid (Hyalonect) on callus formation in rabbits. *Acta Orthop Traumatol Turc* [Internet]. 2015 [cited 2022 Dec 26];49(3):319–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26200413/>
167. Mermerkaya MU, Doral MN, Karaaslan F, Huri G, Karacavus S, Kaymaz B, et al. Scintigraphic evaluation of the osteoblastic activity of rabbit tibial defects after HYAFF11 membrane application. *J Orthop Surg Res* [Internet]. 2016 [cited 2022 Dec 26];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27142755/>
168. Yildirim G, Ozcan KM, Erisgin Z, Hizli O, Sivrikaya C. Effects of hyaluronic acid on the bone healing after lateral osteotomy: an experimental animal model. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2022 Jun 24;279(6):2959–64.
169. Lisignoli G, Fini M, Giavaresi G, Nicoli Aldini N, Toneguzzi S, Facchini A. Osteogenesis of large segmental radius defects enhanced by basic fibroblast growth factor activated bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid-based polymer scaffold. *Biomaterials* [Internet]. 2002 Feb 15 [cited 2022 Dec 26];23(4):1043–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11791907/>
170. Raines AL, Sunwoo M, Gertzman AA, Thacker K, Guldberg RE, Schwartz Z, et al. Hyaluronic acid stimulates neovascularization during the regeneration of bone marrow after ablation. *J Biomed Mater Res A* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2022 Dec 26];96(3):575–83. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21254389/>
171. Jentsch H, Pomowski R, Kundt G, Göcke R. Treatment of gingivitis with hyaluronan. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2003 Feb [cited 2022 Dec 26];30(2):159–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12622859/>
 172. Mesa FL, Aneiros J, Cabrera A, Bravo M, Caballero T, Revelles F, et al. Antiproliferative effect of topic hyaluronic acid gel. Study in gingival biopsies of patients with periodontal disease. *Histol Histopathol* [Internet]. 2002 [cited 2022 Dec 26];17(3):747–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12168783/>
 173. Polepalle T, Srinivas M, Swamy N, Aluru S, Chakrapani S, Chowdary BA. Local delivery of hyaluronan 0.8% as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of chronic periodontitis: A clinical and microbiological study. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2022 Dec 26];19(1):37–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25810591/>
 174. Briguglio F, Briguglio E, Briguglio R, Cafiero C, Isola G. Treatment of infrabony periodontal defects using a resorbable biopolymer of hyaluronic acid: a randomized clinical trial. *Quintessence Int* [Internet]. 2013 [cited 2022 Dec 26];44(3). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23444204/>
 175. de Araújo Nobre M, Cintra N, Maló P. Peri-implant maintenance of immediate function implants: a pilot study comparing hyaluronic acid and chlorhexidine. *Int J Dent Hyg* [Internet]. 2007 [cited 2022 Dec 26];5(2):87–94. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17461960/>
 176. Vanden Bogaerde L. Treatment of infrabony periodontal defects with esterified hyaluronic acid: clinical report of 19 consecutive lesions. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2009 Jun;29(3):315–23.
 177. Balini A, Cantore S, Capodiferro S, Grassi FR. Esterified hyaluronic acid and autologous bone in the surgical correction of the infra-bone defects. *Int J Med Sci* [Internet]. 2009 Feb 26 [cited 2022 Dec 26];6(2):65–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19277251/>
 178. Koray M, Ofluoglu D, Onal EA, Ozgul M, Ersev H, Yaltirik M, et al. Efficacy of hyaluronic acid spray on swelling, pain, and trismus after surgical extraction of impacted mandibular third molars. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Nov;43(11):1399–403.

179. Silva ECE, Omonte SV, Martins AGV, de Castro HHO, Gomes HE, Zenóbio ÉG, et al. Hyaluronic acid on collagen membranes: An experimental study in rats. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2022 Dec 26];73:214–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27776288/>



HAM VERİLER



FORMLAR

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI