

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



GREFTLE KOMBİNE TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN
UYGULAMASININ KEMİK DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Tuba DEVELİ

ANKARA/ 2013

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI



GREFTLE KOMBİNE TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN
UYGULAMASININ KEMİK DEFEKTLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE
OLAN ETKİLERİNİN HİSTOPATOLOJİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Dt. Tuba DEVELİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Kenan ARAZ

ANKARA/ 2013

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Dalında Doktora Programı çerçevesinde Tuba Develi tarafından yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 09/04/2013

“Greftle Kombine Trombositten Zengin Fibrin Uygulamasının Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi”

TEZ DANIŞMANI: Prof. Dr. Kenan ARAZ

TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

Prof. Dr. Kenan ARAZ

Prof. Dr. Osman Taha KÖSEOĞLU

Prof. Dr. Sina UÇKAN

Yrd. Doç. Dr. Ufuk ATEŞ

Yrd. Doç. Dr. Burak BAYRAM

Kenan Araz
Osman Taha Köseoğlu
Sina Uçkan
Ufuk Ateş
Burak Bayram

ONAY: Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun 10/04/2013 tarih, 058 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Rengin ERDAL
Enstitü Müdürü

Rengin Erdal

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında yardımlarını ve sevgisini esirgemeyen, bilgilerini benimle paylaşan, desteğini her zaman hissettiğim Başkent Üniversitesi Rektörü değerli danışman hocam Prof. Dr. **Kenan Araz**'a,

Doktora eğitimimi hayatın bana sunduğu en güzel hediyelerden biri olmasında şüphesiz en çok emeği geçen, engin bilgi ve deneyimlerini bizlerle paylaşmaktan geri durmayan, mesleki hayatımda bana yön veren, ufkumu açan değerli hocam Başkent Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dekanı Prof.Dr. **Sina Uçkan**'a

Doktora tezimin her aşamasında bana titizlikle yol gösteren ve destek olan, doktora eğitimim boyunca en yakınımda hissettiğim canım arkadaşım Dr. **Sıdika Sinem Soydan**'a

Doktora tezimin deneysel kısmında ve doktora eğitimim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, klinik ve bilimsel bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, bendeki emeklerini hiç bir zaman unutmayacağım çok değerli hocam abim Yrd. Doç.Dr. **Burak Bayram**'a

Bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, neşesi, şefkati, zihni sinir bilimsel projeleri ile doktora hayatıma renk katan değerli hocam ablam Doç.Dr. **Firdevs Veziroğlu Şenel**'e

Doktora eğitimim boyunca klinik bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, desteğini her zaman hissettiğim ağabeyim Yrd.Doç.Dr. **Ufuk Ateş**'e ve tabiki Dr. **Yener Oğuz**'a

Kader birliği yaptığımız doktora öğrencisi arkadaşlarıma ve Diş Hekimliği Fakültesi çalışanlarına,

Doktora eğitimimin ilk gününden itibaren her an yanımda olan, beraber çalışmaktan ve öğrenmekten çok büyük zevk aldığım, sevgili ekürüm Dr. **Görkem Müftüoğlu**'na ve en zor anlarımda yanımda olan neşe kaynağım canım arkadaşım Dt. **Nur Altıparmak**'a

Yoğun çalışmaları arasında, tezimin histolojik değerlendirilmesi için vaktini bana ayıran, sabır ve anlayışıyla tezimin sonuçlanmasında çok değerli katkıları olan değerli hocam Uzm. Dr. **Ebru Şebnem Ayva**'ya

Maddi ve manevi bütün desteklerini esirgmeden beni bugünlere getiren, bana herşeyden önce iyi ve mütevazî bir insan olma yolunda yol gösteren *canım annem* ve *canım babama*;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

ÖZET

Greftle Kombine Trombositten Zengin Fibrin Uygulamasının Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerine Olan Etkilerinin Histopatolojik Olarak Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı Trombositten Zengin Fibrin' in (TZF) greftle kombine ve membran olarak kullanılmasının kemik defektlerinin iyileşmesi üzerine olan etkisini değerlendirmek ve karşılaştırmaktır.

Bu amaçla 14 adet erişkin Beyaz Viyana tavşanının parietal kemiklerine 9 mm çapında dört adet defekt oluşturuldu. Birinci defekt kontrol amaçlı boş bırakılırken (Grup A), ikincisine Hidroksiapatit/trikalsiyum fosfat (HA/TCP) greft ve üzerine kollajen membran (Grup B), üçüncü defekte HA/TCP greft ve üzerine TZF membran (Grup C) ve dördüncü defekte greft olarak HA/TCP ve TZF kombinasyonu ve üzerine kollajen membran (Grup D) uygulanmıştır. Denek hayvanları post-operatif 4.hafta (n:7) ve 8. haftalarda (n:7) sakrifiye edilerek kafatasları ampüte edilmiştir. Grupların herbirinden preparatlar elde edilerek histopatolojik olarak yeni kemik oluşumu, matür ve immatür kemik oluşumu, kemik iliği varlığı, defekt kapanma oranı, enflamasyon, vasküler proliferasyon, yeni bağ dokusu oluşumu, histiosit hücre toplulukları incelenmiştir.

4 ve 8 haftalık dönemde, yeni kemik oluşumunda dört grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu (p:0,042 ve p:0,015). Hem 4 hem de 8 haftalık dönemlerde Grup C'de yeni kemik oluşumu en fazla görülürken bunu sırasıyla Grup D, Grup B ve Grup A izlemiştir. Yeni kemik oluşumu dışında değerlendirilen diğer parametrelerde 4. haftada enflamasyon, vasküler proliferasyon, bağ dokusu oluşumu, histiosit hücre toplulukları ve kemik iliği varlığında gruplar arasında anlamlı fark görülürken; 8. haftada bağ dokusu oluşumu, histiosit hücre toplulukları, matür kemik oluşumu ve kemik iliği varlığında gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur.

Sonuç olarak, hem 4. hem de 8. haftada HA/TCP greft üzerine TZF membran kullanılan grupta, kontrol grubuna ve HA/TCP greft üzerine kollajen membran

kullanılan gruba göre daha fazla yeni kemik oluşumu belirlenmiştir. Bol miktarda büyüme faktörü ve sitokin içeren TZF'nin klinik uygulamalarda kollajen membrana başarılı bir alternatif olabileceği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Trombositten Zengin Fibrin , Kollajen membran, Kemik defekt iyileşmesi, Yeni kemik oluşumu

ABSTRACT

The Histopathological Evaluation of the Effect of Combined Graft and Platelet Rich Fibrin Implementation on Healing of Bone Defects

The purpose of this study was to evaluate and compare the effects of Platelet Rich Fibrin (PRF) usage combined with graft and as a membrane on healing of bone defects.

For that purpose, four defects with 9mm diameter were constituted in each parietal bone of 14 White Vienna rabbits. First defect was untreated as control (Group A), Hydroxyapatite/tricalcium phosphate graft (HA/TCP) and collagen membrane were used in second defect (Group B), HA/TCP and PRF membrane were used in third defect (Group C) and combined HA/TCP – PRF graft and collagen membrane were used in fourth defect (Group D). All samples were sacrificed at post-operative 4th week (n:7) and 8th week (n:7) periods and all skulls were amputated. Preparates were obtained from each group and then new bone formation, mature and immature bone formation, presence of bone marrow, the ratio of defect closure, inflammation, vascular proliferation, new connective tissue formation, histiocit cell groups were evaluated histopathologically.

It is found that there is a statistically significant difference between four groups in new bone generation for 4 and 8 weekly periods (p:0,042 ve p:0,015). At both 4 and 8 weekly periods, new bone generation is the highest in Group C, and Group D, Group B and Group A come after sequentially. Other than new bone generation, a statistically significant difference is found between groups in other evaluated parameters such as inflammation, vascular proliferation, connective tissue regeneration, histioid cell community, bone marrow formation at 4th week and connective tissue regeneration, histioid cell community, mature bone generation and bone marrow formation at 8th week.

As a conclusion, higher new bone formation was determined in group which PRF membrane and HA/TCP graft were used when compared with control group and the group which HA/TCP graft was covered with collagen membrane both at 4th and 8th weeks. It is shown that TZF which includes high amount of growth factor and cytokine is a successful alternative to kollagen membrane.

Key Words: Platellet Rich Fibrin , Collagen membrane, Bone defect healing, New bone generation

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xi
ŞEKİLLER	xii
TABLolar	xvi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Kemik Dokusu	3
2.1.1. Spongiyoz (Süngerimsi, Kansellöz) Kemik	3
2.1.2. Kortikal (Kompakt, Lameller) Kemik	4
2.1.3. Kemik zarları	4
2.1.4. Kemik Matriksi.....	5
2.1.5. Kemik Hücreleri	6
2.1.5.1. Osteoprogenitör Hücreler	6
2.1.5.2. Osteoblastlar	6
2.1.5.3. Osteositler	7
2.1.5.4. Osteoklastlar	7
2.1.6. Kemik Oluşumu	8
2.1.6.1. Zarlararası Kemikleşme (İntramembranöz Kemikleşme)	8
2.1.6.2. Enkondral (endokondral) kemikleşme.....	10
2.1.7. Kemik iyileşmesi süreci	10
2.1.7.1. Enflamatuar faz.....	11
2.1.7.2. Onarım fazı	12
2.1.7.3. Yeniden şekillenme fazı	13
2.2. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Uygulanan Greft Materyalleri	14
2.2.1. Kemik greftlerinin tarihçesi.....	15
2.2.2. Kemik grefti fizyolojisi	15
2.2.2.1. Osteogenezis	16
2.2.2.2. Osteokondüksiyon	16

2.2.2.3. Osteoindüksiyon	17
2.2.3. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Greft Materyallerinin Sınıflandırılması	17
2.2.3.1. Otojen Greftler (Otogreftler)	17
2.2.3.2. Homojen Greftler (Homogreftler)	18
2.2.3.3. Heterojen Greftler (Heterogreftler – Ksenogreftler)	19
2.2.3.4. Sentetik Greft Materyalleri (Alloplastlar)	19
2.3. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu	19
2.4. Trombositten Zengin Fibrin (TZF)	21
2.4.1. Trombositler	24
2.4.1.1. Trombosit Büyüme Faktörleri	25
2.4.1.1.1. TGF β -1:Fibrozis ajan	25
2.4.1.1.2. PDGF: Mezenkimatöz soyu uyarıcı	26
2.4.1.1.3. IGF: Hücre koruyucu ajan	26
2.4.1.1.4. VEGF	27
2.4.1.1.5. Büyüme Faktörlerinin Etki Mekanizması	28
2.4.2. Lökositler.....	29
2.4.3. Sitokinler	30
2.4.4. Fibrin	31
2.4.5. Dolaşımdaki Kök Hücreler.....	32
2.4.6. L-TZF'nin Etki Mekanizması	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1. Trombositten Zengin Fibrinin Hazırlanması.....	38
3.2. Histopatolojik Değerlendirme	39
3.3. İstatistiksel değerlendirme	42
4. BULGULAR.....	44
4.1. Genel Değerlendirme Bulguları	44
4.2.Histolojik Değerlendirme Bulguları.....	44
4.2.1. Yeni Kemik Oluşumu Bulguları.....	44
4.2.2. Enflamasyon Bulguları.....	46
4.2.3. Vasküler Proliferasyon	48
4.2.4. Yeni Bağ Dokusu Oluşumu.....	50
4.2.5. Histiosit Hücre Toplulukları.....	52
4.2.6. Matür Kemik Oluşumu.....	54

4.2.7. İmmatür Kemik Oluşumu.....	56
4.2.8. Kemik İliği Varlığı	57
5. TARTIŞMA.....	61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	71
7. KAYNAKLAR	73

KISALTMALAR ve SİMGELER

Ark.	: Arkadaşları
α	: Alfa
BD	: Bağ Dokusu
BMP	: Kemik Morfogenik Protein
β	: Beta
DA	: Defekt Alanı
FGF	: Fibroblast Büyüme Faktörü
HA	: Hidroksiapatit
hk	: Havers Kanalları
HT	: Histiosit Toplulukları
IGF	: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IKD	: İmmatür Kemik Dokusu
IL	: İnterlökin
İMT	: İmmatür
KG	: Kemik Grefti
ki	: Kemik İliği
KM	: Kollajen Membran
L-TZF	: Lökosit Ve Trombositten Zengin Fibrin
L-TZP	: Lökosit Ve Trombositten Zengin Plazma
MT	: Matür
obt	: Osteoblast
ost	: Osteosit
P-TZF	: Saf Trombositten Zengin Fibrin
P-TZP	: Saf Trombositten Zengin Plazma
PDGF	: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TCP	: Trikalsiyum Fosfat
TGF	: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF	: Tümör Nekroze Edici Faktör
TZF	: Trombositten Zengin Fibrin
TZP	: Trombositten Zengin Plazma
VEGF	: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
YK	: Yeni Kemik
YKO	: Yeni Kemik Oluşumu

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Kemik dokusunun mikroskopik görüntüsü	6
Şekil 2.2. Kemik hücrelerinin mikroskopik görüntüsü.....	8
Şekil 2.3. Kollajen membran ve kemik grefti kullanılarak yapılan yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda yeni kemik oluşumu	21
Şekil 2.4. 3 Katman halinde oluşmuş TZF örneği	23
Şekil 2.5. Fibrin matriksin 3 boyutlu yapısı (1-sitokin, 2- trombosit sitokini, 3- glikan zinciri, 4- fibronektin, 5- fibrin-glikan zincir ağı).....	31
Şekil 3.1. A, Tavşanların operasyona hazırlanışı B, Lokal anestezi uygulaması	36
Şekil 3.2. A, Yatay insizyon. B, Flep kaldırıldıktan sonra kemiğin görünümü.....	36
Şekil 3.3. A, 9 mm çapında trephin frezle defektlerin oluşturulması. B, Oluşturulan ilk defektin görünümü	36
Şekil 3.4. A, Trephin frezle oluşturulan defektlerin görünümü B, Defekt sınırlarının fissür frez ile belirginleştirilmesi.....	37
Şekil 3.5. A, 9mm çapındaki kortikal kemiklerin kaldırılması. B, Kemik parçaları uzaklaştırıldıktan sonra defekt bölgelerinin görünümü.....	37
Şekil 3.6. Biyomateryallerin yerleştirilmesinden sonra defektlerin görünümü.....	37
Şekil 3.7. A, Tavşanların kulak veninden kan alımı. B, PC 02 santrifüj cihazı	38
Şekil 3.8. A, Kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırıldığı TZF. B, Kendi özel kutusunda preslenerek hazırlanan TZF	39
Şekil 3.9. A, Cerrahi alanın suture edilmesi B, Kloramfenikol sprey uygulamasından sonraki görünüm	39
Şekil 3.10. Patoloji örneklerinin hazırlanması. A, Ampute edilen kafatası, B, duraya bakan yüzün doku boyası ile boyanması. C, doku takibi öncesi uygun oryantasyonda örneklendirilmesi D, doku takibi sonrası parafin blok hazırlanması	40
Şekil 4.1. 4 ve 8 haftalık dönemlerde yeni kemik oluşumu	45
Şekil 4.2. 4. haftaya ait çalışma gruplarının histopatolojik görünümü. A, Kontrol grubunda yeni kemik oluşumu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin X 2). B, Grup B'de grefti çevreleyen yeni kemik oluşumu görünümü (Hematoksilen-Eozin X 2). C, Grup C'de grefti çevreleyen karışık kemik trabeküllerinin görünümü (Hematoksilen-Eozin X 10). D, Grup D'de	

grefti çevreleyen yeni oluşmuş kemik trabeküllerinin görünümü (Hematoksilen-Eozin X 2).	45
Şekil 4.3. 8. haftaya ait kemik defektlerinin histopatolojik görünümü. A, Kontrol grubunda defekt alanı ve yeni kemik oluşumu görüntüsü. B, Grup B’de grefti çevreleyen yeni kemik oluşumu görünümü. C, Grup C’de grefti çevreleyen karışık kemik trabeküllerinin görünümü. D, Grup D’de grefti çevreleyen yeni oluşmuş kemik trabeküllerinin görünümü (Hematoksilen-Eozin X 2).	46
Şekil 4.4. 4 ve 8 haftalık dönemlerde enflamasyon dereceleri.....	47
Şekil 4.5. 4. haftaya ait çalışma gruplarında izlenen kronik enflamasyon bulguları. A, Kontrol grubunda kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). B, Grup B’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). C, Grup C’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 40). D, Grup D’de kronik enflamasyon alanlarının görünümü (Hematoksilen-Eozin X 10).	47
Şekil 4.6. 8. haftaya ait çalışma gruplarında izlenen kronik enflamasyon bulguları. A, Kontrol grubunda kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). B, Grup B’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). C, Grup C’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 20). D, Grup D’de kronik enflamasyon alanlarının görünümü (Hematoksilen-Eozin X 10).	48
Şekil 4.7. 4 ve 8 haftalık dönemlerde vasküler poliferasyon dereceleri.....	49
Şekil 4.8. Dördüncü haftada çalışma gruplarında vasküler proliferasyon varlığı. A, Grup A’da vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 20). B, Grup B’de vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 20). C, Grup C’de vasküler proliferasyon varlığı(Masson Trikrom X 10). D, Grup D’de vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 10).	49
Şekil 4.9. Sekizinci haftada çalışma gruplarında vasküler proliferasyon varlığı. A, Grup A’da vasküler proliferasyon varlığı. B, Grup B’de vasküler proliferasyon varlığı. C, Grup C’de vasküler proliferasyon varlığı. D, Grup D’de vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 20).	50
Şekil 4.10. 4 ve 8 haftalık dönemlerde yeni bağ dokusu oluşumu	51

Şekil 4.11. 4. haftaya ait çalışma gruplarında defekt alanında bağ dokusu gelişimi. A, Kontrol grubunda bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10). B, Grup B’de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10). C, Grup C’de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 20). D, Grup D’de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10).....	51
Şekil 4.12. 8. haftaya ait çalışma gruplarında bağ dokusu alanlarının görünümü. A, Kontrol grubunda bağ dokusu alanlarının görünümü. B, Grup B’de bağ dokusu alanlarının görünümü. C, Grup C’de bağ dokusu alanlarının görünümü. D, Grup D’de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10).	52
Şekil 4.13. 4 ve 8 haftalık dönemlerde histiosit hücre toplulukları	53
Şekil 4.14. Dördüncü haftaya ait çalışma gruplarında histiositik hücre toplulukları. A, Grup C’de defekt yüzeyinde kümelenen histiositik hücre grupları. B, Grup D’de greft ile karışık alanlarda histiositik hücre toplulukları (Hematoksilen-Eozin X 20).	53
Şekil 4.15. Sekizinci haftaya ait çalışma gruplarında histiositik hücre toplulukları. A, Grup C’de defekt yüzeyinde kümelenen histiosit hücre grupları, B, Grup D’de greft ile karışık alanlarda kümelenen histiosit hücre toplulukları. (Hematoksilen-Eozin X 10)	54
Şekil 4.16. 4 ve 8 haftalık dönemlerde matür kemik oluşumu	55
Şekil 4.17. 4.haftaya ait çalışma gruplarında maturasyon derecelerinin görünümü. A, Kontrol grubunda immatür görünümde yeni kemik oluşumu. B, Grup B’de immatür görünümde yeni kemik oluşumu. C, Grup C’de matür görünümde yeni kemik oluşumu. D, Grup D’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 10).....	55
Şekil 4.18. 8.haftaya ait çalışma gruplarında maturasyon derecelerinin görünümü. A, Kontrol grubunda immatür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 20). B, Grup B’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 20). C, Grup C’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 10). D, Grup D’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 10).....	56
Şekil 4.19. 4 ve 8 haftalık dönemlerde immatür kemik oluşumu.....	57

Şekil 4.20. 4 ve 8 haftalık dönemlerde kemik iliği varlığı	58
Şekil 4.21. Dördüncü haftada Grup C’de kemik iliği oluşumu (Hematoksilen-Eozin X 10)	58
Şekil 4.22. Sekizinci haftada Grup C’de kemik iliği oluşumu (Hematoksilen-Eozin X 10)	59

TABLÖLAR

Tablo 2.1. TZF içindeki büyüme faktörlerinin salınım oranları (ng).....	28
Tablo 4.1. Histopatolojik tüm parametrelerin istatistiksel değerleri.....	60

1. GİRİŞ

Kemik, iskeleti oluşturan ve vücuda destek görevi olan yüksek derecede özelleşmiş bir dokudur ve diğer dokulardan farklı olarak skar bırakmadan iyileşir. Uygun büyüklükte kemik defektleri kendiliğinden ve hızlı bir şekilde iyileşirken, büyük kemik defektleri kendiliğinden iyileşmemektedir. Bu tür kemik defektlerinde, iyileşmeyi kolaylaştırmak, kemik oluşumunu hızlandırmak için kemik greftine ve bariyer membrana ihtiyaç duyulmaktadır. Kemik greftinin temel görevi, yeni kemik dokusu, yumuşak dokular, vasküler ve diğer metabolik bileşenlerin yeniden oluşumu için bir çatı oluşturmaktır.

Kemik defektlerinin onarımı için kullanılan dört temel kemik greft materyali mevcuttur. Bunlar otogreft, allogreft, heterogreft ve alloplastik materyallerdir. Otojen kemik greftleri altın standart olmasına karşın, ikinci bir operasyon gerektirmesi, postoperatif morbiditesi, alınan doku hacminin sınırlı olması gibi dezavantajları da vardır. Otojen greftlere alternatif olarak geliştirilen allogreftler ve heterogreftler yeterli miktarda temin edilebilmesi, uzun süre saklanabilmesi ve ikinci bir operasyon gerektirmemesi gibi avantajlara sahip olmakla beraber, oluşabilecek olumsuz immünolojik cevaplar ile komplikasyonlara da yol açabilmektedirler. Son yıllarda toksik etkisi olmayan ve immünolojik reaksiyon oluşturmayan, kemik dokuya kolaylıkla uygulanabilen alloplastik greft materyalleri geliştirilmeye başlanmıştır. Osteokondüktif özelliğe sahip bu materyaller pasif bir çatı görevi ile kemik defektini doldurmaktadırlar.

Oral ve maksillofasiyal cerrahide özellikle geniş rekonstrüktif cerrahi içeren vakalarda fibröz iyileşme istenmeyen bir durum olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu problemleri önlemek amacıyla yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu tekniği ortaya çıkmıştır. Bu tekniğin amacı bariyer membran kullanarak iyileşme beklenen bölgede iyileşmeyi olumsuz yönde etkileyecek hücreleri bölgeden uzak tutup osteoblastların kemik iyileşmesini sağlamasına olanak tanımaktır.

Bu kullanılan materyallere ek olarak kemik oluşumunun indüklenmesinde büyüme faktörlerinin de etkisi olduğu bilinmektedir. Büyüme faktörleri kemik greftlerine eklendiğinde kemik rejenerasyonu daha hızlı olmaktadır. Büyüme faktörleri hücre proliferasyonunda, farklılaşmasında, kemotaksisinde ve ekstrasellüler matriks sentezinde rol oynamaktadır (1-4).

Son yıllarda hastaların kısa süreli tedavi beklentisini karşılayacak kaliteli kemik iyileşmesi elde etmeye yardımcı ajanlara ihtiyaç duyulmuştur. Büyüme faktörleri, Kemik Morfogenetik Protein (BMP), Trombositten Zengin Plazma (TZP) ve Trombositten Zengin Fibrin (TZF) bu amaçla kullanılan ajanlardan bazılarıdır. Bu amaçla, sadece hastanın kanı alınarak, otolog yolla elde edilen, çok sayıda büyüme faktörü içeren TZF konusunda çalışmalar hızla sürmektedir. TZF Choukroun ve ark. tarafından 2001 yılında trombosit sitokinlerinin ve hücrelerinin hapsediği ve belli bir süre sonra salındığı fibrin matriks olarak tanımlanmıştır (5,6). TZF'nin membran olarak kullanılması gündeme gelmiştir ancak literatürde bununla ilgili yeterince in-vivo çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada, tavşan kalvaryumlarında oluşturulan defektlerde TZF'nin büyüme faktörlerini aşamalı olarak salgılama özelliğinden yararlanılarak greftle kombine ve membran olarak kullanılmasının kemik defektinin iyileşmesi üzerine olan etkisini histolojik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu şekilde mevcut yöntemlere alternatif, biyouyumlu ve daha ucuz bir uygulamanın greftle kombine ve/veya membran olarak kullanılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokular arasında destek görevi olan, iskelet sistemini oluşturup kaslarla birlikte hareketi sağlayan, basınç, çekilme, eğilme ve bükülmelere karşı dayanıklı ve sürekli yıkıma uğrayıp yeniden yapılan dinamik bir dokudur (Şekil 2.1) (7,8).

Kemik mikroskobik olarak incelendiğinde, primer (immatür) kemik ve sekonder (matür) kemik olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Primer kemik dokusu, fetal gelişim, kırık ve tamir sırasında ilk oluşan olgunlaşmamış kemik dokusudur. İçeriğinde çok sayıda osteosit hücre bulunur. Primer kemik dokusu, iyileşmenin ileri evrelerinde ve yetişkinlerde yerini sekonder kemiğe bırakmaktadır (9,10).

Sekonder kemik dokusu lamelli bir yapı gösterir ve her lamelde bulunan kollajen fibriller birbirlerine paraleldir, ama komşu lamellerdekilere çapraz yönde seyreder. Bu özel kollajen fibril seyirleri sekonder kemiğe dayanıklılık kazandırır. Primer kemik dokusu ile karşılaştırıldığında daha kalsifiye, sert ve güçlüdür. Sekonder kemik dokusunda osteositlerin sayıları daha azdır ve komşu lamellerin aralarına sıkışmışlardır ve spongiyoz (süngerimsi, kansellöz) ve kortikal (kompakt, lameller) kemik olmak üzere iki türü vardır (9-12).

2.1.1. Spongiyoz (Süngerimsi, Kansellöz) Kemik

Kısa ve uzun kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ve yassı kemiklerin iç yüzlerinde bulunur. Birbiriyle anastomozlaşan ince kemik trabeküllerinden oluşmuştur. Trabeküllerin aralarında kemik iliği ile dolu, düzensiz şekilli boşluklar vardır. Bunlar kemik iliğinde bol olarak bulunan kan damarlarından, sitoplazma uzantıları aracılığıyla besin maddelerini alırlar (9-12).

2.1.2. Kortikal (Kompakt, Lameller) Kemik

Tüm kemiklerin dış yüzlerinde bulunur. Nonlameller kemikten yeniden yapılanma sonucu oluşur. Yassı kemiklerin iç ve dış tabakalarını, uzun kemiklerin dış yüzünü oluşturur. Kortikal kemiğin ana yapısı “Harvesian sistem” olarak da adlandırılan osteondur. Osteon uzunlamasına dizili vasküler Harvesian kanalları saran silindirik şekilli vasküler kemikten oluşur. Horizontal dizilimli Volkman kanallar komşu osteonları birleştirir. Kortikal kemiğin mekanik gücü osteonların sıkı dizilimine bağlıdır.

Kompakt kemik dokusunda iki türlü kanal bulunur. Bunlar:

- Havers kanalları; kompakt kemiğin uzun eksenine paralel aralıklarla yerleşirler.
- Volkmann kanalları; komşu Havers kanallarını birbirlerine bağlayan yan kollarıdır.

Kemiklerin foramen nutrisyumlarından giren kan damarları, Volkman kanallarından geçerek Havers kanallarına girer ve dallanarak iki yönde seyrederek. Buradan ayrılan yan kollar da daha içteki Volkmann kanallarından geçerek daha derinlerdeki Havers kanallarına girerler ve en son içteki kemik iliği boşluğuna ulaşırlar. Böylece kompakt kemiğin tüm kısımlarına kan damarları ulaşır (9-12).

2.1.3. Kemik zarları

Periosteum, osteojenik potansiyele sahip vasküler bir bağ dokusu tabakasıdır ve eklem yüzeyleri hariç tüm kemiği dıştan çevreler. Dış yüzeyi az miktarda fibroblast kapsayan düzensiz sıkı bağ dokusundan oluşmaktadır. İç yüzeyi kemik yapım ve onarımında aktif olan osteoprogenitör hücrelerden zengindir (10). Periostun yapısında kollajen ve elastik lifler bulunur. Periost kemik dokusuna kollajen Sharpey lifleri ile bağlanmaktadır (13).

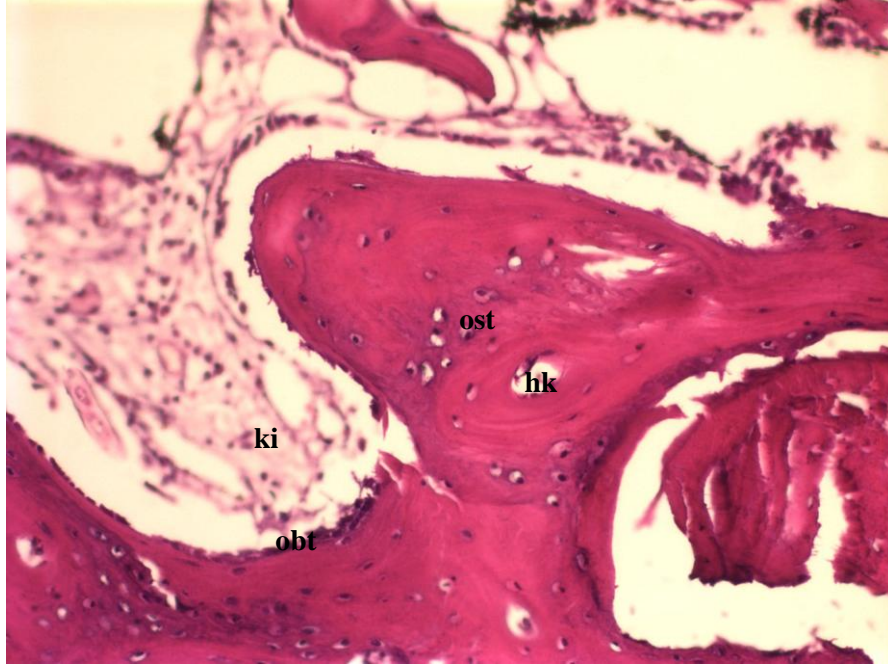
Endosteum tabakası, kemik iliği kavitesini, spongiyöz kemik trabeküllerini ve kompakt kemiğin iç yüzeyini çevreleyen bir retiküler bağ dokusudur. Periosteumdan daha incedir ve tek tabaka osteoprogenitör hücre içerir. Bu hücreler kemik yapım ve onarımında osteoblastlara dönüşmektedirler. Ayrıca hemopoetik hücreleri yapabilme özelliği de vardır (7,13,14).

2.1.4. Kemik Matriksi

Diğer destek dokularında matriks sadece organik bileşenlerden oluşurken, kemik matriksinin %33'ünü organik bileşenler, % 67'sini de inorganik tuzlar (kalsiyum, potasyum, sodyum, magnezyum, karbonat ve fosfat) oluşturur.

Kemik dokusunun organik matriksi kollajen, glikozaminoglikanlar (kondroidin sülfat, keratan sülfat ve hiyaluronik asit) ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Erişkinlerde organik bileşenlerin % 95'i kollajendir ve çoğunlukla tip I'dir. Kollajen sayesinde kemik kolay kırılmaz ve bir miktar esneyebilir. Kollojen fibriller ayrıca hidroksilapatit kristallerinin oluşumu için organik bir çerçeve görevi görür (9, 15-17).

Kemik dokusunun inorganik bileşenleri başta kalsiyum fosfat (%85) olmak üzere, kalsiyum karbonat (%10), kalsiyum florid, magnezyum florid, magnezyum hidroksit ve magnezyum sülfat bileşikleriyle sitrat iyonları ve karbonat iyonlarıdır. İnorganik maddeler kemik dokusuna sertlik kazandırır. Kemikte şekilsiz olarak depolanan kalsiyum fosfat daha sonra hidroksilapatit kristalleri $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ halinde yeniden şekillenir. Kemiğin sertliği inorganik bileşenlerine, dayanıklılığı ve esnekliği ise organik matrikse bağlıdır (7,13).



Şekil 2.1. Kemik dokusunun mikroskopik görüntüsü

2.1.5. Kemik Hücreleri

Kemik dokusunu oluşturan kemik hücreleri osteoprogenitor hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlardır (Şekil 2.2)

2.1.5.1. Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitör hücreler mezenşim kaynaklı, kemik yapıcı, mitozla çoğalabilen öncü hücrelerdir. Kemiklerin zarlarında (periosteum ve endosteum), Havers ve Volkmann kanallarında ve büyüyen kemiklerin metafizindeki kıkırdak matriksinin trabeküllerinde bulunurlar. Kemiklerin normal büyümesinde, kemik yaralanmasında ve kırık tamirinde aktif hale gelerek bölünüp, osteoblast hücrelerine dönüşürler (7,13,14).

2.1.5.2. Osteoblastlar

Kemikleşme bölgelerinde, gelişmekte olan kemiklerin periosteumunun kemiğe temas eden derin bölgelerinde diziler halinde bulunan osteoblastlar kemik oluşumundan sorumlu yüksek metabolik aktiviteye sahip hücrelerdir. Osteoblastlar kemik matriksinin

organik kısmını salgılar. Kalsifiye olmamış bu organik maddeye osteoit denir. Osteoblastlar meydana getirdikleri osteoit içinde gömülü kalırlar. Bu doku kalsifiye olunca osteoblastlar aktivitelerini azaltır, şekilleri basıklaşır ve birer osteosit olurlar (10,12,14,18-20).

2.1.5.3. Osteositler

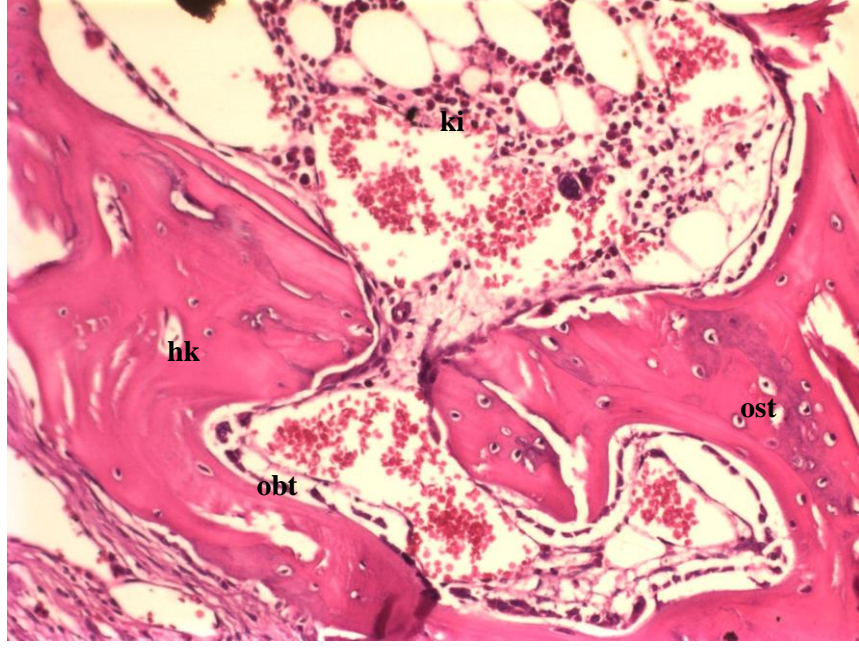
Osteositler, kalsiyum tuzlarının birikmesiyle kalsifiye olan kemik matriksi içinde gömülü kalan osteoblast hücreleridir. Osteositler lakün adı verilen boşluklarda bulunur ve hücrelerinin gövdesi içinde buldukları lakün boşluğunun şekline uyarlar.

Osteositler de, osteoblastlar gibi bölünme gücünü kaybetmiş olan hücrelerdir. Osteositlerin kemiğin diğer hücre tiplerine dönüşebilme özelliği vardır (14,18).

2.1.5.4. Osteoklastlar

Kemik rezorpsiyonundan ve yeniden şekillenmesinden sorumlu çok çekirdekli hücreler olan osteoklastlar, monositlerin birleşmesiyle meydana gelir.

Özellikle kemik yıkımının olduğu bölgelere yakın bulunan, 20-100 mm çapında ve 50'ye yakın çekirdeği olabilen dev hücrelerdir. Çekirdekler daha çok hücrenin dış yüzeyine yani düzgün hatlı kısmına yakın yer alırken, kemiğin yıkımından sorumlu olan tarafta hücre zarı girintili ve çıkıntılı bir hal alır. Buraya dantel kenar adı verilir. Osteoklastların yer aldığı kemik yüzeyindeki sığ çukurlara Howship çukurları adı verilir (16,18).



Şekil 2.2. Kemik hücrelerinin mikroskopik görüntüsü

2.1.6. Kemik Oluşumu

İki tip kemik oluşumu vardır. Kemik oluşumu, doğrudan bağ dokusunda gerçekleşiyorsa buna zarlararası kemikleşme “intramembranöz kemikleşme”; önceden bulunan kıkırdak dokusu içerisinde gerçekleşiyorsa buna da “endokondral kemikleşme” adı verilir.

Kemik remodelasyonu, osteoblastlar tarafından kemik yapımı ve osteoklastlar tarafından kemik yıkımı ile karakterize bir süreçtir. Bu iki aktivite sistemik olarak hormonlar ve lokal olarak sitokin ve büyüme faktörleri tarafından düzenlenmektedir (21).

2.1.6.1. Zarlararası Kemikleşme (İntramembranöz Kemikleşme)

Frontal, parietal, oksipital ve temporal kemikler gibi kafatasının bazı yassı kemikleri ile mandibula ve maksillanın bazı kısımları bu tür kemikleşme ile meydana gelir. Bu yolla kemiğin oluşacağı bölgelerde mezenkim hücreleri yoğunlaşarak, uzantılarıyla birbirleri ile ilişki kurarlar. Kan damarları yönünden de zengin olan bu bölgede hücrelerin arasındaki boşluklar ince kollajen fibril demetleriyle doldurulur. Bu

bölgede bulunan elemanların düzenlenmesi birkaç tabaka zara benzeyen yapıların oluşmasına neden olur. Kemik oluşumunun ilk işareti, yoğun eozinofil matrikste ince ipliksi yapıların görünmesidir. Kemik matriksindeki bu ince ipliksi yapılar yanı başlarındaki kan damarlarına eşit uzaklıkta birikmeye başlarlar. Damarlar bir ağ oluşturduğundan, ilk oluşan trabeküller de dallanan ve birbiriyle anastomozlaşan bir yapı meydana getirirler. Hücre dışı eozinofilik matrikste kendi kendine oluşan bu ilk şekillenme yanında, civardaki bağ dokusu hücrelerinde de değişiklikler görülmeye başlar. Trabeküllerin yüzeyinde toplanan bu hücreler yavaş yavaş genişleyip büyümeye başlar. Hareketsiz halde kübik veya silindirik olan bu hücreler birbirleriyle çok kısa uzantılarıyla haberleşirler. Boyut ve yapılarındaki sıralı değişikliklerle, hücreler yoğun olarak bazofilik bir karakter kazanır ve sonunda osteoblast haline dönüşür. Osteoblastların bu zara benzeyen yapılar arasında kemik matriksini oluşturacak maddeleri sentezleme ve salgılama işlevi sürerken osteoit birikimide artar. Böylece trabeküller hem daha uzun, hem de daha kalın olur (21,22,23).

Kollajen molekülleri matriksin proteoglikanlarıyla birlikte salgılanır. Hücre dışında, polimerize olan bu fibriller kemik matriksindeki trabeküllerin her tarafında bol miktarda yer alıp ağısı bir yapı oluştururlar. Kollajen fibrillerin her yöne seyrettiği bu ilk ağımsı yapıdaki kemik, bu görünüm itibarıyla örgüye benzer. Bu yüzden bu kemiğe dokuma kemiği de denir. Lamelli kemikte ise kollajen fibriller çok düzgün paralel ve ışımsal demetler oluşturur.

Kemik matriksini sentezleyip dışarı veren osteoblastlar, bir süre sonra bu materyal içinde hapsolüp kalırlar ve böylece kemik dokusunun olgun hücreleri olan osteositleri oluştururlar. Yeni birikmekte olan matriks içindeki lakünlerde yerleşen osteositler kemik yüzeyindeki osteoblastlarla çok ince uzantıları aracılığıyla ilişki kurar. Kemik kanalcıkları, bu hücrelerin uzantıları etrafında matriks birikimi ile oluşur. Trabekül yüzeyindeki osteoblastların kemiğin içine girmesiyle birlikte sayılarında görülen azalma, civardaki bağ dokusunu farklılaşmamış hücrelerinden yeni osteoblast oluşması ile telafi edilir. Bu öncül hücrelerde mitoz bölünme oldukça sık görülürken, osteoblastlarda pek rastlanmaz (18-22).

2.1.6.2. Enkondral (endokondral) kemikleşme

Endokondral kemikleşme kafatasının alt kısmı, omurga, pelvis, kol ve bacaklardaki kemikler ile mandibulanın bazı kısımlarında görülmektedir. Hiyalin kıkırdak modelin merkezindeki kondrositlerin hipertrofiye ve yıkıma uğraması sonucu, dejenere olan kondrositler tarafından bırakılan lakünalara osteoprogenitör hücrelerin ve kan kapillerlerinin penetrasyonu görülmektedir. Osteoprogenitör hücreler de osteoblastlara dönüşmekte ve primer kemik dokusunu oluşturmaktadır (18-22).

İntramembranöz veya endokondral her iki kemikleşme ile oluşan kemik dokusu başlangıçta primer kemiktir.

2.1.7. Kemik iyileşmesi süreci

Kemik tamirden çok rejenerasyonla iyileşen ayrıcalıklı bir dokudur ve birçok biyokimyasal, fizyolojik, biyomekanik, hücrel ve hormonal süreçler tarafından etkilenir. Rejenerasyonla iyileşme oluşan yeni dokunun doğal dokudan yapısal ve fonksiyonel olarak ayırt edilemediği bir iyileşme türüdür. Doku tamiri ise bütünlüğü bozulmuş dokunun fibrotik skar dokusuyla iyileşmesidir. Oluşan bu skar dokusu doğal dokudan daha az hücrel birleşim içermektedir. Karaciğer ve kemik haricindeki dokular rejenerasyonla değil tamirle iyileşmektedir (23).

Hücrel düzeyde doku iyileşmesinin hızı ve kalitesi içerdiği dokuların hareketli, stabil ve kalıcı olup olmamasıyla ilgilidir. Hareketli hücelere örnek olarak epidermisdeki keratinositler ve oral mukozadaki epitelyal hücelere hayatları boyunca bölünmeye yatkındırlar. Stabil hücelere örnek olarak fibroblast düşük hızda duplike olurken yara cevabı olarak hızla proliferer olurlar. Örneğin kemik yaralanması sonucu pluripotent mezenkimal hücelere osteoblast ve osteoklastlara hızlıca farklılaşırlar. Kalıcı hücelerden sinir ve kalp kası postnatal yaşam boyunca bölünmezler (23).

Kemik iyileşmesi yara iyileşmesi gibi 3 evrede incelenir: erken inflamatuvar dönem, onarım dönemi, yeniden yapılanma dönemi (remodeling). Evreleri birbirinden

zaman olarak kesin sınırlarla ayırmak güçtür ve her evre daima kendinden bir önceki veya bir sonraki evre içinde bulunur.

Birincil kırık iyileşmesi, rijit internal fiksasyondan sonra görülür ve belirli bir dış kallus oluşmadan sadece iç kallusla devam eden temas iyileşmesidir. Kırık kapalı yöntemle tedavi edilirse, ikincil kırık iyileşmesi meydana gelir ve evrelere bölünebilir. Histolojik görünümüne göre yapılan sınıflamalarda genel olarak aynı bulgular kabul edilip benzer evrelemeler yapılmıştır (18,23).

2.1.7.1. Enflamatuar faz

Enflamatuar faz genellikle 3-5 gün sürer. Yaralanan damarlarda doku cevabı olarak spontan vazokonstriksiyon meydana gelir. Doku travması ve lokal kanama iyileşme basamaklarını oluşturan komplement, plazminojen, kinin ve pıhtılaşma sistemini başlatan Faktör 12' yi (Hageman faktör) aktiveleştirir. Damarda dolaşan trombositler hızlıca yaralanan bölgede kümeleşirler ve kanda dolaşan diğer trombositlerinde yapışmasını sağlarlar ve trombosit pıhtısını oluştururlar. Pıhtı hemostazı sağlamlaştırır ve geçici bir matriks oluşturarak hücrelerin yara alanına migrasyonunu sağlar. Ek olarak bu pıhtı kemik iyileşmesi için önemli bir çok faktör için rezarvuvar özelliği taşır. İçerdiği sitokinler ve Dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) hücre proliferasyonu ve farklılaşmasında önemli rol oynar ve doku iyileşmesi basamaklarını başlatır ve düzenler (18,23).

Hemostaz reaktif vazokonstriksiyonla kontrol altına alındıktan sonra histamin, prostaglandin, kinin mediatörlerinin uyarması ile damarlarda vazodilatasyon başlar. Artan damar geçirgenliği kan plazma ve diğer hücrel mediatörlerin damar dışına geçişine izin verir. Bu aşamanın klinik yansıması şişlik, kızarıklık, ısı artışı ve ağrıdır.

Yara alanındaki sitokinlerin salınımı nötrofil ve monositlerin yara alanına kemotaksisini uyarır. Nötrofiller doku bütünlüğü bozulduktan bir kaç dakika içinde yara alanına göç ederler ve predominant hücre grubunu oluştururlar. Fibrin pıhtı içindeki

sitokin ve büyüme faktörleri lökositlerin kemotaksisini uyararak lökositler için iskelet oluşturur. Lökositler yara alanındaki bakterileri, devital dokuları ve degrade matriks bileşenlerini temizlerler. Eğer yara alanı büyük ölçüde enfekte ise nötrofil infiltrasyonu bir kaç gün daha devam eder ve Tümör öldürücü faktör α (TNF- α) ve interlakün 1a ve 1b'yi salarak enflamatuvar fazın uzamasını sağlar (23).

Nötrofillerin azaldığı dönemde monositler yara alanına gelip aktive olup makrofaj adını alırlar. Kırık uçlarında bozulan dolaşıma bağlı, kemik dokuda daha geniş olmak üzere nekroz bölgesi oluşur. Ortama gelen nötrofiller ve makrofajlar hasarlı dokuyu ortadan kaldırırlar. Nötrofillerin başlattığı mikro debridmanı devam ettirirler. Kollejenaz ve elastasaz salgılayarak yaralanmış dokuyu yıkıp, bakteri ve hücre artıklarını fagositoz ederler. Makrofajlar iyileşme mediatörlerinin birincil kaynağıdır. Aktive olduğunda makrofajlar büyüme faktörleri ve sitokinlerin salınımını gerçekleştirerek (TGF- α , TGF- β 1, PDGF, insulin-like growth factor [IGF]-I and -II, TNF- α , and IL-1) yara yerinde daha önceden degranüle edilen trombosit ve nötrofillerden salınan büyüme faktörü ve sitokinlerinin etkinliğinin artarak devam etmesini sağlar. Makrofajlar erken yara iyileşmesinin bütün fazlarında lokal doku remodelingini düzenleyerek etkili olurlar. Thrombospondin-1 ve IL-1b gibi sitokinleri salgılayarak yeni ekstrasellüler matriksin oluşumunu ve anjiogenezisi stimule ederler. Makrofajlar doku iyileşmesi tamamlanana kadar varlıklarını sürdürürler (20). Kırık bölgesindeki hematoma 48 saat içinde organize olup fibrinden bir yapı oluşturur. Nötrofiller ve makrofajların yardımı ile fibrin matriks oluşur. Fibrin matriks içindeki öncü hücreler, lokal biyolojik etkilerle değişik dokuları oluşturmak için farklılaşmaya hazırdır.

2.7.1.2. Onarım fazı

Onarım fazı yaralanmadan 3 gün sonra başlar üçüncü haftaya kadar devam eder. Onarım mekanizmasında rol oynayan hücreler mezanşimal kökenli çok yönlü gelişim gücüne sahip (pluripotent) hücrelerdir. Çoğunlukla kırık veya defekt bölgesindeki granülasyon dokusunun içinden, ayrıca periosteumun osteojenik tabakası ve daha az olarak endosteumdan köken alırlar. Bu hücreler farklılaşmaya başladığında, ilk

değişikliğe uğrayan hücreler, kılcal damarlarla hematoma içine giren fibroblastlardır. Üçüncü günde kırık uçlarında, yoğun mezanşimal hücre mevcudiyeti vardır. Bu hücreler kırık parçaları arasında yumuşak bir granülasyon dokusu oluşturur. Periyosteal ve endosteal osteojenik hücrelerle, fibrin matriksteki fibroblastların çoğalıp farklılaşmasıyla, bu granülasyon dokusu oluşur. Fibroblastlar kollajen sentezlerken, kondroblastlar kollajen ve glikozaminoglikan, osteoblastlar ise osteoidi salgırlar. İyileşen kemiğin gerilmeye karşı dayanıklılığı, içerdiği kollajen içeriğiyle yakın ilişkilidir. Takiben mineralizasyon olur ve kırık hattı bölgesi ve çevresinde yumuşak kallus gelişir. İlk 4-6 haftalık süre içinde oluşan bu kallusun harekete karşı direnci düşüktür (23,24).

Kırık iyileşmesinin ilk dönemlerinde periosteal damarlar, geç dönemdeyse besleyici (nutrisyen) damarlar, kılcal damar tomurcuklanmasına yardımcı olur. Sonuçta kallus ossifiye olur ve kırık yüzleri arasında nonlameller kemik köprüsü oluşturur. Eğer uygun immobilizasyon yapılmazsa kallus ossifikasyonu yeterince oluşamaz, instabil fibröz birleşme gelişebilir. Periosteumun hasar görmesi ya da ortamdaki uzaklaştırılması kırık iyileşmesini yavaşlatır (25).

2.7.1.3. Yeniden şekillenme fazı

Kallus, olgun kemik ile yer değiştirmeye başlar. Mekanik kuvvetlerin önem kazanmaya başladığı bu dönemde trabeküller fonksiyonel gereksinimlerini karşılayacak şekilde düzenlenir (26).

Kemiğin şekillenmesi en uzun evre olup, aylar hatta yıllar sürebilir. Bu evre güçlü ama düzensiz sert kallusun, normal veya normale yakın güçteki daha düzenli lameller kemiğe dönüşümüdür. Onarım evresinin ortasında başlayıp, normalde insanlarda 4-16 hafta sürerken, yıllar boyunca da devam edebilir.

Yeniden şekillenme evresinde 4 olay gerçekleşir:

1. Kalsifiye kırıkta, osteoid dokuyla değişerek bir çeşit birincil trabeküler

doku oluşur.

2. Lameller kemik bu dokunun yerini alır.
3. Kompakt kemik uçlarındaki kallus, lameller kemikten yapılmış ikincil osteonlara değişir. Lameller kemik, kas kuvveti ve mekanik streslere paralel olarak düzenlenmiş osteonlardan oluşur.
4. İlik kanalı dereceli olarak yeniden şekillenir. Kanal içindeki kallus, osteoklastlar tarafından geri emilir ve boşluklar yeniden düzenlenir (27).

2.2. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Uygulanan Greft Materyalleri

Transplante edilen ve transplante edildiği dokunun bir parçası olması beklenen doku 'greft' olarak bilinmektedir. Kemik greftleri defekt bölgesini doldurmak, yapısal destek sağlamak ve defektli görünümü düzeltmek amacıyla kullanılır.

Kemik dokusunun kemik rejenerasyonu ile iyileşme özelliğine sahip olması, kemik dokusunu greftlemeye uygun kılar (28).

Yapılan çalışmalarla kemik greftlerinin biyolojik paterni ve başarıyı optimal kılmak için gereken özellikler araştırılmıştır. Her ne kadar otojen kemik greftleri kraniofasiyal rekonstrüksiyonda altın standart olsa da son yıllarda daha az invaziv yöntemler olan osteoindüktif faktörlerin kemik greftleriyle kombine uygulanması gündeme gelmiştir (28,29).

Kraniyofasiyal ve maksillofasiyal deformitelerin ve defektlerin tedavisinde çeşitli greftler kullanılmaktadır. İdeal kemik grefti; osteogenezisi uyarmak için osteoindüktif olmalıdır, kan damarlarının ve osteojenik potansiyeli olan hücrelerin büyümesi için optimal şartları oluşturmak üzere bir çatı oluşturmalı ve immunolojik reaksiyona neden olmamalıdır (30).

2.2.1. Kemik greftlerinin tarihçesi

Kemik defektini tamir etmeye yönelik ilk rapor MÖ 2000'de Edgar Smith tarafından papirus yazması olarak bulunmuştur (29). O tarihlerde rekonstrüksiyon için metal kullanılmaktaydı. İlk kemik grefti 1668'de Van Meekren tarafından bir rus askerine köpek kalvaryasından ksenogreft alınarak uygulandı (31). 1867'de Ollier kemik greftlerinde periostu korumanın önemini vurguladı (32). Barth kemik greftlerinde periostun faydasının olmadığını savundu ve kortikal kemik greftlemesinden sonra iyileşmenin önce rezorpsiyonla başlayıp ardından yeni kemik üretildiğini savundu. Barth bu iyileşmeye deformasyon yer değiştirmesi adını verdi (33). Günümüzde ise kemik greftlerinde osteoblastik aktiviteyi stimule etmede büyüme faktörleri ve indüktif faktörlerin etkinliği araştırılmaktadır (28).

2.2.2. Kemik grefti fizyolojisi

Kemik grefti iyileşmesi kemik iyileşmesi ile benzerdir. Axhausen öncelikli olarak kemik iyileşmesini tanımlamış ve iki faza ayırmıştır.

Faz 1: İlk aşama hücrel proliferasyonu ve düzensiz bir şekilde osteoid oluşumunu içerir (23,34). Bu aşamadaki kemik rejenerasyonu greftleme prosedürü sırasında canlı kalan transplante edilmiş hücre sayısına bağlıdır (33). Bu hücrelerin canlı kalması tamamıyla alıcı bölgeden beslenmesine bağlıdır (23,34).

Faz 2: İkinci aşamada osteoid rezorbe olur ve daha organize lameller kemikle yer değiştirir, fibroblastlar ve mezenşimal hücreler osteoblastlara dönüşür ve yeni kemik oluşumu başlar. İkinci aşama ikinci haftada başlar (23,34)

Kemik rekonstrüksiyonu fizyolojik seviyede üç aşamanın kombinasyonu ile başarıya ulaşır:

- Osteogenezis,
- Osteokondüksiyon,

- Osteoindüksiyon.

2.2.2.1. Osteogenezis

Osteogenezis osteokompotent hücreler (kemik dokusu oluşturma yetisi olan hücreler) tarafından yeni kemik oluşmasıdır. Yeni kemik üretebilmek için sağ kalan osteojenik hücreler gerekir. Osteogenezis transplante edilen kemik dokudaki osteojenik hücrelerin osteoid üretme kapasitelerini korumasıyla ilgilidir (35). Bu özelliklere sahip mevcut olan tek greft materyali otojen kemik greftidir.

2.2.2.2. Osteokondüksiyon

Kemik greftleri başlangıçta parsiyel olarak nekroze olur, ardından enflamatuar aşama görülür. Bu dönemde greftin büyük bir bölümü kan damarlarından gelen osteoklastlar ve osteoblastlar arasındaki ilişkiye dayanarak yeni kemikle yer değiştirir. Bu kan damarı invazyonu ve greftin yeni kemikle yer değiştirmesi osteokondüksiyon olarak adlandırılır. Osteokondüksiyonda greft yeni kemik formasyonu için iskelet görevi görür (22).

Alıcı yumuşak doku ve kemik yatağındaki cerrahi harabiyetten dolayı transplantasyondan hemen sonraki kısa dönemde greft etrafında hematoma formasyonu görülür. Bu dönemde plazmatik emilim yüzünden greft üzerindeki çok az hücre hayatta kalmayı başarır (36,37). Hematom yüzeyinde enflamatuar mekanizma başlar ve 5-7 günde sonlanır. Enflamatuar doku greft etrafında yoğun fibrovasküler dokuya dönüşür ve vasküler invazyon 10-14 günde oluşur (38). Vasküler invazyonla birlikte osteojenik potansiyeli olan yeni hücreler grefte doğru proliferasyon olur (39). Bu proliferasyonda greft materyali yeni hücre göçünü yönlendiren bir matris gibi davranır. Osteoblastlar yeni kemik üretirken osteoklastlar nekrotik materyali rezorbe ederler ve vasküler dokunun kemik yapıya penetre olabildiğini sağlarlar (28).

2.2.2.3. Osteoindüksiyon

Transplante edilmiş greftten salgılanan faktörlere (örneğin BMP) bağlı olarak osteoindüksiyon fazı gerçekleşir. Konakçıdaki osteoprogenitör hücreleri stimule ederek yeni kemik formasyonuna katkı sağlanır. Osteoindüksiyonun 3 fazı olduğu kabul edilir, bunlar; kemotaksis, mitozis ve diferansiasyondur. Kemotaksiste indüktif faktörler osteojenik hücrelerin aktivitesini ve göçünü yönlendirirler. Daha sonra indüktif faktörler osteoprogenitör hücrelerin mitojenik aktivitesini stimule ederler ve matür hale diferansiasyonlarını uyarırlar. Bu matür (örneğin osteoblast) hücreler osteoid üreten hücrelerdir. Daha sonra matür hücreler revaskularize olur ve yeni kemikle birleşirler (28).

2.2.3. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Greft Materyallerinin Sınıflandırılması

Greft materyallerini Jablanski (1982) ve Boyne (1984) immünolojik orjinlerine göre sınıflamıştır (40,41). Bu sınıflamaya göre:

1. Otojen Greftler (Otogreftler)
2. Homojen Greftler (Homogreftler)
 - a. Allojen Greftler (Allogreftler)
 - b. İzojen Greftler (İzogreftler)
3. Heterojen Greftler (Heterogreftler, Ksenogreftler)

Ayrıca yapay yoldan elde edilen, kemiğin inorganik yapısına benzeyen sentetik greft materyalleri (alloplastik greftler) de vardır. Kullanımları kolay olan ve kemiğin inorganik yapısına benzeyen sentetik olarak üretilen alloplastik greft materyalleri diğer greft materyallerine alternatif olarak kullanıma girmiştir.

2.2.3.1. Otojen Greftler (Otogreftler)

Otojen greftler dokunun aynı bireyde bir yerden başka bir yere transferini ifade eder (16, 42). Otogreftler immünolojik olarak uyumlu osteoblastların ve kemik

morfojenetik proteinlerinin varlığında osteoblastlara dönüşebilen mezenşimal hücreleri içerdiğinden kemiklerin rekonstrüksiyonunda sıklıkla tercih edilmektedir ve altın standart olarak kabul edilmektedir (28). Dezavantajları (42,43);

- Morbiditede artış.
- Alınabilecek otojen kemik greftinin miktarın sınırlı olması.
- Donör saha morbiditesi.
- Greftin elde edilmesi için başka bir operasyon sahasının gerekliliği.
- Operasyon süresinin uzaması.
- Bazı operasyonlarda genel anestezi gerekmesidir.

2.2.3.2. Homojen Greftler (Homogreftler)

Homojen greftler aynı tür canlıdan alınan greft materyalleridir.

- İzogen greftler (izogreftler); aynı türden ve genetik benzerliği olan bireylerden alınan homogreftlerdir (44).
- Allojen greftler (allogreftler); aynı türden olan fakat hiçbir genetik benzerliği olmayan bireylerden alınan homogreftlerdir (44). Genetik benzerlik olmadığı için doku reddini önlemek amacıyla grefte çeşitli uygulamalar yapılmaktadır (23,34). Bu uygulamalar; kaynatma, kuru ısıtma, radyasyon, kuru dondurma, deproteinize etme, dondurma olarak sıralanabilir (23). Son zamanlarda en çok kullanılan allojenik kemik grefti kuru dondurulmuş greftlerdir (28). Grefte yapılan uygulamalar nedeniyle greftteki ostoejenik hücreler yok edilir, bu yüzden allojenik greftler faz 1 osteogenesisine katılmaz. Bu tür greftlerin osteogenesisine katkısı pasiftir, faz 2 osteogenesisi için sert doku matriksi oluşturur (28,34):

2.2.3.3. Heterojen Greftler (Heterogreftler – Ksenogreftler)

Başka tür bir vericiden alınan greftlerdir (23,34). Bu greftlerin antijenik farklılığı allogreftlerden çok daha fazladır, bu nedenle daha güçlü uygulamalar yapılmalıdır. Heterogreftler oral ve maksillofasiyal cerrahi işlemlerde nadiren kullanılmaktadır (34).

2.2.3.4. Sentetik Greft Materyalleri (Alloplastlar)

Otojen greftlerin morbiditesi ve allogreftlerin dezavantajları nedeniyle alternatif olarak kemiğin inorganik yapısına benzeyen sentetik kemik materyalleri üretilmiştir. Kolay elde edilebilirlik gibi avantajlarının yanında yabancı cisim reaksiyonu göstermek gibi dezavantajları vardır. Sentetik greft materyalleri başlıca biyoaktif camlar, kalsiyum sülfat, hidroksiapatit kristalleri, beta trikalsiyum fosfat ve bifazik kalsiyum fosfat içermektedirler (23). Sentetik kemik greftlerinden biri olan bifazik kalsiyum fosfat grubunda olan HA/TCP karışımı son zamanlarda kullanımı artmıştır. Bu karışım, daha stabil bir faz olan HA'in optimum dengesine ve daha eriyebilir olan TCP'ca belirlenmektedir. Bu madde eriyebilir ve vücutta basamaklı olarak ayrışır. Ayrıca ortama CA ve P iyonları salmasıyla yeni kemik oluşumuna da öncülük eder. Bu erimenin miktarı TCP/HA oranına bağlıdır. Karışımındaki HA ne kadar azsa erime tersine o kadar yüksek olmaktadır. Bifazik kalsiyum fosfatlar saf HA'e göre biyolojik olarak daha aktiftirler. En büyük özellikleri konak kemikle güçlü bir bağlanma yapması ve fibröz dokunun oluşumuna izin vermemesidir.

2.3. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu

Buser ve ark. ilk olarak 1993 yılında yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunu, kemik agumentasyonunu bariyer membranla desteklemek olarak tanımlamıştır (45).

Bir çok membran sistemi rezorbe olan ve olmayan olmak üzere son yıllarda kullanılmaya başlanmıştır. Rezorbe olan sistemler ikincil bir cerrahi gerektirmediğinden ve daha az bakteri kolonizasyonu gösterdiğinden tercih sebebidir (46).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda amaç mekanik bariyer sayesinde fibroblastları defekttten uzak tutarak osteoblastların kemik iyileşmesini sağlamasına olanak tanımaktır (47).

Kemik içi bir yaraya fibroblastların invaze olması non-union ile sonuçlanabilir. Fibröz dokunun sebep olduğu non-union istenmeyen bir durumdur. Non-union fibroblastik hücrelerin, pıhtıda, osseoz hücrelerden daha önce organize olmasıyla oluşmaktadır. Bu durumun nedeni yara iyileşmesinde fibroblastların osteoblastlara göre migrasyon hızının daha fazla olmasıdır (47,48).

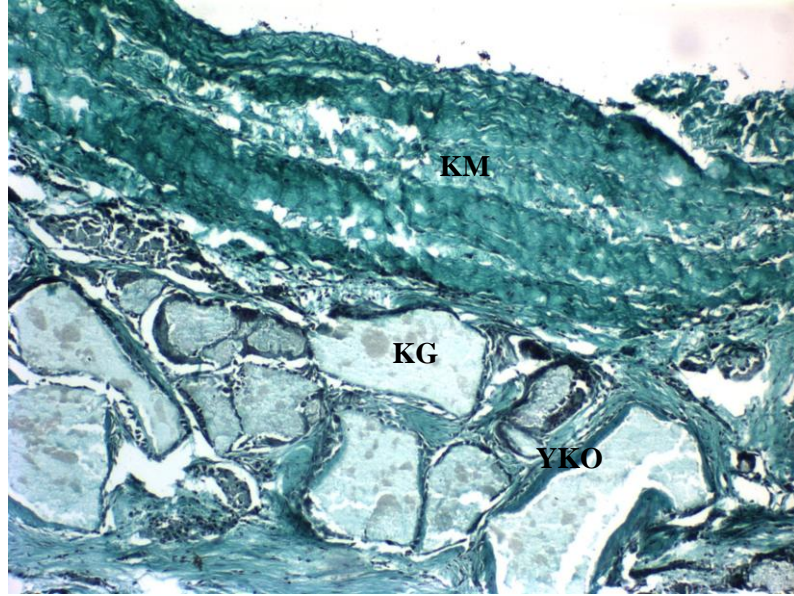
Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılan membranlar çalışmamızda olduğu gibi greftlerle birlikte kullanılabilir. Buradaki amacımız membranın doku içine çökmesini engellemek ve dolayısı ile daha fazla kemik rejenerasyonu sağlamaktır (Şekil 2.3) (49).

YDR tekniğinin tarihsel gelişimi boyunca çeşitli materyaller kullanılmıştır. Bariyer membran olarak kullanılacak materyallerin bazı ortak özellikleri bulunmaktadır. Bu özellikler uygulanmasının kolay olması, epitel ve bağ dokusu hücrelerinin geçişi için bariyer özelliğinin olması, stabil olması, toksisitesinin olmaması, doku için bir iskelet oluşturabilmesi, yapısı üzerinde bakteri birikmesi için uygun bir ortam olmamasıdır.

Kollajen membranlar genelde tip 1 ve 3 olup sığır veya domuzdan elde edilir (50). Taguchi ve ark. kollajenin osteogenezise etkisini göstermiştir. Kollajen membranın mekanizması tam olarak açık olmamakla birlikte, osteojenik farklılaşmaya yol açan osteoindüktif faktörler için bir yatak görevi gördüğünü belirtmişlerdir (51).

Günümüzde doku mühendislerinin amaçlarından biri periosteal hücrelerin büyümesine olanak sağlayacak rezorbe olan membranlar üretmektir. Genelde bu membranlar sentetik veya doğal materyallerden köken almaktadır. Bu amaçla vital fibrininin periosteal ve kök hücreler için iskelet oluşturabileceği düşünülmektedir. Biyouyumlu, rezorbe olan, yara iyileşmesinde önemli rol oynayan, sadece hemostaz değil anjiogenezisde rol alan ve yeni doku oluşumundan sorumlu olan fibroblast ve

endotelial hücrelerin migrasyonu için matriks görevi gören fibrinin bu amaçla kullanımı gündeme gelmiştir (52).



Şekil 2.3. Kollajen membran ve kemik grefti kullanılarak yapılan yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda yeni kemik oluşumu

2.4. Trombositten Zengin Fibrin (TZF)

Trombosit içerikli biyomateryallerin maksillofasiyal cerrahide yara iyileşmesinde kullanımı ilk olarak Whitman tarafından 1997 yılında açıklanmıştır (56). Yara iyileşmesi çok sayıda hücre içi ve hücre dışı mediatörlerin rol aldığı bir olaydır. Sert ve yumuşak doku iyileşmesini optimize etmek ve hızlandırmak için klinik uygulamalarda trombosit konsantrasyonları kullanılmaktadır. Trombositler yüksek miktarda Trombosit kökenli büyüme faktörü-AB (PDGF-AB), Dönüştürücü büyüme faktör- β 1 (TGF- β 1), Dönüştürücü büyüme faktör- β 2 (TGF- β 2), Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), Fibroblast büyüme faktörü (FGF), İnsülin benzeri büyüme faktörü (IGF) gibi hücre proliferasyonunu, matriks remodelingini ve anjiogenezisi stimule eden büyüme faktörlerinden yüksek miktarlarda içerir (53-55,57-59).

Trombosit konsantratlarının hazırlanmasında değişik yöntemler mevcuttur. Farklı yöntemlerle elde edilen trombosit konsantratlarının içeriği de farklıdır. Buna göre trombosit konsantratları lökosit ve fibrin içerikleri göz önünde bulundurularak 4

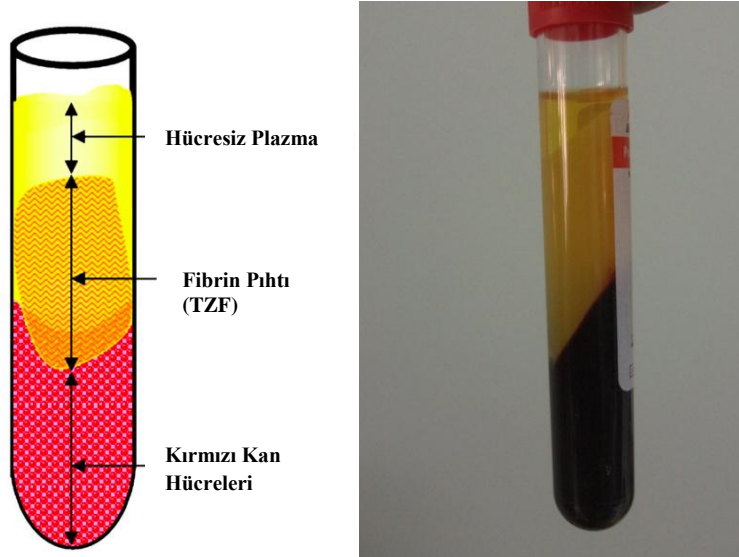
kategoriye ayrılmıştır (57):

- Saf trombositten zengin plazma (P-TZP)
- Lökosit ve trombositten zengin plazma (L-TZP)
- Saf trombositten zengin fibrin (P-TZF)
- Lökosit ve trombositten zengin fibrin (L-TZF)

TZP hazırlama yöntemi TZF hazırlama yöntemine göre daha uzun sürmektedir. Alınan kan antikoagülan içeren tüplere yerleştirilir ve takiben santrifüj edilir. Santrifüjün ilk basamağında kan 3 tabakaya ayrılır; tabanda kırmızı kan hücreleri, ortada trombositlerin çoğunlukta olduğu parlak kısım ve en üstte trombositten fakir plazma oluşmaktadır. İkinci basamakta, elde edilen trombosit konsantrasyonu, trombosit aktivasyonunu ve fibrin polimerizasyonunu tetiklemek için trombin ve/veya kalsiyum klorit (veya benzer faktörler) ile birlikte bir enjektör ile cerrahi alana uygulanır (57). Trombositler trombin veya kalsiyum klorit kullanılarak aktive edildiğine büyüme faktörleri salınmaktadır. Büyüme faktörlerinin etki etme süresinin limitli olmasından dolayı, bir anda salınan büyüme faktörleri yara iyileşmesine sadece bir anda etki etmekte ve uzun dönemde kemik ve yumuşak doku rejenerasyonuna etki göstermeye devam etmemektedir (60).

TZF ise bu protokollerin en son geliştirilenidir ve ikinci nesil trombosit konsantrasyonudur. İlk olarak Choukroun ve ark. tarafından oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılmak üzere, 2001 yılında trombosit sitokinlerinin ve hücrelerinin hapsediği ve belli bir süre sonra salındığı fibrin matrisi olarak tanımlanmıştır (61). Burada, kan herhangi bir antikoagülan olmadan alınır ve hızlı bir şekilde santrifüj edilir. Doğal bir koagülasyon süreci oluşur ve kana herhangi bir biyokimyasal ajan uygulanmadan L-TZF kolayca toplanır. Bu yöntem büyüme faktörleri ve sitokinleri salınmak üzere fibrin ağda hapseden en basit ve maliyeti en düşük yöntemdir (57,58). TZF elde etme protokolünde, hastadan alınan 10 ml lik kan örneği antikoagülan içermeyen tüplere konularak 3000 rpm hızda 10 dakika veya 2700 rpm hızda 12 dakika santrifüj edilerek hazırlanmaktadır (62). Tüplerde antikoagülan olmadığından bir kaç dakika sonra kan örneğindeki trombositler tüp duvarlarına teması sonrası aktive olup

koagülasyon basamakları gerçekleşir. Başlangıçta tüpte fibrinojen bol miktarda bulunurken, ilerleyen dakikalarda trombin fibrinojeni fibrine dönüştürür. Fibrin pıhtı daha sonra kırmızı kan hücreleri ve asellüler plazmanın ortasında oluşur (57,58) (Şekil 2.4). Diğer trombosit konsantratlarında oluşan trombositten zengin tabaka uygulandıktan sonra hızlıca ortadan kaybolan zayıf fibrin yapıdan oluşurken TZF’de oluşan tabaka uygulandığı ortamdan hızlıca rezorbe olmayan ve sağlam yoğun bir fibrin matrikstir. Bu özellikleri de göz önüne alındığında TZF’nin hazırlaması ve manipülasyonu zahmetsiz olmakla birlikte diğer trombosit konsantrasyonlarına nazaran fibrin yapısındaki üstünlükleri göz ardı edilmemelidir.



Şekil 2.4. 3 Katman halinde oluşmuş TZF örneği

Fibrin matriks teorik olarak bol miktarda trombosit içermektedir. TZF hazırlanmasında antikoagülsüz tüplere alınan kanın hızlı alınması gerekmektedir. Eğer kan alımı ve sentrifüj cihazına yerleştirmek hızlı yapılmazsa kan örneği tüp içinde pıhtılaşır böylece TZF elde edilemez. Antikoagulan içermeyen tüplerde, hiç bir katkı maddesi ekmeden oluşan polimerizasyon doğala yakın ve yavaş gerçekleşmektedir. Bu sayede fizyolojik yapısı güçlü TZF membran elde edilmiş olur (62). Standart 10 ml enjektörle alınan kanın santrifüjüyle elde edilen TZF içeriğinde kanda bulunan trombositler, trombosit büyüme faktörleri, lökositler, sitokinler, fibrin (fibrinojenin aktifleşmesiyle oluşan) ve dolaşımdaki kök hücreler bulunmaktadır (62).

2.4.1. Trombositler

Kemik iliğindeki megakaryosit hücrelerden köken alan trombositler disk şeklinde ve çekirdeksiz hücrelerdir. Ömürleri 8-10 gündür, aktive edildiğinde salınmak üzere sitoplazmaları granüllüdür. Alfa granül trombositte spesifik (β -tromboglobulin gibi) ve trombositte spesifik olmayan (fibronektin, trombospondin, fibrinojen ve diğer pıhtılaşma faktörleri, büyüme faktörleri, fibrinolizis inhibitörleri, immunoglobulinler, vb) bir çok protein içermektedir. Daha yoğun granüller kalsiyum, serotonin ve vb. içermektedir. Ayrıca trombosit membranı fosfolipid yapıda iki katlı olup bir çok molekülün resöptörünü içerir (kollajen, tirombin gibi).

Yaralanmış bölgede agregre olup hemostazı desteklemek ve başlatabilmek için ilk olarak aktive edilmesi gerekmektedir. Trombositlerin degranulasyonu ayrıca hücre göçünü ve çoğalmasını stimüle eden sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin de fibrin matriks içinde salınımını sağlar. Bu iyileşmenin ilk basamağıdır (62).

Santrifüj sonrası trombositler tüpün en üst ve en alt tabakasında bulunmaz, sadece TZF pıhtının olduğu bölgede bulunurlar. Çalışmalar trombositlerin özellikle TZF pıhtı ve kırmızı kan hücrelerinin yoğun olduğu kırmızı pıhtı birleşiminde yoğun olduğunu göstermiştir (53).

TZF oluşum sürecinde kanda antikoagülan olmaması cam tüp içinde yoğun bir trombosit aktivasyonu sağlar. Aktivasyon sonucu trombosit sitokin ve büyüme faktörleri açığa çıkar. Açığa çıkan bu sitokinler yavaş polimerizasyon sonucu oluşan esnek fibrin ağı içinde hapsolür. TZF matrikste glikozaminoglikanlar (heparin, hyaluronik asit) da gömülmüş halde bulunurlar. Histolojik olarak fibrinin fibriler yapısına bağlanmışlardır. Glikozaminoglikanların dolaşımdaki küçük peptitlere bağlanma gücü çok güçlüdür ve hücre göçünü ve iyileşme sürecini destekleme kapasiteleri oldukça yüksektir (63).

2.4.1.1. Trombosit Büyüme Faktörleri

2.4.1.1.1. TGF β -1:Fibrozis ajan

TGF- β kemik morfogenetik proteinleri de içeren 30'dan fazla üyesi olan süper familyadır (TGF- β 1, TGF- β 2 ve β 3). TGF- β 1 yaygın olarak bulunur ve genellikle TGF- β olarak adlandırılır. TGF β -1 sadece trombositlerin alfa granüllerinden değil ayrıca hücre içi diyaloglar boyunca üretilen bir izoformdur (64).

TGF- β hücre tipi ve doku metabolik evrelerine göre çok sayıda ve zıt etkiye sahiptir. İltihap ve onarım bağlamında, TGF- β 'nın iki ana görevi vardır:

TGF- β güçlü bir fibrojenik ajandır. Kollajen, fibronektin ve proteoglikanların yıkımını arttıran proteinaz aktivitesini azaltarak ve doku proteinaz inhibitörlerini uyararak kollajen parçalanmasını engeller. Etkileri, uygulanan miktar, matriks çevresi ve hücre tipine göre değişkenlik gösterir. Örneğin, osteoblastların çoğalmasını arttırdığı gibi kolayca inhibe de edebilir. Tüm sitokinler arasında en kuvvetli fibrozis ajanıdır. Osteoblast ve fibroblastlarda kollajen-1 üretimini artırır (65).

TGF- β lenfosit proliferasyonunu inhibe eder ve güçlü anti-inflamatuar etkiye sahiptir. Yapılan çalışmalarda TGF- β bulunmayan farelerde yaygın iltihap ve yoğun lenfosit proliferasyonu görülmüştür (65).

TGF- β inflamasyon, anjiogenezis, reepitelizasyon ve konnektif doku rejenerasyonundaki rolüyle yara iyileşmesinde önemlidir. Ekstrasellüler matriks (ECM) sentezinde güçlü regülatördür, fibronektin ve kollajen gen salınımını artırır, kollajen yıkımını azaltır ve metalloproteinase proteaz inhibitörlerini inhibe ederek ECM oluşumunu güçlendirmektedir (66). Bu büyüme faktörü kemik formasyonunda ve iyileşmesinde, osteoblast prekürsör hücrelerin mitogenez fonksiyonlarını ve kemotaksisini arttırmakta ve kemiğin kollajen matriksinde osteoblast depolanmasını stimule etmektedir (66). TGF- β VEGF varlığında etkinliği artarak, anjiogenezis ve iltihabi hücrelerin kontrolünü sağlamaktadır (66,67).

2.4.1.1.2. PDGF: Mezenkimatöz soyu uyarıcı

PDGF (Trombosit kökenli büyüme faktörü), A ve B olarak adlandırılan her biri iki zincire sahip birbirleri ile yakın ilişkili protein ailesinin üyesidir. Beş ana PDGF izoformu AA, AB, BB, CC ve DD olarak kodlanmıştır. PDGFs, PDGF- α ve PDGF- β kodlu reseptörlere bağlanır. PDGF-BB bu ailenin bir alt tipidir ve PDGF olarak bilinir. Endotel hücreleri, aktive olmuş makrofajlar, düz kas hücreleri ve çoğu tümör hücresi tarafından yapılır, trombositlerde depolanır ve trombosit aktivasyonu ile serbestleşir. Büyük bir çoğunluğu trombositlerin alfa granüllerinde mevcuttur. Sert ve yumuşak doku iyileşmesinde ve santral sinir sistemi gelişiminde önemli bir rolü vardır. Osteoblastların, diferansiye olmamış osteoprogenitör hücrelerin, düz kas hücrelerin, fibroblastların ve glial hücrelerin major mitojenidir (68,69). PDGF yara alanına nötrofillerin ve makrofajların kemotaksisini, doku reepitelizasyonunu ve anjiogenezi stimule eder (67-69.).

PDGF mezenkimal hücrelerin canlılığını koruyabilmesini, üreyebilmesini ve migrasyonunu düzenler. Özellikle embriyolojik gelişimde ve bütün hücrelerin remodelinginde önemlidir (68,69).

2.4.1.1.3. IGF: Hücre koruyucu ajan

İnsülün benzeri büyüme faktörü 1 ve 2 bir çok hücre tipinin tümör hücresi dahil farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenler. Bu sitokinler hücreler için çoğalma mediatörleri olmalarına rağmen, hücreleri matriksteki birçok apoptotik uyarandan koruyan sinyaller üreterek apoptozu düzenleyen en önemli sitokinlerdir. IGF'ler trombositlerden salgılanmalarına rağmen, dolaşımdaki kanda yüksek oranda bulunurlar. Bir çalışmada TZF'deki IGF'nin trombosit aktivasyonundan kaynaklanmadığı, IGF'nin en yüksek konsantrasyonunun plazmada bulunduğu gösterilmiştir (70).

2.4.1.1.4. VEGF

VEGF, VEGF-A, -B, -C ve -D içeren büyüme faktör ailesidir. VEGF-A genelde VEGF olarak bilinir. VEGF'ler reseptör ailesine (VEGFR-1 -2 ve -3) tirozin kinaz aktivitesi ile bağlanır. Çeşitli etkenler VEGF 'leri uyarır, en önemlisi hipoksidir. Diğer uyarıcılar trombosit türevi büyüme faktörü (PDGF), TGF- β , TGF- α dır (70).

Mevcut lokal damarlardan gelişen anjiogenezde, VEGF endotel hücrelerinin hem proliferasyonunu hem de motilitesini uyararak kapiller tomurcuklanma olayını başlatır. Endotel hücre migrasyonunu ve proliferasyonunu stimule ederek anjiogenez ve damarlanmayı sağlar (67). Kemik iliği endotel hücre prekürsörlerinden gelişimde, VEGF, VEGFR-2 üzerinde bu hücreleri kemik iliğinden mobilize eder ve bu hücrelerin anjiogenez alanında proliferasyon ve motilitesini uyarır. VEGF makrofaj ve granüositlerin kemotaksisini uyarır ve neurogenezini stimule etmektedir. VEGF'nin kan damarı gelişimini stimule etmesi, nörojenesisini arttırarak sinir tamirinde etkili olabileceği düşünülmektedir (71,72).

Yapılan bir in-vitro çalışmada TZF'deki TGF- β 1 ve PDGF-BB ve IGF-1 konsantrasyonları sırasıyla 6.634 ng/ml, 1.419 ng/ml ve 209.68 ng/ml olarak bulunmuştur (63). Ayrıca TZF üretiminden itibaren ilk 5. dakika, 1. 2. ve 5. saatteki PDGF-AB, TGF β -1, VEGF ve IGF-1 salınım miktarları Tablo I'de gösterilmiştir (70).

Bu büyüme faktörlerinin TZF'de 7. güne kadar yavaş salınım gerçekleştirdikleri bildirilmiştir. 7. güne kadar salınan toplam miktarın PDGF-AB, TGF- β 1 ve VEGF için sırasıyla 50.3ng, 273.4ng ve 6071ng olduğu gösterilmiştir (6).

IGF-1 dışında diğer büyüme faktörlerinin miktarları TZP'de TZF'ye oranla daha yüksek değerde olduğu görülmüştür (63). TZP ve TZF ile ilgili yapılan in vitro çalışmalar da bu sonucu desteklemektedir (73). Fakat TZP'de sitokin ve büyüme faktörlerinin uzun süreli yavaş salınımı söz konusu değildir. Salınımları hızlı ve ömürleri kısadır (63).

Tablo 2.1. TZF içindeki büyüme faktörlerinin salınım oranları (ng) (70)

TZF salınımı	5. Dakika	1. Saat	2. Saat	5. Saat
PDGF-AB	29.29	34.12	42.20	52.73
TGF β -1	43.06	49.52	60.09	72.21
VEGF	0.38	0.42	0.71	1.04
IGF-1	257.40	247.82	244.62	249.16

Bu büyüme faktörleri hücre mitozunda, kollojen yapımında, hücre farklılaşmasında ve anjiogenezisde artışa sebep olmakta böylece sert ve yumuşak dokuda daha iyi ve hızlı iyileşme sağlanabilmektedir (68-70).

2.4.1.1.5. Büyüme Faktörlerinin Etki Mekanizması

Kemik iyileşmesi ve yeniden şekillenmesi sırasında meydana gelen karışık hücresel olayların büyük bir kısmını büyüme faktörleri düzenler ve kontrol eder. Kendi üzerlerine olan etkilerinin yanında hormonların etkilerini de ayarlarlar (74).

Kemiğin yeniden şekillenmesi sırasında; kemik rezorpsiyonu ve kemik apozisyonu birarada meydana gelmektedir. Bu iki olayda da büyüme faktörleri önemli düzenleyici rol oynamaktadır. Osteoklastik kemik rezorpsiyonunun başlangıcı PTH hormonunun kontrolü altındadır. Osteoklastik kemik rezorpsiyonu sırasında, rezorbe olan kemik matriksinden büyüme faktörleri salınmaktadır. Özellikle TGF- β devam etmekte olan osteoklastik aktivasyonu inhibe eder. TGF- β ve IGF'ler komşu periosteal yüzeylerdeki osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonunu stimüle ederken; BMP'ler diferansiasyonu meydana getirir. Daha sonra; PDGF ve TGF- β osteoblastların rezorpsiyon bölgesine kemotaktik migrasyonunu sağlarlar. Bu osteoblastlar, büyüme faktörlerinin otokrin ve parakrin sekresyonu ile kemik matriksinin sentezini meydana getirir. Kemik iyileşme olayı sırasında; yeni kemik oluşumunu sağlayan osteoblast ve osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonu ve diferansiasyonunun devamlılığı için büyüme faktörlerinin sürekli varlığı gereklidir. İyileşmenin erken fazında; kan pıhtısı içerisinden salınan TGF- β ve PDGF, osteoprogenitör hücrelerin proliferasyonunu başlatır. Travmatize olmuş kemik uçlarından salınan büyüme faktörleri osteoblastik aktiviteyi devam ettirir (74,75). Trombositler ve kemik dokudan salınan büyüme faktörlerine ilaveten osteoblastlar tarafından büyüme faktörleri de salınır. Yaralanmadan

7–12 gün sonra, osteoblastlar tarafından TGF- β ve PDGF tekrar sentezlenir. Lind ve arkadaşları (76), deneysel tavşan tibiası osteotomi modelinde dışarıdan TGF- β uygulanmasının kallus oluşumunu artırdığını görmüşler.

Trombositlerin yara iyileşmesindeki rolü gerek hemotazın sağlanması aşamasında gerekse iyileşmenin ilerleyen döneminde, içlerinde bulunan büyüme faktörlerinin etkileriyle ön plana çıkmaktadır. Bu bilgi, trombositlerin ve trombosit ürünlerinin kemik içi yara iyileşmesini hızlandırmak ve iyileştirmek amacıyla kullanılması fikrinin ortaya çıkmasına neden olmuş ve büyüme faktörlerinin yara bölgelerine topikal uygulamalarının; tamiri, yara iyileşmesini, doku ve kemik rejenerasyonunu yönlendirip hızlandırabileceği gösterilmiştir.

Trombositten zengin plazma (Platelet-Rich Plasma - PRP), trombositten zengin büyüme faktörleri (PRGF) ve trombositten zengin fibrin (PRF) bu amaçla kullanılan kan ürünleridir.

2.4.2. Lökositler

Lökositlerin TZF içerisindeki trombositlere sinerjik etki gösterdiği öngörülmektedir. Aynı ayrı lökosit ve trombositlerin etkilerini analiz eden çok çalışmaya ihtiyaç vardır. Lökositlerin etkileri;

- Antienfeksiyöz etki
- İmmun regülasyonu; ağrı ve enflamasyonu azaltır.
- Anjiogenezisi artırır; trombositlerin içerdiği anjiogenez stimulatörlerine ilave olarak lökosit kaynaklı VEGF salınımı

Bazı otörler herhangi bir bilimsel kanıt olmamasına rağmen lökositlerin enflamatuvar süreçten uzaklaşmak için çıkarılmasını önerirler (77). Bazı otörler ise TZF'den büyüme faktörlerinin yavaş salınımını düzenlemedeki öneminden dolayı trombosit konsantrasyonlarında lökositleri vurgularlar (59,78).

2.4.3. Sitokinler

Enflamatuvar sitokinler:

Enflamasyonda rol alan sitokinlerin sayısı oldukça çoktur. Bunlardan en önemlileri IL-1 β , IL-6 ve TNF- α 'dır. IL-1 β enflamasyon kontrolünde kilit role sahiptir (79, 80). T yardımcı lenfosit uyarılmasını sağlar. TNF- α ile birlikte kemik oluşumunu önleyip yıkımını arttırmaları. TNF- α , enflamatuvar hücrelerin fagositoz ve sitotoksisite kapasitesini ve IL-1 ve IL-6 sentezini artırır (81). IL-6, B lenfositler için farklılaşma faktörü, T lenfositler için aktivatördür. Antikor salınımını uyarır

İyileşme sitokinleri:

Bir iyileşme iki açıdan değerlendirilir:

- Enflamatuvar sinyal yolunun inhibe edilerek amplifikasyonlarının nötralizasyonu: Bu IL-4'ün işlevidir.
- Damar yapıları gibi başlangıç iyileşme yapılarının gelişimini düzenler ve artırır: Bu da VEGF'nin işlevidir.

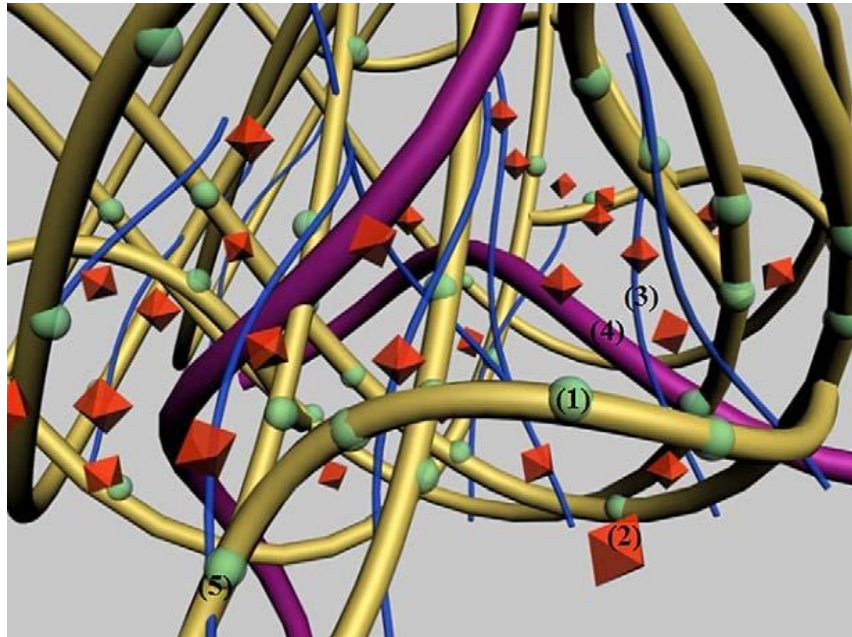
IL-4'ün enflamasyonda temel görevi iyileşmeyi desteklemektir. Fibroblastlardan kollajen sentezini artırır ve IL-1 β tarafından MMP-1 ve MMP-3'ün uyarılmasını önler (82). IL-1 β aracılı tüm enflamatuvar sinyal yollarını önler (83). VEGF, bilinen en güçlü ve yaygın vasküler büyüme tetikleyicisidir (84). Endotel hücre davranışlarında (çoğalma, göç, özelleşme ve hücre sağ kalımı gibi) önemli roller oynar (85,86). Bu sitokin varlığı bile anjiogenezi başlatmak için yeterlidir.

Bu lökositik 5 sitokin trombositler gibi polimerizasyon süresince fibrin ağda hapsolmuş durumdadır ve yavaşça salınırlar. TZF'de hapsolmuş ve yavaş salınan bu sitokinler, TZF'nin bağışıklık düzenlenmesinde önemli bir rolünün olduğunu düşündürür. İmmün sitokin miktarındaki bu artış TZF'deki yavaş kan aktivasyonunun lökosit degranülasyonunu sağladığı anlamına gelmektedir ve TZF'nin savunma kapasitesini göstermektedir. Ayrıca trombosit konsantrasyonlarında trombosit ve

lökositlerin ayrı ayrı etkileri henüz tam olarak açıklanamamıştır. Lökositlerin gözlemlenen etkilerin ne kadarından sorumlu olduğu net değildir.

2.4.4. Fibrin

Fibrin plazmatik molekül olan fibrinojenin aktive olmuş çözülme formudur. Fibril molekülleri plazmada ve trombositin alfa granüllerinde erimiş halde bulunur ve hemostaz sırasında trombosit agregasyonunda önemli bir rol oynar. Trombositlerin agregasyonunu sağlamak için bir çeşit biyolojik yapıştırıcı haline dönüşür böylece damar hasar bölgesini koagülasyon sırasında korur. Yaralanma alanında: polimerize fibrin jel ilk skatrisyel matriksi oluşturur. Fibrin oluşmazsa iyileşme olmaz (53-55). TZF'de bulunan maddeler yumuşak doku iyileşme ve olgunlaşmanın üç fenomeni olan anjiogenez, immünite ve epitelyal kapanmayı destekler. Fibrin anjiogenez için doğal bir rehberdir. Fibrin matriksin anjiogenez özelliği fibrin jelin 3 boyutlu yapısı ve ağda hapsolan sitokinlerin aktiviteleri ile açıklanır (55) (Şekil 2.5). Anjiogenezin önemli bir fazı da endotelial hücrelerden $\alpha v \beta 3$ integrin üretimidir. Bu molekül endotel hücrelerinin fibrin, fibronektin ve vitronektine bağlanmasını sağlar. Fibrin bu molekülün ekspresyonunu artırır.



Şekil 2.5. Fibrin matriksin 3 boyutlu yapısı (1-sitokin, 2- trombosit sitokini, 3- glikan zinciri, 4- fibronektin, 5- fibrin-glikan zincir ağı) (61)

Fibrin matriks epitelyal hücre ve fibroblastları etkileyerek yara alanını kaplar. Yara kenarlarında epitel hücreleri bazal ve apikal yüklerini kaybederler ve yara alanında bazal ve apikal yönde genişleyerek yarayı kaplarlar. Hücre göçü fibrinojen, fibronektin, tenaskin ve vitronektin ile düzenlenir. İntegrin ekspresyonunu düzenlemek, fibroblast çoğalmasını ve yara alanına göçünü düzenlemek için fibrin, fibronektin, PDGF ve TGF- β varlığı gereklidir (87). TZF mikrovaskülarizasyon gelişimini sağlayan ve epitelyal hücre göçünü yönlendiren fibrin bazlı doğal bir biyomateryaldir. Açık yaraları korumak ve iyileşmeyi hızlandırmak için bu tarz bir membranın önemi açıktır. Aynı zamanda lökosit içerir ve bu maddelerin göçlerini artırır (88).

2.4.5. Dolaşımdaki Kök Hücreler

Kemik iliğinden köken alan mezenşimal hücreler birçok dokunun rejenerasyonuna katılır. Bu farklılaşmamış hücreler kandan yara alanında toplanır ve farklı hücre tiplerine dönüşürler. Bu başlangıç farklılaşma fibrin ve fibronektin tarafından oluşturulan geçici yara matriksinde oluşur. Bu nedenle bu hücrelerin transplantasyonunda fibrin, destekleyici matriks olarak kullanılır.

Fibrin matriks içeriği sayesinde güçlü bir otolog membran elde edilmiş olur (63). Fibrin ağı dolaşımdan gelen kök hücreleri yakalar ve iyileşme sırasında damarlanmayı ve anjiyogenezisi doğrudan aktive eder (58).

2.4.6. L-TZF'nin Etki Mekanizması

Enflamasyon genel olarak 3 fazdan oluşan bir süreçtir, bu fazlar: vasküler faz, hücresel faz, iyileşme fazı. Vasküler faz hemostazın geliştiği ve lökositlerin aktive olup yara bölgesine ulaştığı fazdır. Enflamatuar bölgeye ilk olarak lökositler göç eder ve sitokin ve büyüme faktörleri salınımı sağlayarak iyileşmeye etki ederler. Bu enflamasyon mediyatörleri fibroblastların aktivasyonunda, proliferasyonda, biyosentetik aktivitenin stimule edilmesi ve proteazların (MMP, plazmin) salgılanmasında rol oynarlar. Sitokinler doku hemostaz dengesinde önemlidirler (58).

Yapılan çalışmalarda TZF uygulamasında enflamatuar sitokinlerin daha fazla salındığı görülmüştür. Bunun nedeni TZF'nin lökositik olmasıdır; yani TZF uygulamasında yavaş kan aktivasyon süreci sonucu lökosit degranülasyonu artmaktadır. TZF sadece bir trombosit konsantrasyonu değildir, aynı zamanda defans mekanizmalarını stimule eden bir immün ağ görevi görür (58,63).

Vasküler faz; Hemostazın oluşması ve lökositlerin göç etmesi ve son olarak koagülasyon ile fibrin pıhtının oluşması ile karakterizedir. Yaraya ilk olarak PMNL ler gelir ve daha sonra yüksek fagositoz özelliği olan monosit / makrofajlarla yer değiştirir. Enflamatuar alanda iyileşme reaksiyonlarında görev alan hücreler aktive olurlar ve çoğu büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınımını sağlarlar. Aynı zamanda iyileşme sırasında olacak aşırı yıkıcı etkileride azaltmaya yardımcı olur. Endotelial hücrelerin fenotip değişimi, migrasyonu ve divizyonu için ekstraselluler bir matriks gereklidir. Fibrin anjiyogenezis için doğal bir rehber görevi görür. Anjiyogenezis için gerekli büyüme faktörleri (FGFb, VEGF, PDGF) fibrin matriks içinde bulunur. Bazı çalışmalarda bu faktörlerin fibrine yüksek afiniteyle bağlandığı görülmüştür (58).

TZF fizyolojik fibrin matriks olarak kök hücreleri için, özellikle anjiyogenezisin arttığı safhada, bir ağ gibi işlev görür. Kemik iliğinden köken alan mezenşimal hücreler kemik hücreleri ve birçok farklı dokuların rejenerasyonunu sağlar. Bu farklılaşmamış hücreler kandan yaralanmış dokulara gelirler ve birçok farklı hücre tipine dönüşürler. Bu ilk farklılaşma safhası için fibrin ve fibronektin tarafından oluşturulmuş bir skar matriksi gereklidir. Bu durum neden fibrinin bu hücreler için gerekli olduğunun kanıtıdır. Birçok araştırmacı fibrin matriksin kemik defektlerinin rejenerasyonunda mezenşimal hücrelere destek bir yapı oluşturduğunu göstermişlerdir (58).

Choukroun ve ark. göre klinik çalışmalar TZF'nin iyileşmeyi hızlandırıcı ve arttırıcı bir biyomateryal olduğunu göstermektedir. İdeal iyileşme için gereken tüm parametreleri sağlamaktadır (58).

Hücresel faz: TZF'nin yavaş kan aktivasyon süreci lökosit degranülasyonu miktarını arttırır. Enflamasyon açısından lökositler de en az trombositler kadar

önemlidir. L-TZF'nin lökosit içeriği yüksektir. Trombosit molekülleri gibi lökosit sitokinleri fibrin yapı içinde depolanmıştır ve yavaş yavaş salınımı gerçekleşir. Anjiyogenezde aktif rol alan FGFb veya VEGF salınımını gerçekleştirir aynı zamanda integrin salınımında yaparak nötrofil migrasyonunu artırır.

Membrandan CD11c/CD18 salınımını arttırarak damar geçirgenliğinin artmasını ve nötrofillerin endotele adezyonunu sağlarlar, bu arada fibrinojen üretilmesini sağlarlar. Fibroblastları aktive ederek fibroblastlardan kollojen sentezini başlatırlar. TZF epitelizasyonun oluşmasını hızlandırır (58,62,63).

İyileşme fazı: İmmün sistem anahtarı olan sitokinlerin salınımını sağlarlar. Enfeksiyonlara karşı savunma kapasiteleri, yaralı bir alana (neovaskülarizasyon) sitokinlerin erişimini kolaylaştırmak için sitokin kemotaktik özelliklerinin yanı sıra kendi kapasitesi de önemli olacaktır. Ayrıca yapılan çalışmalarda TZF içeriğinde yüksek oranda IL-4 iyileşme sitokinine rastlanmıştır ve bu sitokin B ve T hücrelerini aktive ederek inflamasyonda retro-kontrolü sağlamaktadır (58,62,63).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma için Başkent Üniversitesi Hayvan Bakım ve Etik Kurulu onayı alınmıştır. Çalışmada 14 adet erişkin Beyaz Viyana cinsi, 10-12 haftalık, 3500-4500 gr ağırlığında erkek tavşan kullanıldı. Tüm hayvanlar yemek ve su için çıkışı olan, sessiz, sıcaklık/nem kontrollü (22 ± 2 santigrat derece ve %60-%5 nem oranında) kafeslerde tutuldu. 2 haftalık ortama alışma süresinden sonra hayvanlar rastgele 4 ve 8. haftalarda sakrifiye edilmek üzere 2 gruba ayrıldı.

Opere edilecek bütün tavşanlara anestezi olarak ketamin intramuskuler (IM) 50mg/kg, xylazine IM 5mg/kg verildi ve perioperatif antibiyotik-analjezik (Enroflaksasin IM 10mg/kg - Fentanil IV 0.0074mg/kg) uygulandı. Anesteziyi takiben gözleri Terramycin pomad (Pfizer, İstanbul) ile izole edilerek, tüm tavşanların parietal kemik yüzeyleri traşlandı ve cerrahi bölge % 10'luk povidine iyot solüsyonu (Betadine®) ile silinerek asepsi sağlandı ve tavşanlar operasyona hazırlandı (Şekil 3.1. A).

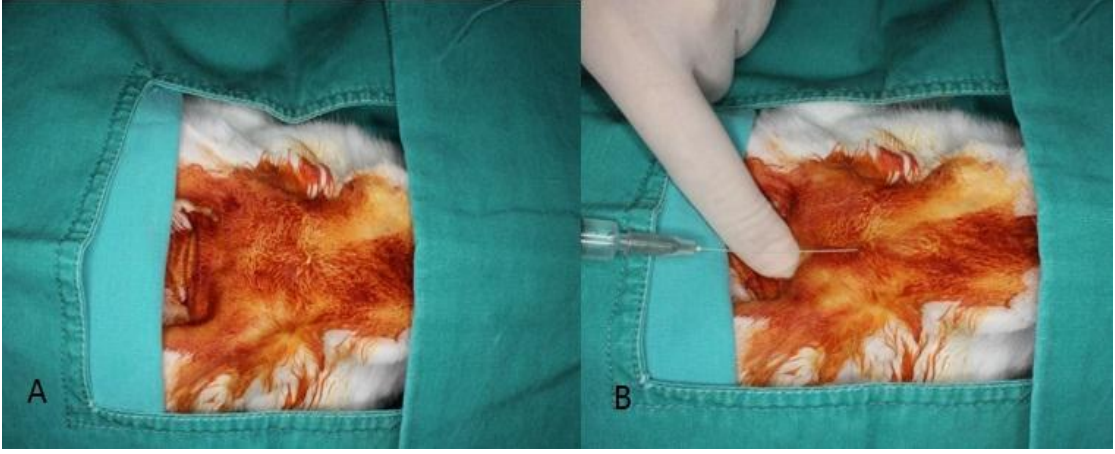
Hemostaz sağlamak için defekt oluşturulacak bölgeler lidokain HCI (jetocain) ile lokal anestezi uygulandı (Şekil 3.1. B). Cilt ve cilt altı dokuların diseksiyonu sonrası periost kaldırılarak kafatasının parietal bölgelerine ulaşıldı (Şekil 3.2. A). Kaviterin oluşturulacağı kadar yeterli kemik ortaya çıkarıldı (Şekil 3.2. B). Parietal kemiklere 9 mm. çapında trefin frez (Meisinger, German) kullanılarak, serum fizyolojik soğutması ve irrigasyonu ile standart bikortikal kemik defektleri oluşturuldu (Şekil 3.3, Şekil 3.4). Oluşturulan defektlerdeki kemik parçaları uzaklaştırılıp defektler yıkanıp kanama kontrolü yapıldı (Şekil 3.5).

Grup A; Kontrol grubu amaçlı boş bırakılırken,

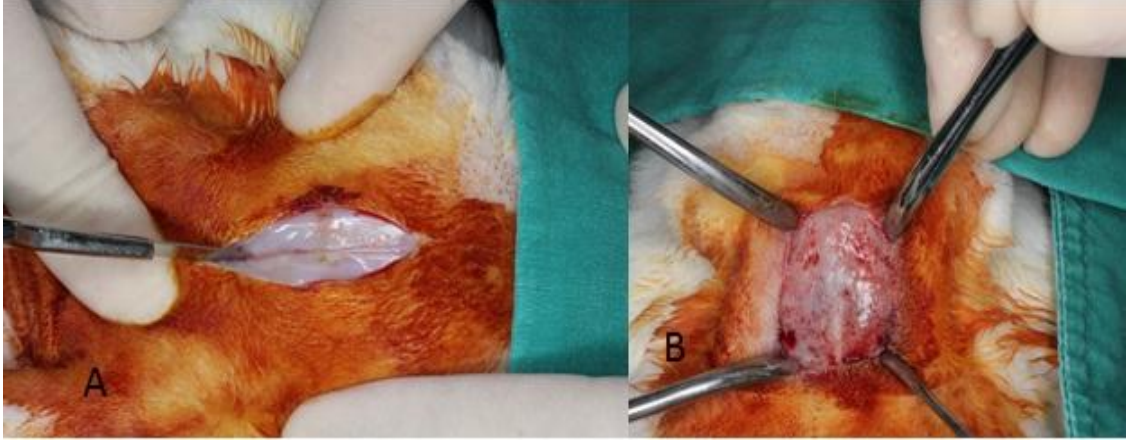
Grup B; HA/TCP greft ve üzerine kollajen membran,

Grup C; HA/TCP greft ve üzerine TZF membran,

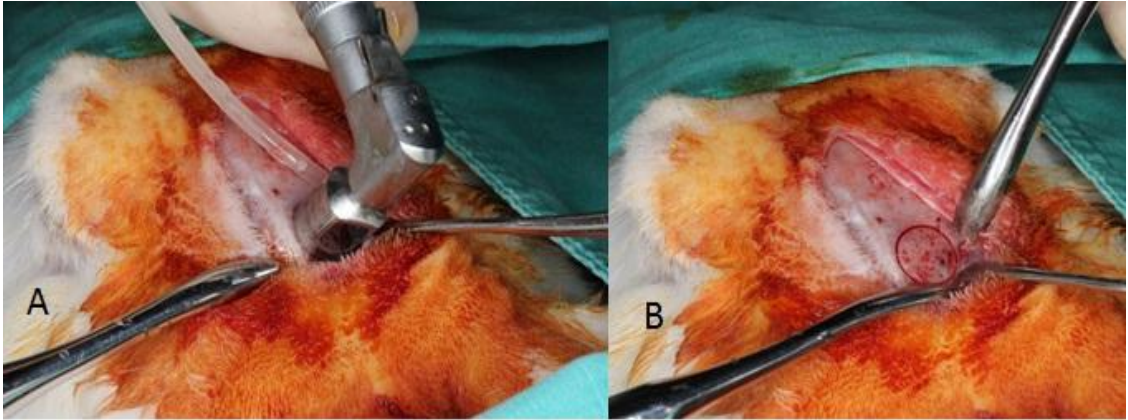
Grup D; greft materyali olarak HA/TCP ve TZF kombinasyonu ve üzerine kollajen membran uygulandı (Şekil 3.6).



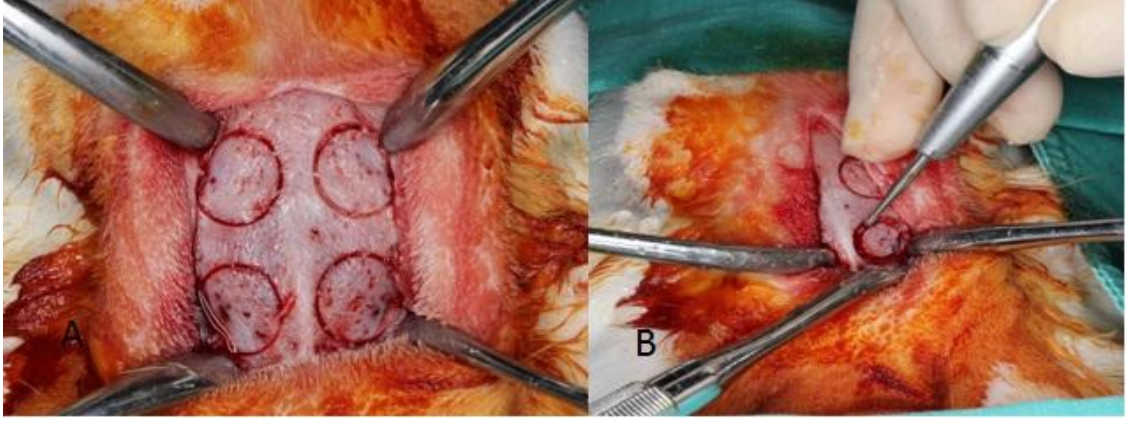
Şekil 3.1. A, Tavşanların operasyona hazırlanışı B, Lokal anestezi uygulaması



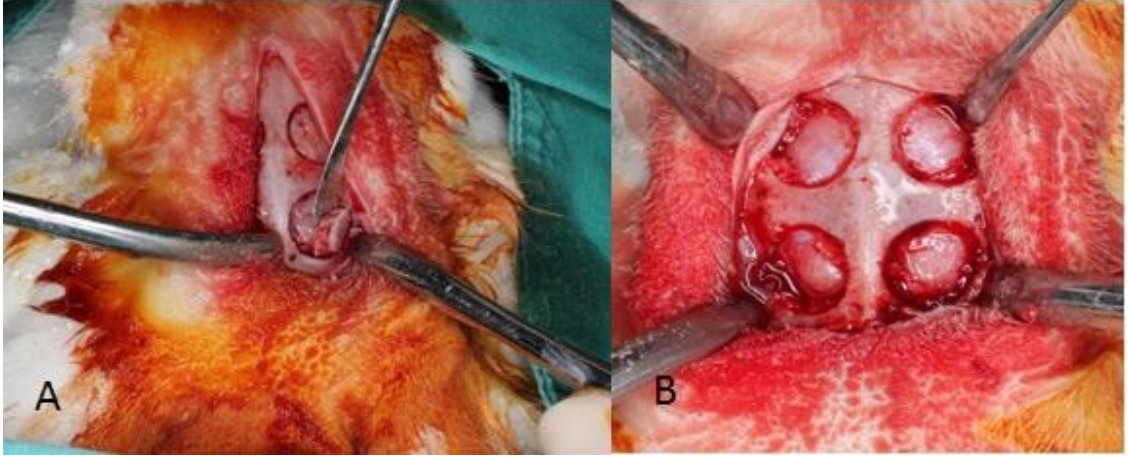
Şekil 3.2. A, Yatay insizyon. B, Flep kaldırıldıktan sonra kemiğin görünümü



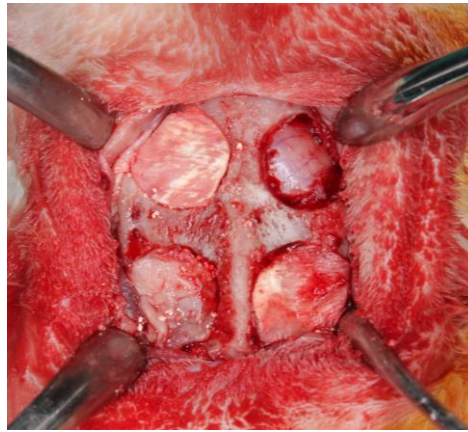
Şekil 3.3. A, 9 mm çapında trephin frezle defektlerin oluşturulması. B, Oluşturulan ilk defektin görünümü



Şekil 3.4. A, Trephin frezle oluşturulan defektlerin görünümü B, Defekt sınırlarının fissür frez ile belirginleştirilmesi



Şekil 3.5. A, 9mm çapındaki kortikal kemiklerin kaldırılması. B, Kemik parçaları uzaklaştırıldıktan sonra defekt bölgelerinin görünümü.

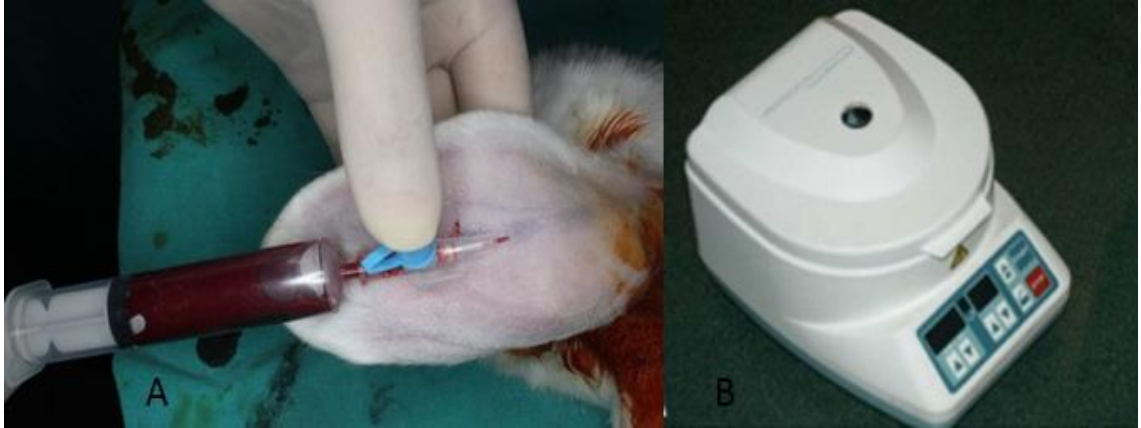


Şekil 3.6. Biyomateryallerin yerleştirilmesinden sonra defektlerin görünümü

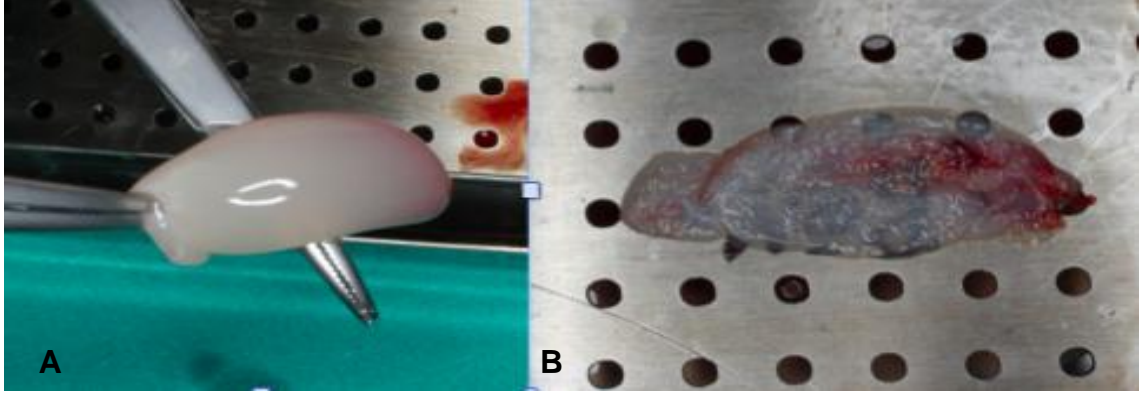
3.1. Trombositten Zengin Fibrinin Hazırlanması

TZF elde etmek amaçlı tavşanların kulak venlerinden 10 ml kan alındı (Şekil 3.7. A). Alınan kan kliniğimizde de mevcut olan özel TZF için dizayn edilmiş PC 02 isimli santrifüj cihazında 2700 devirde 12 dakika santrifüj edildi (Şekil 3.7. B). Elde edilen TZF hazır olduğu andan itibaren 3 dakika içerisinde, defektlere membran olarak veya küçük parçalara ayrılıp HA/TCP ile kombine edilerek uygulandı (Şekil 3.8). Greft materyali olarak 4BONE (Mis, israil) marka %60 hidroksiapatitden, %40 tri kalsiyum fosfat içeren, mikro ve makro gözenekli bifazik kalsiyum fosfat sentetik greft kullanıldı. Kollajen membran olarak at kaynaklı yaklaşık 3 ay içinde rezorbe olabilen, heterolog perikardiyum orjinli 0.6mm kalınlığında EVOLUTION (Technoss, İtalya) marka membran kullanıldı.

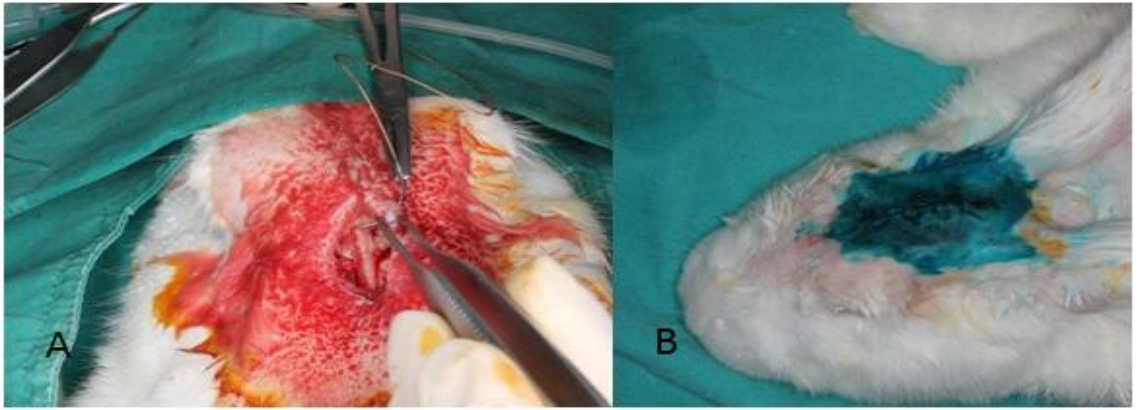
Cilt ve cilt altı dokular tabakalar halinde rezorbe olabilen dikiş ile kapatıldı (Şekil 3,9, A). Cerrahi alana kloramfenikol sprey uygulamasından sonra hayvanlar standart besin rejimi ile beslendi ve operasyonu izleyen 5 gün antibiyotik ve analjezik uygulaması yapıldı (Şekil 3.9. B).



Şekil 3.7. A, Tavşanların kulak veninden kan alımı. B, PC 02 santrifüj cihazı



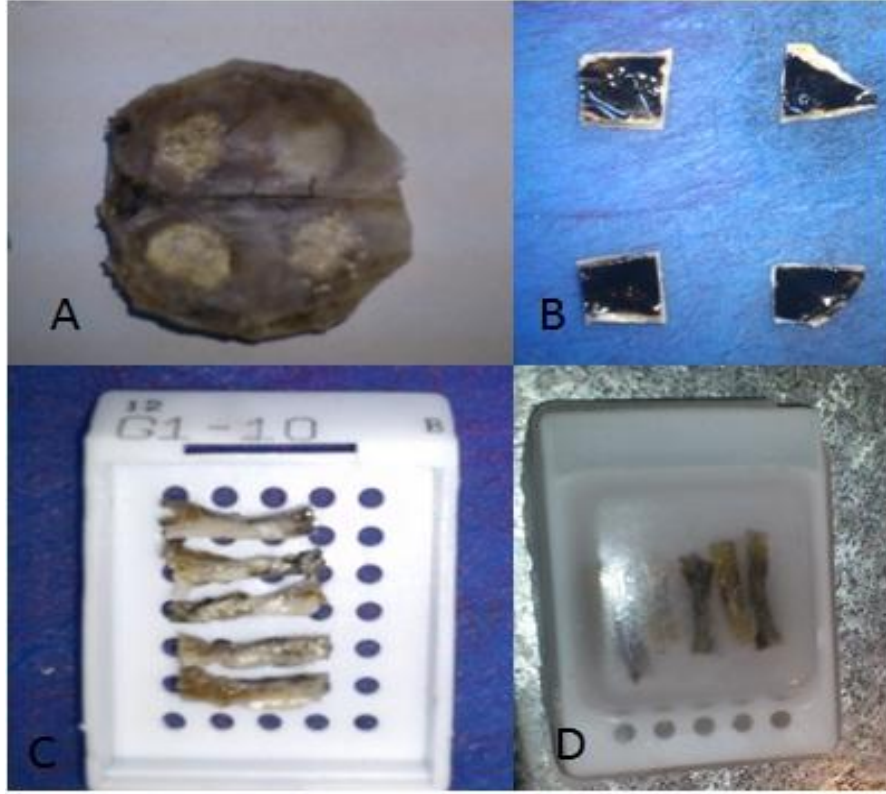
Şekil 3.8. A, Kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırıldığı TZF. B, Kendi özel kutusunda preslenerek hazırlanan TZF



Şekil 3.9. A, Cerrahi alanın suture edilmesi B, Kloramfenikol sprey uygulamasından sonraki görünüm

3.2. Histopatolojik Değerlendirme

Denek hayvanları iki grup halinde post-operatif 4. hafta (n:7) ve 8. haftalarda (n:7) i.v. thiopentol sodyum ile sakrifiye edilip kafatasları alındı (Şekil 3.10. A). % 5'lik formik asitte dekalsifiye edildikten sonra her bir defektin duraya bakan yüzü doku boyası ile boyandı (Şekil 3.10. B). Her bir defekt uzun eksene paralel olacak şekilde oryantasyon sağlanarak total örneklendirildi (Şekil 3.10. C). Örnekler % 10'luk tamponlanmış formalin solusyonu içinde tespit edildi. Doku takip işlemlerinden sonra örnekler uygun oryantasyon sağlanarak parafin bloklara gömüldü (Şekil 3.10. D). Parafin bloklardan 4-6 μ m kesitler alındıktan sonra hematoksilin-eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda incelendi. Bağ dokusu oluşumunu ve vasküler proliferasyonu değerlendirmek için histokimyasal olarak Masson-Trikrom boyası uygulandı. Histopatolojik değerlendirme, deneklere verilen tedaviden ve deneklerin durumundan habersiz olarak, bir patolog tarafından gerçekleştirildi.



Şekil 3.10. Patoloji örneklerinin hazırlanması. A, Ampute edilen kafatası, B, duraya bakan yüzün doku boyası ile boyanması. C, doku takibi öncesi uygun oryantasyonda örneklendirilmesi D, doku takibi sonrası parafin blok hazırlanması

Tüm gruplara ait örnekler, aşağıdaki kriterler kullanılarak değerlendirildi.

Histopatolojik değerlendirme kriterleri:

1- Yeni kemik oluşumu: İmmatür veya matür kemik oluşumu birlikte 0'dan 4'e kadar derecelendi.

0: hiç kemik yok

1: %25'den az kemik var

2: %25-50 arası kemik oluşumu

3: %50-75 arası kemik oluşumu

4: %75-100 arası kemik oluşumu

2- Enflamasyonun şiddeti 0'dan 3'e kadar derecelendirildi.

0: hiç enflamasyon yok

1: hafif derecede enflamasyon

2: orta derecede enflamasyon

3: şiddetli derecede enflamasyon

3- Vasküler proliferasyon bir büyük büyütme alanında (x40'luk büyütme alanında) küçük damar kesiti sayısı değerlendirildi ve 0-3 arasında derecelendirildi.

0: hiç yok

1: 5'den az damar kesiti var

2: 5-10 arası damar kesiti var

3: 10'dan fazla damar kesiti var

4- Yeni bağ dokusu oluşumu: Defekt alanında bağ dokusu gelişimi 0-4 arasında derecelendi.

0: hiç yok

1: %25'den az

2: %25-50 arası

3: %50-75 arası

4: %75-100 arası

5- Fibrin membran ile uyumlu alanlarda histiosit hücre toplulukları izlenmiş olup, 0-3 arasında derecelendirildi.

0: hiç histiosit yok

1: hafif derecede histiosit hücre topluluğu var

2: orta derecede histiosit hücre topluluğu var

3: yoğun derecede histiosit hücre topluluğu var

6- Yeni oluşan kemik dokusunun immatür komponent oranı 0-4 arasında derecelendirildi.

0: yok

1: %25'den az

2: %25-50 arası

3: %50-75 arası

4: %75-100 arası

7- Yeni oluşan kemik dokusunun matür komponent oranı 0-4 arasında derecelendirildi.

0: yok

1: %25'den az

2: %25-50 arası

3: %50-75 arası

4: %75-100 arası

8- Yeni oluşan kemik dokusunda kemik iliği varlığı 0-1 arasında derecelendirildi.

0: yok

1: var

3.3. İstatistiksel değerlendirme

Öncelikle sürekli değerlerin tanımlayıcı istatistikleri belirlenmiştir. Tanıtıcı istatistikler ortalama değer, \pm standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak belirtilmiştir. Veri analizi yapılırken iki grup (4 haftalık dönem ve 8 haftalık dönem) olan değişkenler kendi birimi cinsinden aldığı değerler karşılaştırılırken, tek grup varyans analizi yada önşartları sağlamıyorsa Kruskal Wallis istatistiği kullanılmıştır. Yukarıda bahsedilen parametrik testler normallik, varyansların homojenliği gibi ön şartların kontrolü yapıldıktan sonra (Shapiro Wilk ve Levene Testi) değerlendirilmiştir.

Kesikli değişkenler arasındaki ilişkiyi belirlemek için Ki Kare ve Fisher's Exact Test yapılmıştır. Bağımlı ve bağımsız değişkenler arasında değerlendirme yapılırken iki faktörlü faktörlerden biri tekrarlanan varyans analizi kullanılmıştır. Tekrarlı ölçüm varyans analizi için gerekli olan önşartlardan Mauchly's küresellik Testi sonucu küresellik varsayımının sağlanmadığı belirlenmiştir. Bu durumda Friedman ve Wilk's Lambda analizleri kullanılmıştır. Anlamlılık düzeyi $\alpha=0,05$ olarak gösterilmiştir. Veriler (SPSS, Chicago IL, Version 17) paket programında değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Genel Değerlendirme Bulguları

Tavşanların hiç birinde ameliyata ikincil gelişen yara yeri enfeksiyonu, deri nekrozu, kıl dönmesi ya da başka bir komplikasyon izlenmedi.

4.2.Histolojik Değerlendirme Bulguları

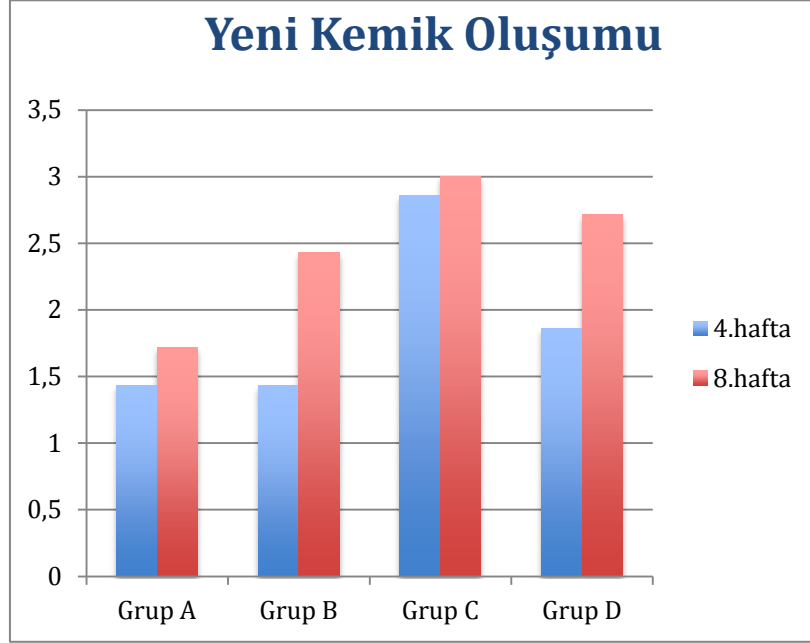
4.2.1. Yeni Kemik Oluşumu Bulguları

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 4 haftalık dönemde gruplara yeni kemik oluşumu için skora yapılmıştır (Şekil 4.2). 4 haftalık dönemde Friedman testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0,042$). Grup A'da (kontrol amaçlı boş defekt) ortalama değer 1.4286 görülürken, Grup B'de (HA/TCP ve üzerine kollojen membran kullanılan grup) 1.4286, Grup C'de (HA/TCP greft ve üzerine TZF membran kullanılan grupta) 2.8571 ve Grup D'de (greft olarak HA/TCP ve TZF kombinasyonu ve üzerine kollajen membran kullanılan grupta) ise ortalama değer 1.8571 ölçüldü (Şekil 4.1).

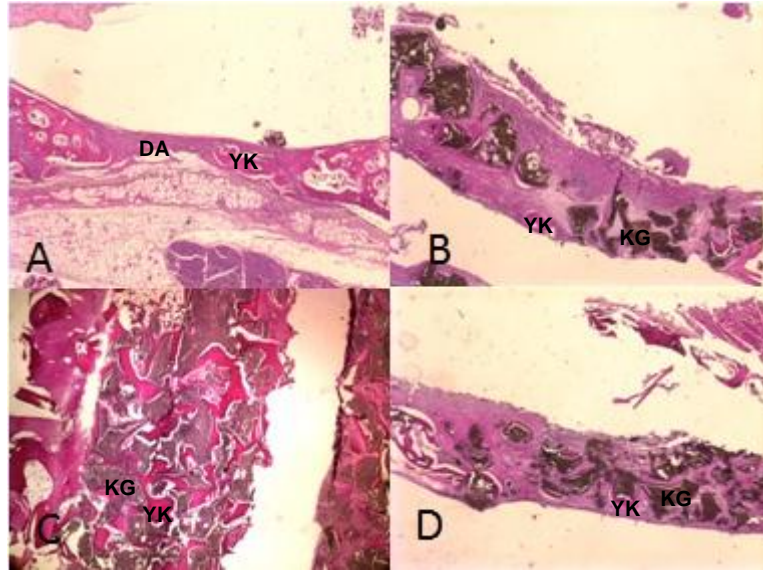
Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 8 haftalık dönemde gruplara yeni kemik oluşumu için skora yapılmıştır (Şekil 4.3). 8 haftalık dönemde yeni kemik oluşumunda Friedman testine göre gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p:0,015$) Grup A'da ortalama değer 1.7143 görülürken, Grup B'de 2.4286, Grup C'de 3.00 ve Grup D'de ise ortalama değer 2.7143 görüldü (Şekil 4.1).

Yeni kemik oluşumunda Bonferroni-Dunn testine göre gruplar arasında Grup A ile Grup C ve Grup B ile Grup C arasında hem 4. haftada hemde 8. haftada istatistiksel olarak anlamlı farklılık olduğu görüldü ($p<0,05$) (Şekil 4.1).

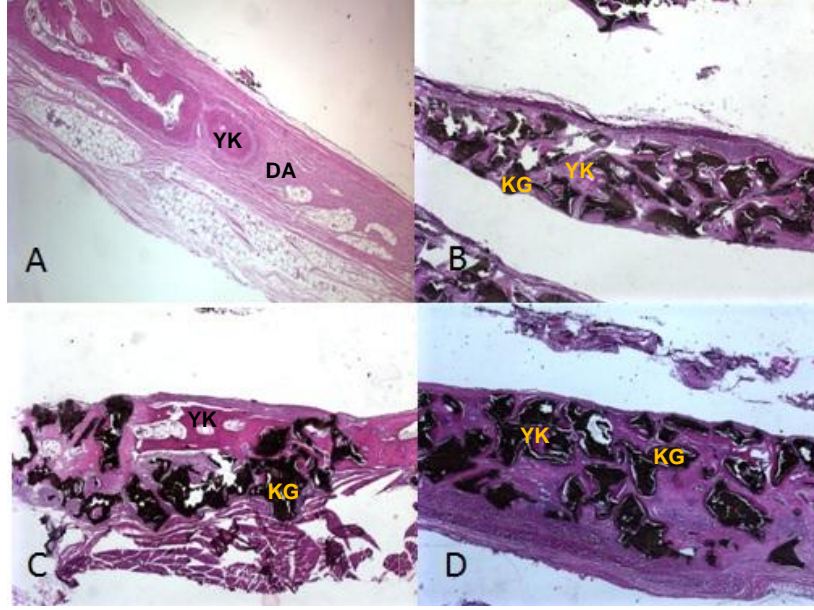
4 ve 8 haftalar karşılaştırıldığında yeni kemik oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($p < 0.05$).



Şekil 4.1. 4 ve 8 haftalık dönemlerde yeni kemik oluşumu



Şekil 4.2. 4. haftaya ait çalışma gruplarının histopatolojik görünümü. A, Kontrol grubunda yeni kemik oluşumu görüntüsü (Hematoksilen-Eozin X 2). B, Grup B’de grefti çevreleyen yeni kemik oluşumu görünümü (Hematoksilen-Eozin X 2). C, Grup C’de grefti çevreleyen karışık kemik trabeküllerinin görünümü (Hematoksilen-Eozin X 10). D, Grup D’de grefti çevreleyen yeni oluşmuş kemik trabeküllerinin görünümü (Hematoksilen-Eozin X 2).



Şekil 4.3. 8. haftaya ait kemik defektlerinin histopatolojik görünümü. A, Kontrol grubunda defekt alanı ve yeni kemik oluşumu görüntüsü. B, Grup B’de grefti çevreleyen yeni kemik oluşumu görünümü. C, Grup C’de grefti çevreleyen karışık kemik trabeküllerinin görünümü. D, Grup D’de grefti çevreleyen yeni oluşmuş kemik trabeküllerinin görünümü (Hematoksilen-Eozin X 2).

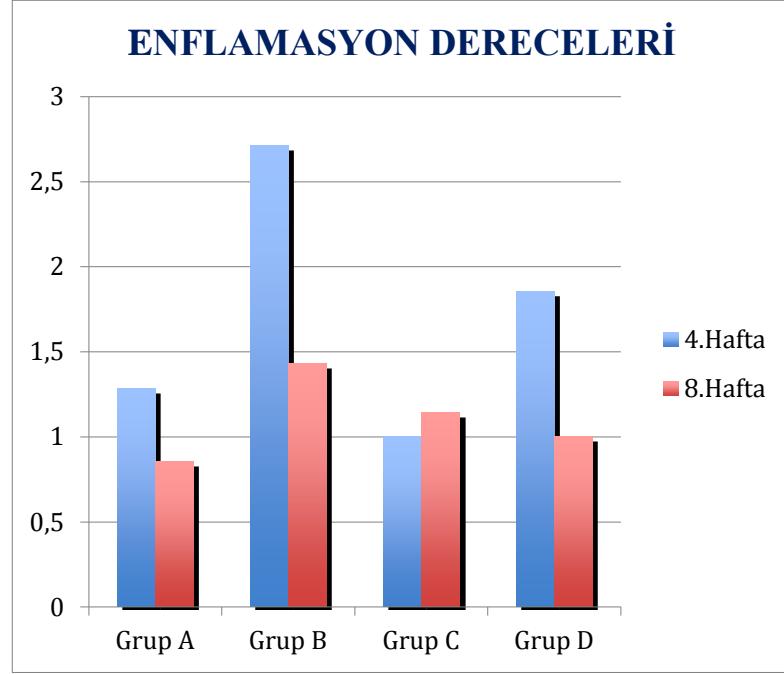
4.2.2. Enflamasyon Bulguları

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 4 haftalık dönemde gruplara enflamasyon değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.5). 4. hafta enflamasyon derecelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p=0.018$). Grup A’da ortalama değer 1,2857, Grup B’de 2,7143, Grup C’de 1 ve Grup D’de ise ortalama değer 1,8571 olarak ölçüldü (Şekil 4.4).

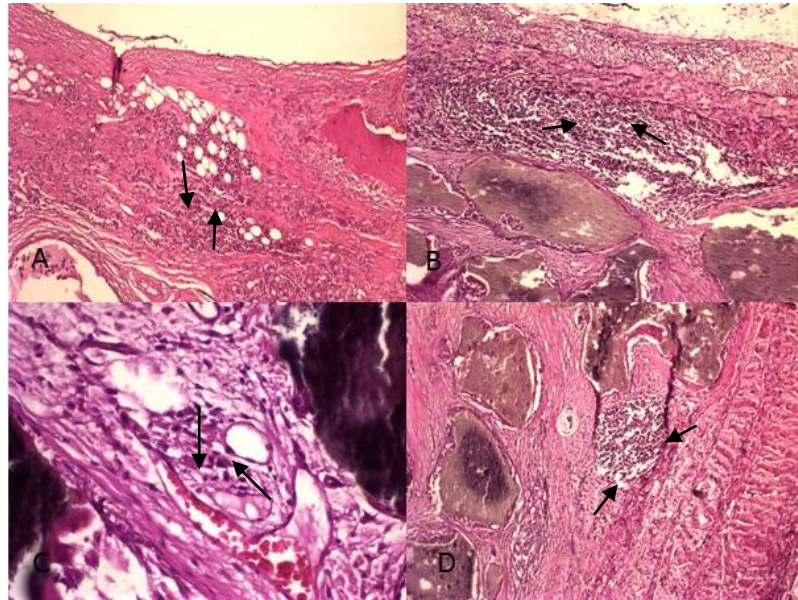
Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 8 haftalık dönemde gruplara enflamasyon değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.6). 8. hafta enflamasyon derecelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=0.246$) (Şekil 4.4).

Enflamasyon derecelerinde Bonferroni-Dunn testine göre gruplar arasında Grup B ile Grup C ve Grup B ile Grup D arasında 4. haftada istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$).

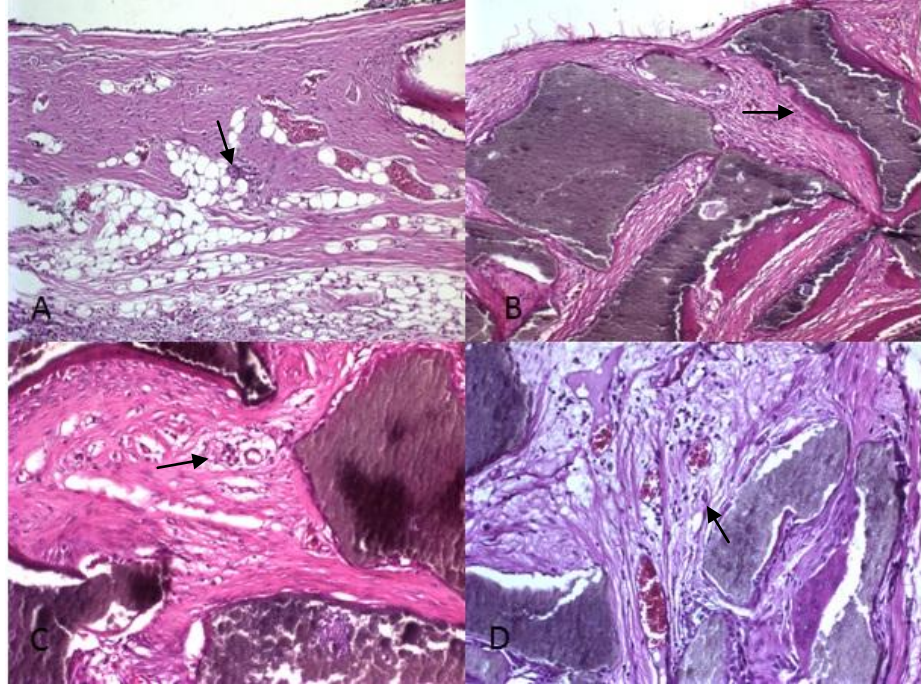
Enflamasyon derecelerinde 4 hafta ve 8 haftalık dönemler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görüldü ($p=0,008$).



Şekil 4.4. 4 ve 8 haftalık dönemlerde enflamasyon dereceleri



Şekil 4.5. 4. haftaya ait çalışma gruplarında izlenen kronik enflamasyon bulguları. A, Kontrol grubunda kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). B, Grup B’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). C, Grup C’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 40). D, Grup D’de kronik enflamasyon alanlarının görünümü (Hematoksilen-Eozin X 10).



Şekil 4.6. 8. haftaya ait çalışma gruplarında izlenen kronik enflamasyon bulguları. A, Kontrol grubunda kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). B, Grup B’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 10). C, Grup C’de kronik enflamasyon alanları (Hematoksilen-Eozin X 20). D, Grup D’de kronik enflamasyon alanlarının görünümü (Hematoksilen-Eozin X 10).

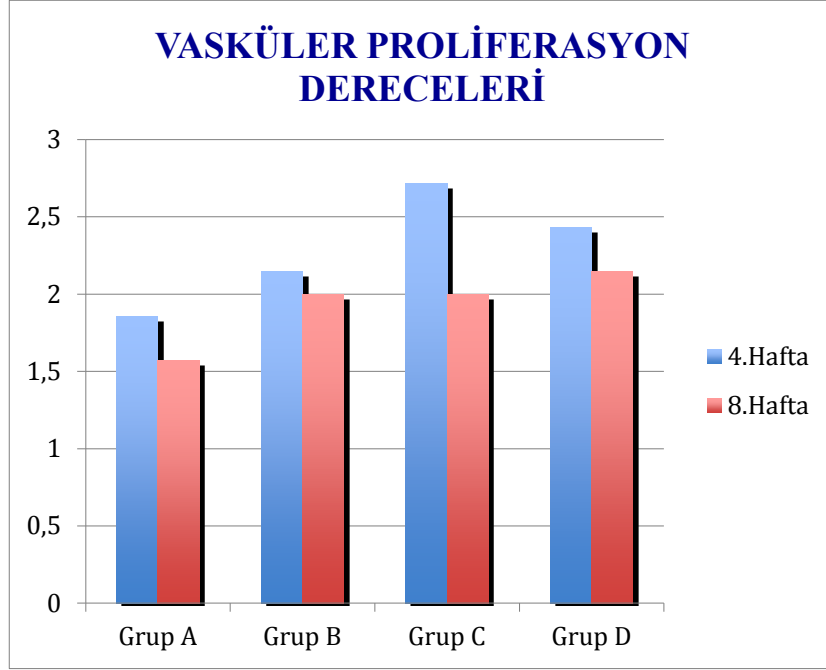
4.2.3. Vasküler Proliferasyon

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 4 haftalık dönemde gruplara vasküler proliferasyon değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.8). 4. hafta vasküler proliferasyon derecelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.01$, $p<0.05$). Grup A’da ortalama değer 1,8571, Grup B’de 2,1429, Grup C’de 2,7143 ve Grup D’de ise ortalama değer 2,4286 olarak ölçüldü (Şekil 4.7).

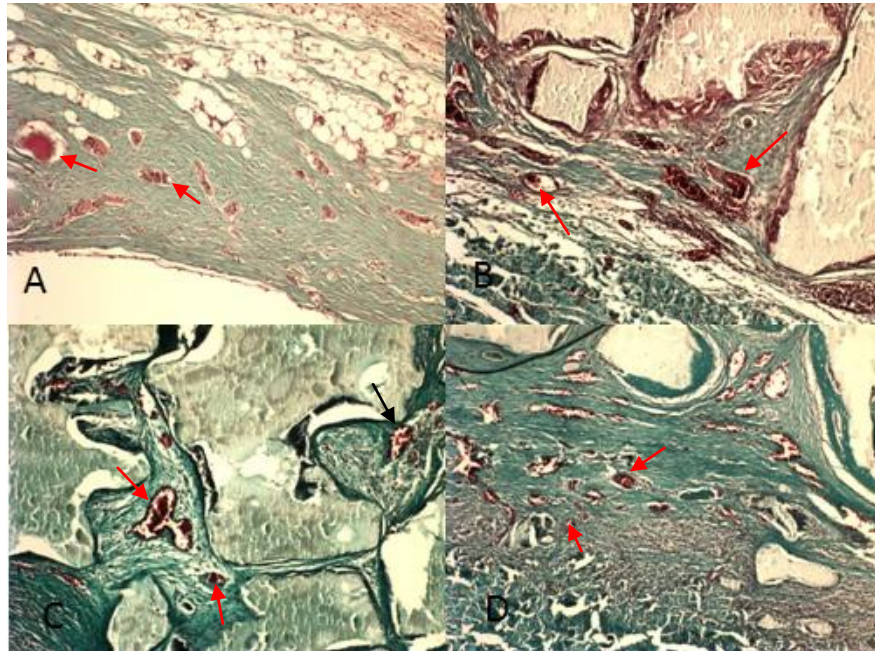
Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 8 haftalık dönemde gruplara vasküler proliferasyon değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.9). 8. hafta vasküler proliferasyon dereceleri karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.388$) (Şekil 4.7).

Vasküler proliferasyon derecelerinde Grup A ile Grup C ve Grup A ile Grup D arasında 4. haftada istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$).

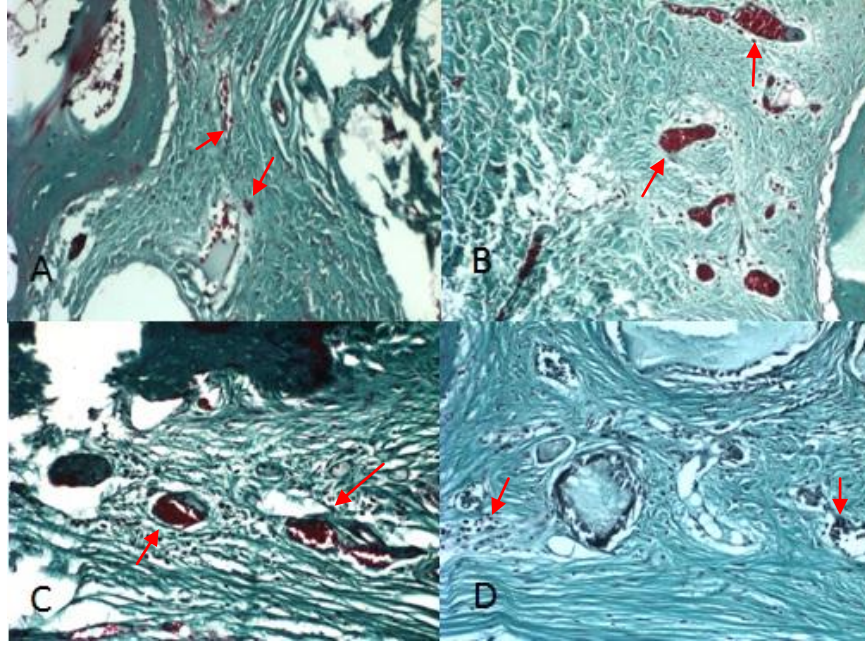
Vasküler proliferasyon derecelerinde 4. hafta ve 8.haftalık dönemler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmedi ($p>0,05$).



Şekil 4. 7. 4 ve 8 haftalık dönemlerde vasküler poliferasyon dereceleri



Şekil 4.8. Dördüncü haftada çalışma gruplarında vasküler proliferasyon varlığı. A, Grup A'da vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 20). B, Grup B'de vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 20). C, Grup C'de vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 10). D, Grup D'de vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 10).



Şekil 4.9. Sekizinci haftada çalışma gruplarında vasküler proliferasyon varlığı. A, Grup A'da vasküler proliferasyon varlığı. B, Grup B'de vasküler proliferasyon varlığı. C, Grup C'de vasküler proliferasyon varlığı. D, Grup D'de vasküler proliferasyon varlığı (Masson Trikrom X 20).

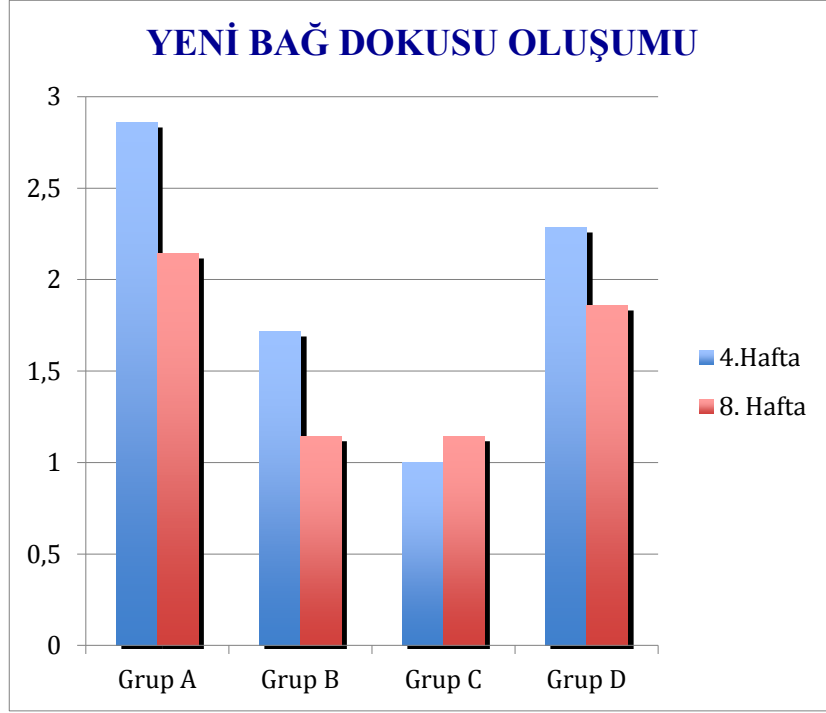
4.2.4. Yeni Bağ Dokusu Oluşumu

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 4 haftalık dönemde gruplara yeni bağ dokusu oluşum değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.11). 4. hafta yeni bağ dokusu oluşum miktarı değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.00$). Grup A'da ortalama değer 2,8571, Grup B'de 1,7143, Grup C'de 1 ve Grup D'de ise ortalama değer 2,2857 olarak ölçüldü (Şekil 4.10).

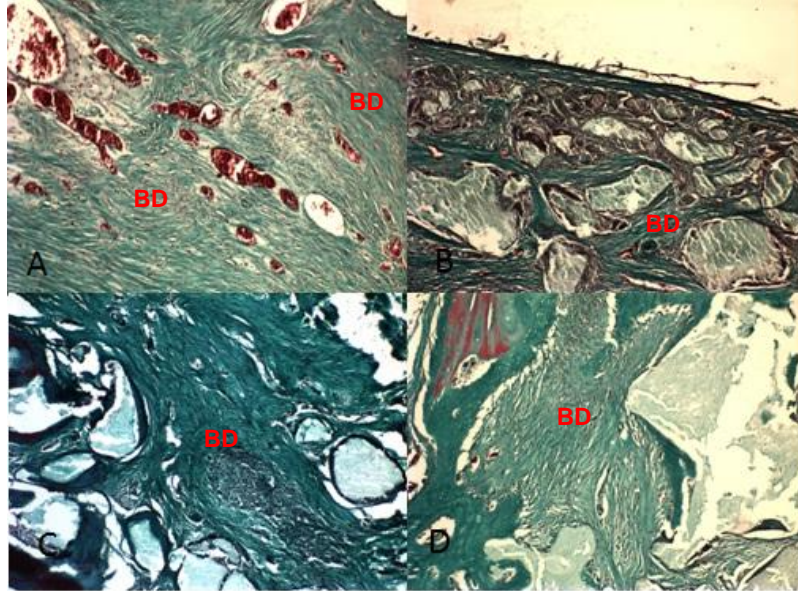
Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 8 haftalık dönemde gruplara yeni bağ dokusu oluşum değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.12). 8. hafta yeni bağ dokusu oluşumu miktarı değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.016$) (Şekil 4.10).

Bağ dokusu oluşumu derecelerinde Bonferroni-Dunn testine göre gruplar arasında Grup A ile Grup B ve Grup A ile Grup C ve Grup C ile Grup D arasında hem 4. haftada hemde 8. Haftada istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$).

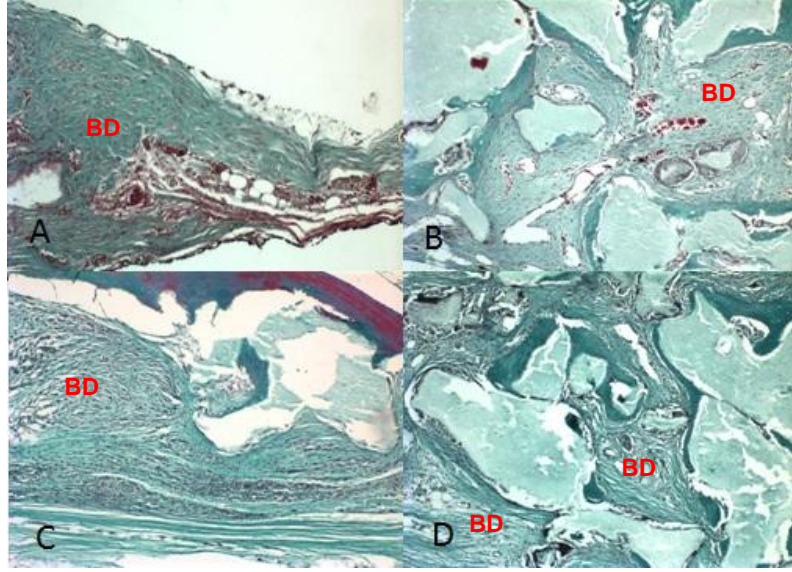
Yeni bağ dokusu oluşumunda 4. hafta ve 8.haftalık dönemler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.10. 4 ve 8 haftalık dönemlerde yeni bağ dokusu oluşumu



Şekil 4.11. 4. haftaya ait çalışma gruplarında defekt alanında bağ dokusu gelişimi. A, Kontrol grubunda bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10). B, Grup B'de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10). C, Grup C'de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 20). D, Grup D'de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10).



Şekil 4.12. 8. haftaya ait çalışma gruplarında bağ dokusu alanlarının görünümü. A, Kontrol grubunda bağ dokusu alanlarının görünümü. B, Grup B’de bağ dokusu alanlarının görünümü. C, Grup C’de bağ dokusu alanlarının görünümü. D, Grup D’de bağ dokusu alanlarının görünümü (Masson trikrom X 10).

4.2.5. Histiosit Hücre Toplulukları

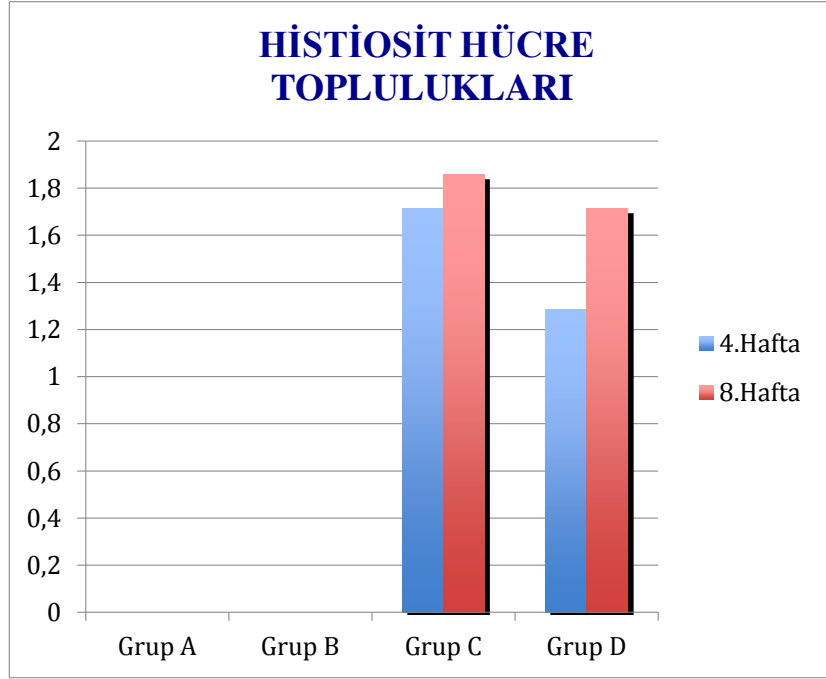
Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 4 haftalık dönemde gruplara yeni histiosit hücre toplulukları değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.14). 4. hafta histiosit hücre topluluklarının miktarı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p: 0.00$). Grup A ve B’de histiosit hücre topluluğuna rastlanmazken, Grup C’de ortalama değer 1.7143 iken Grup D’de ise ortalama değer 1.2867 görüldü (Şekil 4.13).

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 8 haftalık dönemde gruplara yeni histiosit hücre toplulukları değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.15). 8. hafta histiosit hücre topluluklarının miktarı karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.00$). Grup A ve B’de histiosit hücre topluluğuna rastlanmazken, Grup C’de ortalama değer 1.8571 iken Grup D’de ise ortalama değer 1.7143 görüldü (Şekil 4.13).

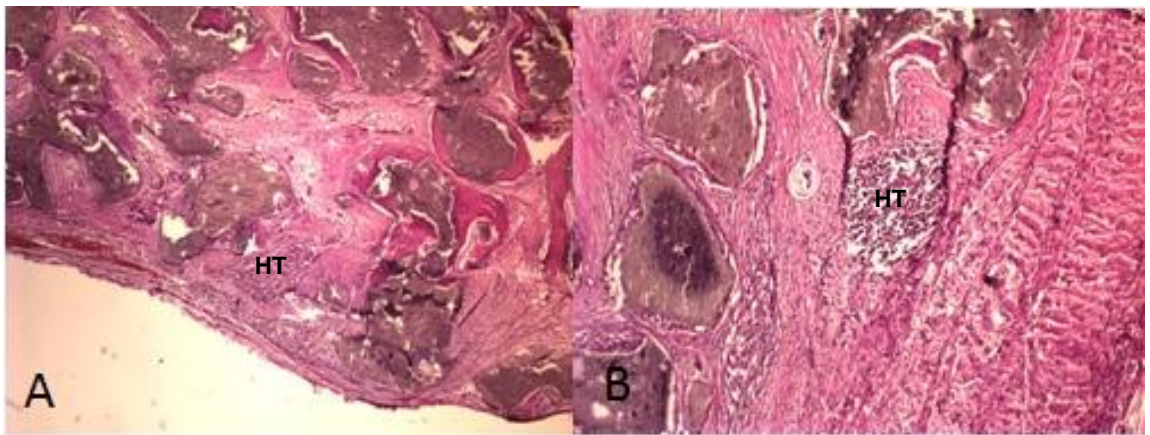
Histiosit hücre topluluklarının derecelendirilmesinde Bonferroni-Dunn testine göre gruplar arasında Grup A ile Grup C ve Grup A ile Grup D ve Grup B ile Grup C ve

Grup B ile Grup D arasında hem 4. haftada hemde 8. haftada istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p < 0,05$).

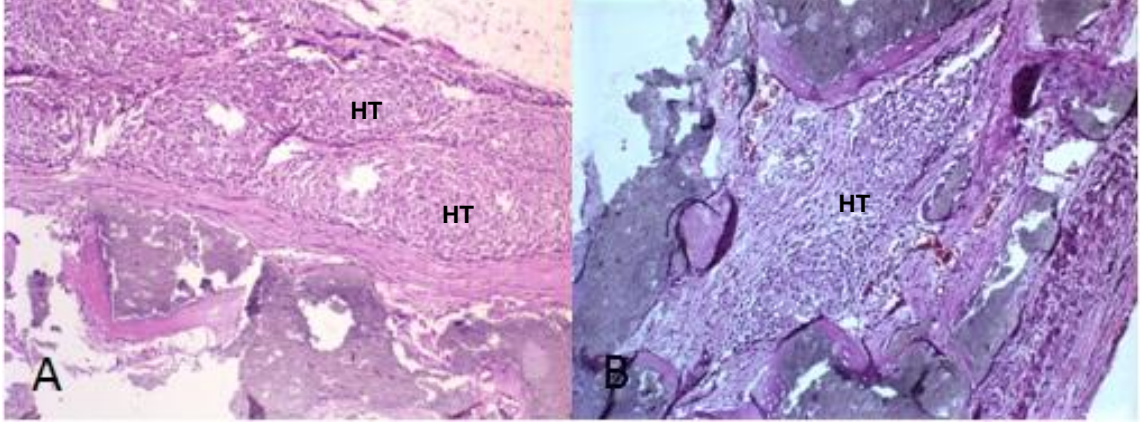
Histiosit hücre toplulukları derecelerinde 4. hafta ve 8.haftalık dönemler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmedi ($p > 0,05$).



Şekil 4.13. 4 ve 8 haftalık dönemlerde histiosit hücre toplulukları



Şekil 4.14. Dördüncü haftaya ait çalışma gruplarında histiositik hücre toplulukları. A, Grup C’de defekt yüzeyinde kümelenen histiositik hücre grupları. B, Grup D’de greft ile karışık alanlarda histiositik hücre toplulukları (Hematoksilen-Eozin X 20).



Şekil 4.15. Sekizinci haftaya ait çalışma gruplarında histiositik hücre toplulukları. A, Grup C’de defekt yüzeyinde kümelenen histiosit hücre grupları, B, Grup D’de greft ile karışık alanlarda kümelenen histiosit hücre toplulukları. (Hematoksilen-Eozin X 10)

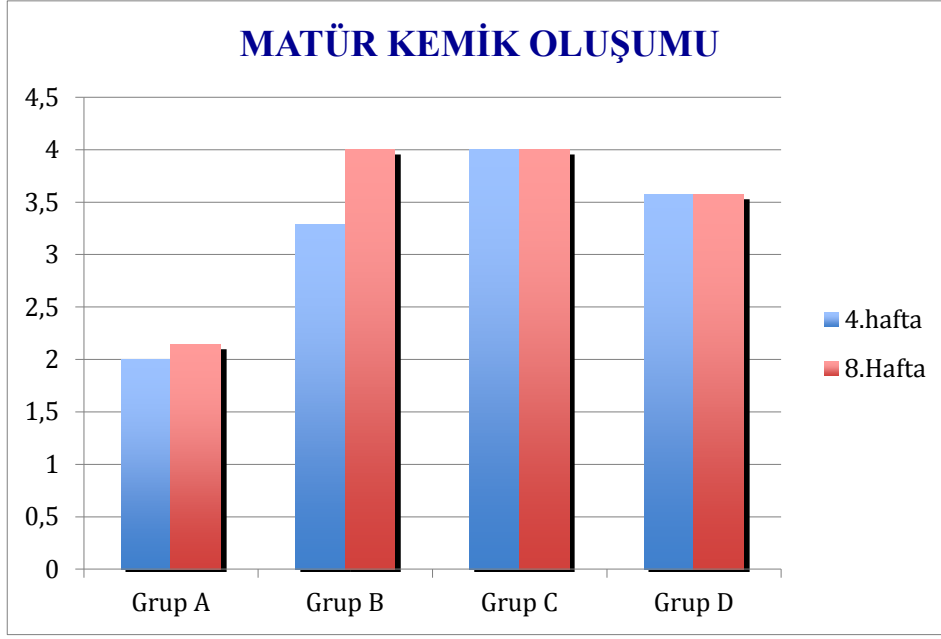
4.2.6. Matür Kemik Oluşumu

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 4 haftalık dönemde gruplara yeni matür kemik oluşum değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.17). 4. hafta matür kemik oluşumu derecelerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.051$) (Şekil 4,16).

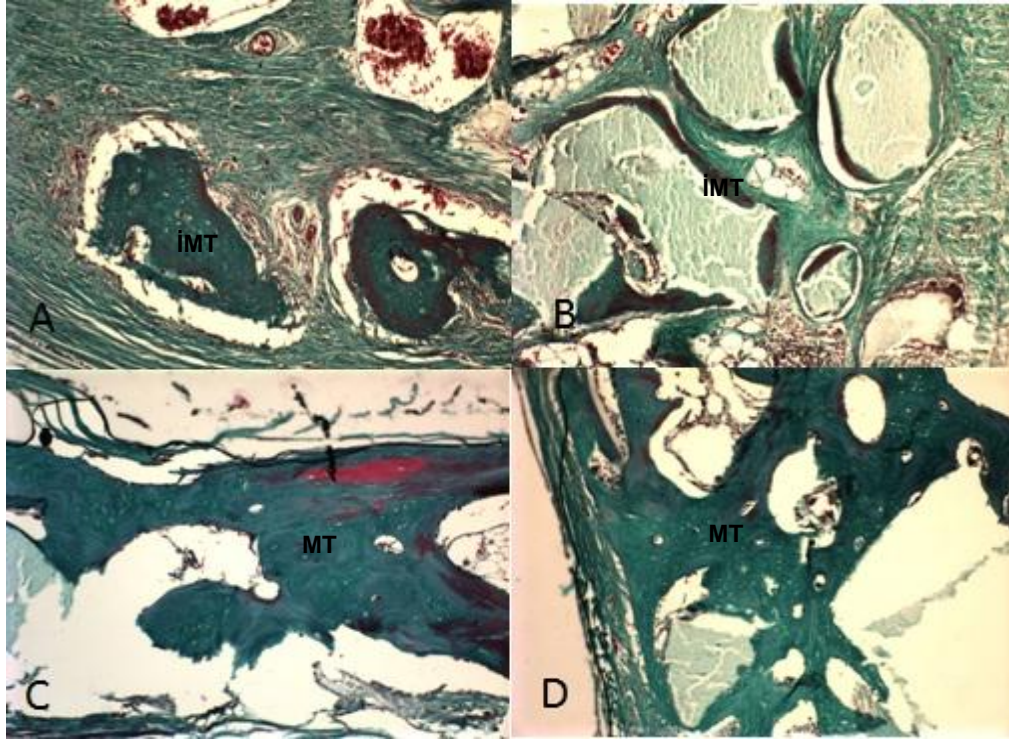
Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 8. haftalık dönemde gruplara yeni matür kemik oluşum değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.16). 8. hafta matür kemik oluşumu derecelerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu ($p=0.003$) (Şekil 4,16).

Matür kemik oluşumunda Bonferroni-Dunn testine göre gruplar arasında Grup A ile Grup C ve Grup A ile Grup D arasında 8. haftada istatistiksel olarak anlamlı farklılık görüldü ($p<0,05$).

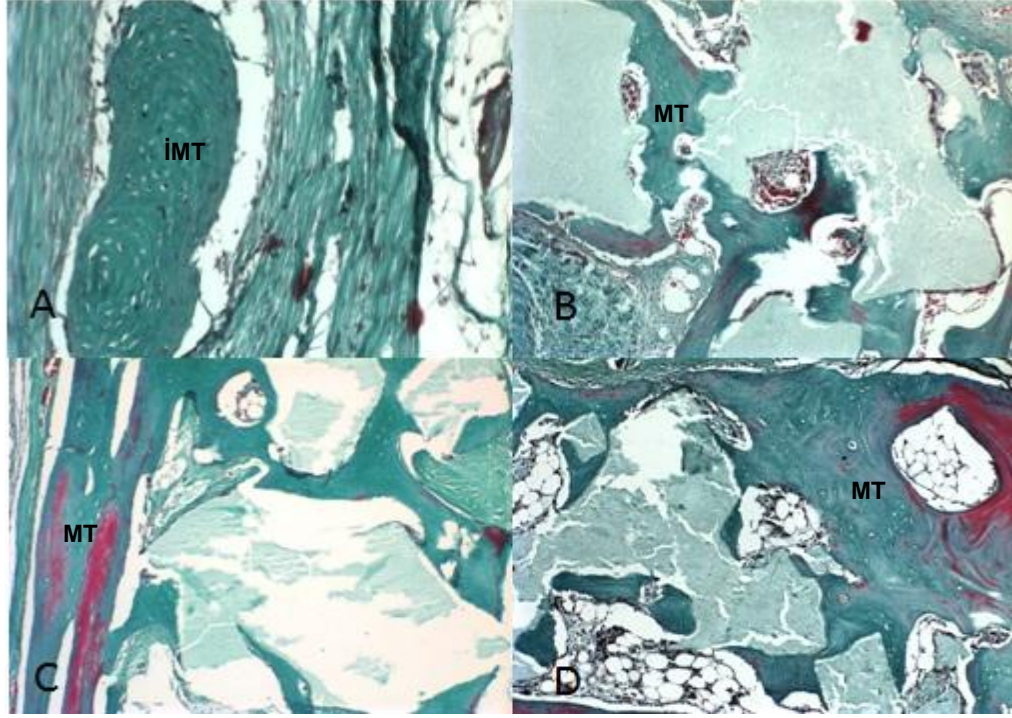
Matür kemik oluşumunda 4. hafta ve 8.haftalık dönemler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.16. 4 ve 8 haftalık dönemlerde matür kemik oluşumu



Şekil 4.17. 4.haftaya ait çalışma gruplarında maturasyon derecelerinin görünümü. A, Kontrol grubunda immatür görünümde yeni kemik oluşumu. B, Grup B’de immatür görünümde yeni kemik oluşumu. C, Grup C’de matür görünümde yeni kemik oluşumu. D, Grup D’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 10).



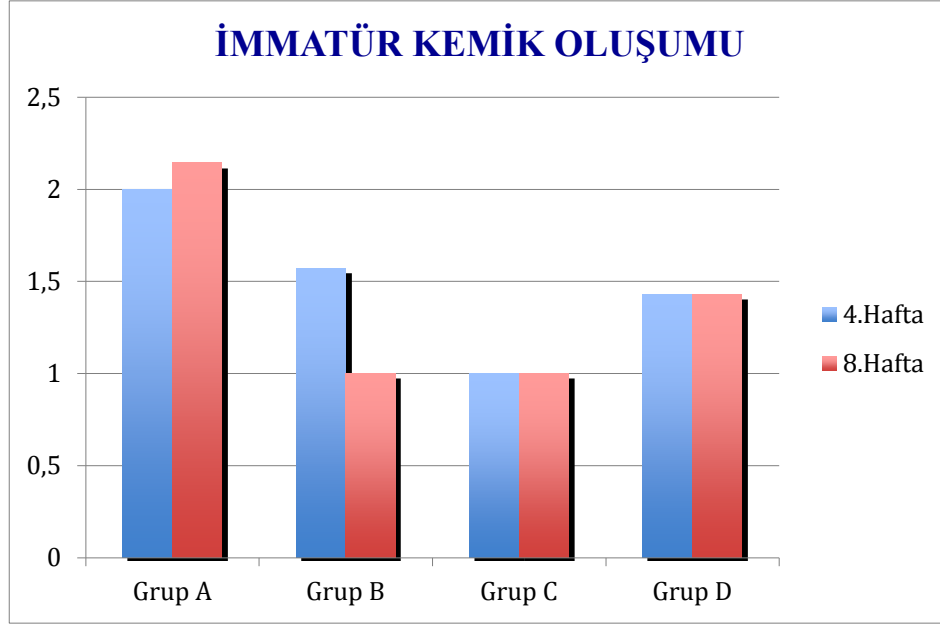
Şekil 4.18. 8.haftaya ait çalışma gruplarında maturasyon derecelerinin görünümü. A, Kontrol grubunda immatür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 20). B, Grup B’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 20). C, Grup C’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 10). D, Grup D’de matür görünümde yeni kemik oluşumu (Masson trikrom X 10).

4.2.7. İmmatür Kemik Oluşumu

4. hafta immatür kemik oluşumu derecelerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.505$) (Şekil 4.19).

8. hafta immatür kemik oluşumu derecelerine bakıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.352$) (Şekil 4.19).

İmmatür kemik oluşumunda Bonferroni-Dunn testine göre gruplar arasında 4. hafta ve 8.haftalık dönemler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç görülmedi ($p>0,05$).



Şekil 4.19. 4 ve 8 haftalık dönemlerde immatür kemik oluşumu

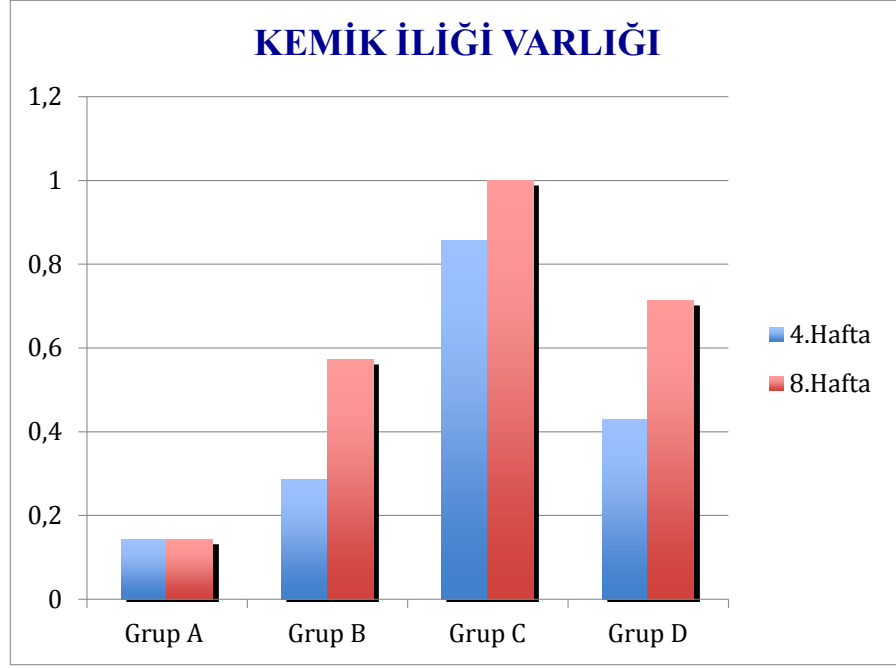
4.2.8. Kemik İliği Varlığı

Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 4 haftalık dönemde gruplara yeni kemik iliği varlığı değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.21). 4. hafta kemik iliği varlığı değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0.103$). Grup A'da ortalama değer 0,1429, Grup B'de 0,2857, Grup C'de 0,8571 ve Grup D'de 0.4286 olarak ölçüldü (Şekil 4.20).

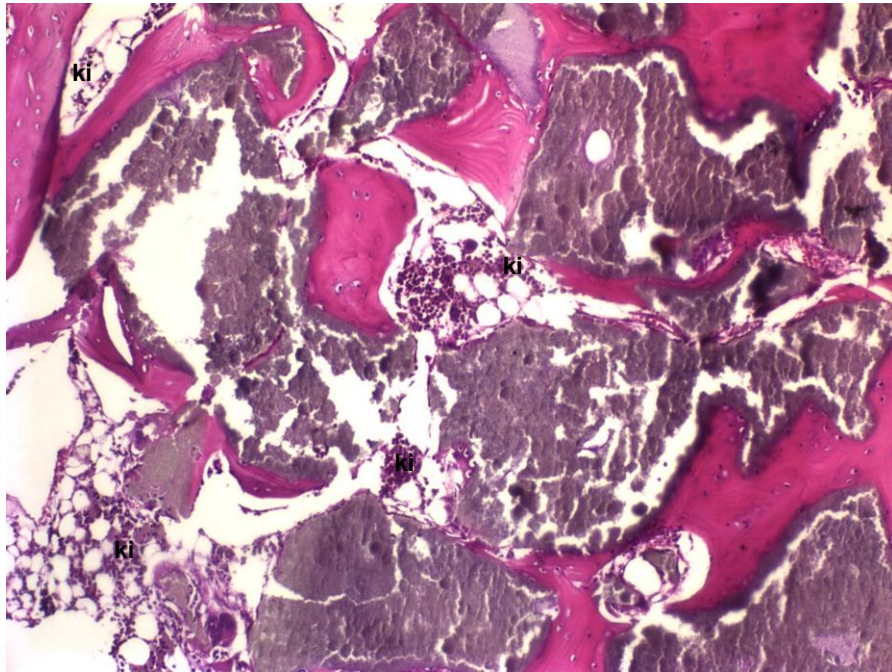
Yapılan histopatolojik incelemeler sonucunda 8 haftalık dönemde gruplara yeni kemik iliği varlığı değerleri için skorlama yapılmıştır (Şekil 4.22). 8. hafta kemik iliği varlığı değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p=0.009$). Grup A'da ortalama değer 0,1429, Grup B'de 0,5714, Grup C'de 1 ve Grup D'de 0.7143 olarak ölçüldü(Şekil 4.20).

Kemik iliği oluşumunda Bonferroni-Dunn testine göre gruplar arasında Grup A ile Grup C arasında hem 4. hemde 8. haftada istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardır ($p<0,05$).

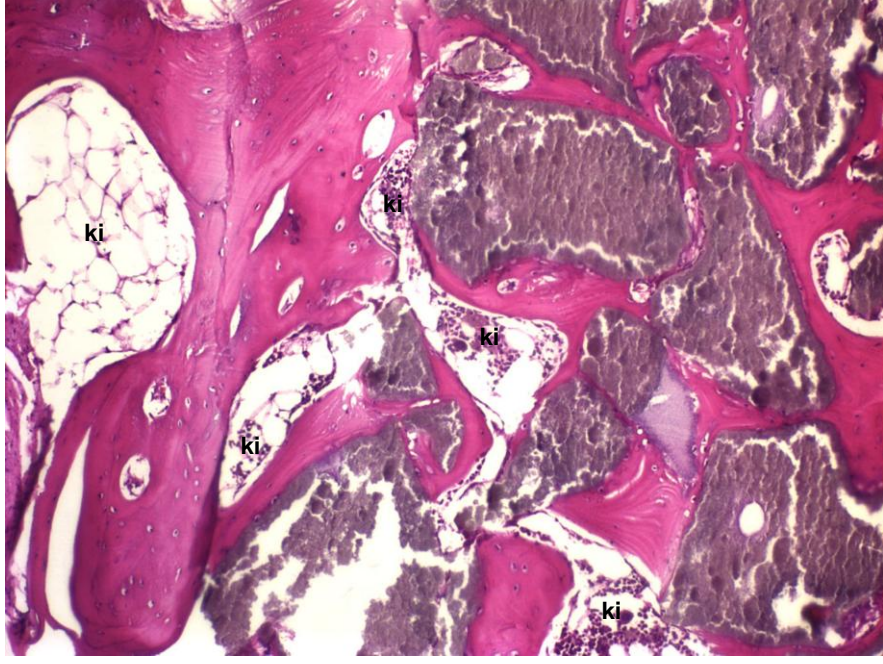
Kemik iliği oluşumunda 4. hafta ve 8.haftalık dđnemler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gđrđlmedi ($p>0,05$).



şekil 4.20. 4 ve 8 haftalık dđnemlerde kemik iliği varlığı



şekil 4.21. Dđrdüncü haftada Grup C'de kemik iliği oluşumu (Hematoksilen-Eozin X 10)



Şekil 4.22. Sekizinci haftada Grup C’de kemik iliği oluşumu (Hematoksilen-Eozin X 10)

Tablo 4.1. Histopatolojik tüm parametrelerin istatistiksel değerleri

Histopatolojik Parametreler	D1 (4 Haftalık Dönem)					D2 (8 Haftalık Dönem)				
	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	p	Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	p
	Ort \bar{x} SS	Ort \bar{x} SS	Ort \bar{x} SS	Ort \bar{x} SS		Ort \bar{x} SS	Ort \bar{x} SS	Ort \bar{x} SS	Ort \bar{x} SS	
Yeni kemik oluşumu	1.42 \bar{x} .97	1.42 \bar{x} .78	2.85 \bar{x} .69	1.8571 \bar{x} .37	.048*	1.71 \bar{x} .75	2.42 \bar{x} .78	3.00 \bar{x} .81	2.71 \bar{x} .48	.015*
İmmatür kemik gelişimi	2.00 \bar{x} 1.52	1.57 \bar{x} 1.13	1.00 \bar{x} .00	1.42 \bar{x} 1.13	.450	2.14 \bar{x} 1.57	1.00 \bar{x} .00	1.00 \bar{x} .00	1.42 \bar{x} 1.13	.212
Matür kemik gelişimi	2.00 \bar{x} 1.52	3.28 \bar{x} 1.25	4.00 \bar{x} .00	3.57 \bar{x} 1.13	.051	2.14 \bar{x} 1.67	4.00 \bar{x} .00	4.00 \bar{x} .00	3.57 \bar{x} 1.13	.003*
Kemik iliği	.14 \bar{x} .37	.28 \bar{x} .48	.85 \bar{x} .37	.42 \bar{x} .53	.072	.14 \bar{x} .37	.57 \bar{x} .53	1.00 \bar{x} .00	.71 \bar{x} .48	.013*
Histiyosit varlığı	.00 \bar{x} .00	.00 \bar{x} .00	1.71 \bar{x} .75	1.28 \bar{x} .75	.00*	.00 \bar{x} .00	.00 \bar{x} .00	1.85 \bar{x} 1.06	1.71 \bar{x} .75	.00*
Kronik inflamasyon	1.28 \bar{x} 1.11	2.71 \bar{x} .48	1.00 \bar{x} .00	1.85 \bar{x} 1.06	.027*	.85 \bar{x} .69	1.42 \bar{x} .53	1.14 \bar{x} .37	1.00 \bar{x} .00	.194
Bağ dokusu	2.85 \bar{x} .37	1.71 \bar{x} .75	1.00 \bar{x} .00	2.28 \bar{x} .48	.001*	2.14 \bar{x} .69	1.14 \bar{x} .37	1.14 \bar{x} .37	1.85 \bar{x} .69	.023*
Vasküler proliferasyon	1.85 \bar{x} .69	2.14 \bar{x} .69	2.71 \bar{x} .48	2.42 \bar{x} .78	.018*	1.57 \bar{x} .53	2.00 \bar{x} .57	2.00 \bar{x} .57	2.14 \bar{x} .69	.306

* P < 0.05 istatistiksel olarak anlamlıdır.

5. TARTIŞMA

Maksillofasiyal bölgede kemik defektleri travma, patolojik lezyonlar veya cerrahi işlemler gibi etyolojik nedenlerle ortaya çıkmaktadır. Kemik defektlerini rekonstrükte etmekte otojen kemik grefti altın standart olmasına rağmen sınırlı miktarda elde edilebilmesi, donör saha morbiditesi, operasyon süresinin uzunluğu gibi bir çok kısıtlaması vardır. Kemik defektlerinin onarımında otojen kemik greftlerinin yerine ve/veya kemik greftlerinin etkinliğini arttırabilmek amacıyla kullanılabilir otojen kandan elde edilen biyomateryallerin kullanılması gündeme gelmiştir. Sentetik greft materyallerinin doku uyumlarının otojen greftler kadar iyi olamaması sebebiyle iyileşme sürecini kısaltmak, daha kısa sürede daha yoğun kemik oluşumunu stimule etmek için BMP, TZP gibi materyaller de greftlerle karıştırılarak kullanılmaktadır (2,65,66). Bu amaçla genelde TZP kullanılmıştır. Ancak TZP elde edilmesi için birçok aşamadan geçmesi ve kimyasal madde kullanılması gerekmektedir.

TZP içerisindeki trombositlerin aktivasyonu amacıyla kalsiyum klorid veya topikal sığır trombinini kullanmaktadır. Herhangi bir vaka bildirilmemekle beraber bazı yazarlar sığır trombininin pıhtılaşma faktörü 5 ve 11' e karşı antikor oluşumuna yol açarak hayati tehlike yaratacak koagülopatilerin oluşmasına neden olabileceğini belirtmişlerdir (89-91).

2001 yılında Choukroun tarafından tanımlanan trombosit konsantrasyonlarının ikincisi olan TZF, hiç bir antikoagülan ya da sentetik madde eklemeyen ve tek aşamada hazırlanan trombositlerin ve sitokinlerin fibrin ağı içerisinde yoğunlaştırılmasıyla elde edilen otojen bir biyomateryaldir (91,92).

Bizim çalışmamızda kemik defektlerinin iyileşmesinde;

1. Tüm gruplar kontrol amaçlı boş bırakılan Grup A ile karşılaştırıldı.
2. HA/TCP greft üzerine membran olarak TZF kullanılan grup ile HA/TCP greft üzerine kollajen membran kullanılan grup (Grup C ile Grup B) karşılaştırıldı.

3. Greft olarak TZF ile HA/TCP greft materyalinin kombinasyonu üzerine kollajen membran kullanılan grup ile tek başına HA/TCP greft üzerine kollajen membran kullanılan grup (Grup D ile Grup B) karşılaştırıldı.

Grup A ve Grup B hem Grup C'nin hem de Grup D'nin kontrol grubunu oluşturmaktadır. Aynı çalışmada TZF' nin kemik defektini iyileştirme etkinliğini

1. Membran olarak kollajen membranla karşılaştırmak
2. Greftle karıştırarak greftin yalın kullanıldığı grupla karşılaştırmak amaçlanmıştır.

Çalışmamıza fibrinin yalnız başına uygulandığı bir grup eklenmemiştir. Çünkü fibrinin tek başına kullanılması kemik iyileşmesini arttırmadığı hatta normal iyileşmeyi inhibe ettiği Jung ve ark. yaptıkları çalışmalarda belirtilmiştir (93).

TZF uygulamasının yeni olması nedeniyle literatür incelendiğinde az sayıda hayvan çalışmasına rastlanmıştır. Sınırlı sayıda çalışma olmasına rağmen otojen olması ve hazırlanmasında herhangi bir katkı maddesi gerekmemesi nedeniyle direkt insanlarda kullanıldığı tespit edilmiştir. Yapılan hayvan çalışmalarının azlığı göz önüne alınarak, bu tez çalışmasında klinikte sık kullanılan TZF'nin kemik iyileşmesi üzerine etkinliğinin hem membran hem de greftle kombine olarak hayvan modellerinde incelenmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Bu çalışmada denek hayvanı olarak tavşan kullanılmıştır. Bunun nedeni hem bu hayvanın bulunmasındaki kolaylık hem de tavşandan elde edilen kan miktarının yeterli olması ve üretilen TZF içindeki trombosit sayısının tatminkâr ve insandan elde edilene yakın olmasıdır. Tavşan kanının içerdiği koagülasyon faktörleri insan kanından fazladır. Normal tavşan kanında trombosit miktarı $182.000-468.000/mm^3$ iken insan kanında normal trombosit sayısı $150.000-400.000/mm^3$ 'tür (94). Çalışmamızda tavşanın yukarıda belirtilen özelliklerinin yanısıra tavşan kafatasının planlanan deney için yeterli boyutlarda olması, histopatolojik olarak kemik iyileşmesinin tavşan kafataslarında

kolaylıkla değerlendirilebilecek olması, teminlerinin ve bakımlarının kolay olması nedeniyle erişkin Beyaz Viyana tavşanları denek olarak tercih edilmiştir.

Çalışmada kullanılan 14 adet deney hayvanlarının hiçbirinde operasyon sırasında veya sonrasında herhangi bir komplikasyon gözlenmemiştir. Bunun yanı sıra tavşanlardan kan alımı kulaklarının arka tarafındaki yoğun damarlanma nedeni ile son derece kolay bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Kemikteki aktivasyon - rezorpsiyon – formasyon aşamaları 3 ila 6 ay arasında değişir ve bu geçen periyot *sigma* ismi ile anılmaktadır. Tavşanlardaki *sigma* zamanının yalnızca 6 hafta olduğu dikkate alınınca 4 ve 8 haftalık incelemeler tavşanlarda oluşturulan kemik defektlerinin iyileşmesini anlamak için yeterli bir zaman aralığı olarak düşünülebilir (95,96).

Dodde ve ark., tavşan modelinde kafatası kritik boyut defektini saptamak amacıyla yaptıkları çalışmaya 18 adet dişi Yeni Zellanda tavşanı dahil edilmiştir. Çalışmada tavşan kafatasında 0.5-1.5 cm. çapında oluşturulan defektler spontan iyileşmeye bırakılmış ve denekler 9. ve 18. haftalarda sakrifiye edilmiştir. Örneklerdeki kemik iyileşmesi tayini, bilgisayarlı tomografi görüntüleme ve histolojik değerlendirme ile yapılmıştır. Araştırmacılar 1.5 cm.'den büyük defektlerin spontan olarak iyileşemediği ve tavşan modelinde kafatasında kritik boyut defektinin 1.5 cm olduğu sonucuna varmışlardır (97). Lee ve ark. yaptığı bir çalışmada da 10 adet Yeni Zellanda tavşanlarının parietal kemiklerine 9 mm çapında bilateral defektler oluşturulmuş, bir defekt kontrol amaçlı boş bırakılırken diğer defekt ipek fibrin ve TZF ile doldurulmuştur. 6. hafta ve 12. hafta sonunda kemik iyileşmesi üzerine etkileri incelenmiştir. 12. hafta sonunda bile 9 mm çapındaki defektlerin %100 kemikle dolmadığı, boş defektlerin ortalama % 49.86 'sı yeni kemikle dolarken çalışma grubunda % 59.83 oranında yeni kemik oluştuğu görülmüştür (98). Bizim çalışmamızda Lee ve ark. belirttiği çalışma sonuçları göz önünde bulundurularak ve 1 tavşanın kafatasına 4 adet defekt oluşturmak planlandığı için defektler arası gerekli mesafe korunarak 9 mm çapında defektler oluşturuldu. 8 hafta sonunda bile defektlerin hiç birinde %100 kemik oluşumu görülmedi.

Bizim çalışmamızda tavşan kulak veninden elde edilen 10 ml 'lik kan örnekleri antikoagulan içermeyen cam tüpler içinde santrifüj makinasına yerleştirilerek 2700 rpm'de 12 dakika santrifüj edilerek TZF elde edildi. Literatürlerde 3000 rpm de 10 dakika veya 2700 rpm'de 12 dakika santrifüj uygulamalarının herikisi de tavsiye edilmektedir (62). İki yöntem arasında literatürde bildirilmiş bir fark bulunmamaktadır. Antikoagulan kullanılmaması tüp duvarları ile doğrudan temasa geçen kandaki aktivasyonun birkaç dakika içinde başlamasına sebep olmaktadır. Fibrinojen başta tüpün üst kısmında yüksek miktarda bulunur ve tirombin fibrinojeni fibrine çevirir. Bu fibrin kısmı tüpün orta kısmında, altındaki kırmızı hücreler ve üstündeki hücresel plazma arasında kalır. Trombositlerde bu fibrin yığınları arasında kalır. Bu tekniğin başarısı kan alınma işleminin ve santrifüje transfer işleminin süresine bağlıdır (62,63).

Tunalı ve ark. yaptıkları bir hayvan çalışmasında antikoagülansız cam tüplere alternatif titanyum tüplerde hazırlanan TZF 'yi tanımlamışlardır. Titanyum tüplerin trombositlerin aktivasyonunda daha etkili olduğu ve cam tüplerin içindeki silikanın olası zararlı etkilerini ortadan kaldırdığı için tercih edildiğini belirtmişlerdir (99). Ancak titanyum tüplerle ve cam tüplerle hazırlanan TZF'nin karşılaştırmalı çalışması henüz literatürde bulunmamaktadır.

Membranlar yaygın olarak yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda kullanılmaktadır. Kollajen membranlar genellikle sığır, domuz veya at kollajen tip 1 ve 3'ün karışımından oluşmaktadır. Kollojenin osteogenezise etkisi Taguchi ve ark. tarafından gösterilmiştir. Kollojen fiberlerin osteoindüktif etkisinin olduğunu ancak etki mekanizması henüz belirsiz olduğunu belirtmişlerdir. Takata ve ark. kollajenin osteoblastik hücre proliferasyonu için uygun bir iskelet olduğunu yaptıkları bir in-vivo çalışmada göstermişlerdir (100).

Gassling ve ark. yaptıkları in-vitro bir çalışmada TZF'nin insan periosteal hücre proliferasyonu için kollojen membrana göre daha iyi bir iskelet oluşturduğu ve kemik doku mühendisliğinde periosteal hücre kültürü için uygun olduğu görülmüştür. TZF membranının kollajen membrana göre hücre proliferasyonunda daha iyi bir iskelet oluşturmasını daha düz bir yüzeyinin olmasına ve TZF'nin içindeki trombositlerden

salınan büyüme faktörlerinin varlığına bağlamışlardır (101). Gassling ve ark. yaptıkları diğer bir in-vitro çalışmada TZF membranın kollajen membrana göre osteoblast hücre proliferasyonunu aktive etmede daha başarılı olduğu gösterilmiştir (102).

Arnold ve ark. yaptıkları in-vitro bir çalışmada sentetik rezorbe karışım olan PGLA polimer (poly glycolic asid-co- laktik asid), β -TCP ve fibrinin periosteal hücrelerin osteojenik hücrelere farklılaşmasını ve proliferasyonunu arttırdığını öne sürmüşlerdir (103). Vital fibrinin periosteal hücrelerin ve kök hücrelerin transplantasyonunda otojen bir iskelet görevi gördüğü biyouyumlu, rezorbe olabilen ve yara iyileşmesinde önemli bir rol oynayan, ayrıca anjiogenezisde ve yeni doku remodelasyonunda görevli fibroblast ve endotelial hücrelerin migrasyonu için matriks görevi gören TZF'nin in-vivo kullanımı yaygınlaşmıştır.

Choukroun ve ark. 2006 yılında TZF'yi trombosit sitokinleri ve hücrelerinin hapsediği bir fibrin matriks olarak tanımlamışlardır (58,62,63). Yayımlanan birçok çalışmada fibrinin insan kök hücrelerinin kolonizasyonu için uygun bir iskelet olduğu bildirilmiştir (62,63). Ancak TZF'nin membran olarak kullanılmasıyla ilgili literatürde in-vivo çalışmaya rastlanılmamıştır.

Marx'a göre büyüme faktörlerinin ilk yayılımlarından sonra trombositler mevcut 7 günlük yaşam süreleri içinde ek büyüme faktörü sentezlemekte ve salınımlarını sağlamaktadırlar. Önce trombositler tükenmekte ve teker teker yaşamlarını kaybetmektedirler. Makrofajlar yara iyileşmesi için aynı büyüme faktörlerinin salınımlarını sağlayarak trombositlerin fonksiyonlarını üstlenmektedirler. Marx ve arkadaşları, TZP gibi trombositten zengin bileşenlerinin trombosit sayısını artırdığını, yetişkin mezenşimal ilik hücrelerinin proliferasyonu ve farklılaşma oranının direkt olarak trombosit konsantrasyonu ile alakalı olduğunu savunmaktadır (104). Bu bilgiler ışığında, bizim çalışmamızda TZF membran kullanılan gruplarda neden daha fazla yeni kemik oluşumu meydana geldiği açıklanabilir.

TZF ile enfekte soketleride içeren birçok soket koruma çalışması yapılmış ve yapılan çalışmalarda soketlerde iyileşme sırasında oluşan yüksek enfeksiyöz ve

enflamatuar reaksiyonlara rağmen çok hızlı iyileşme sağlandığı görülmüş, hastaların hiç birinde ağrı, alveolit, purulen enfeksiyonlar gibi komplikasyonlar oluşmadığı görülmüştür (105).

Bir vaka çalışmasında maksiller bölgede kist kavitesine TZF yerleştirilerek yeni kemik oluşumu değerlendirilmiştir. Normalde kist kavitesinde tam bir iyileşme olması için gereken sürenin 6 ay-1 yıl arasında değiştiği belirtilmiştir. Ancak bu çalışmada 2. ayda tam bir iyileşme olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda; fibrin matriks kan pıhtısından daha organize olduğu için iyileşme için gerekli olan elemanların çok hızlı bir şekilde ortama geldiği ve daha verimli bir şekilde doğrudan kök hücre değişimi ve iyileşme programını başlattığı fikri savunulmuştur (105).

Yapılan çalışmalarda TZF'nin kemik iyileşmesini hızlandırdığını gösteren sonuçlara rastlanmıştır (2,105, 106). Literatürle uyumlu şekilde bizim çalışmamızda da TZF'nin membran olarak ve greftle kombine olarak kullanılan gruplarda yeni kemik oluşumu diğer gruplara göre daha fazla görülmüştür.

Marx ve ark., yüksek konsantrasyondaki TZP'nin, osteoklastogenezi inhibe eden osteoprotegerin salınımına neden olabileceğini ve osteoblastik hücre proliferasyonunu stimüle edebileceğini savunmaktadırlar (107). Ancak bazı çalışmalarda trombosit kaynaklı büyüme faktörlerinin kemik iyileşmesi üzerine anlamlı etkilerinin olmadığı savunulmaktadır. Bazı araştırmacılar ise yüksek konsantrasyondaki TZP'nin şiddetli trombosit aktivasyonu oluşturması sonucu hücre çoğalmasını ve yeni kemik oluşumunu inhibe ettiğini ileri sürmüşlerdir (108-111). Bizim çalışmamızda TZF'nin membran ya da greftle kombine olarak kullanıldığı Grup C ve Grup D'de yeni kemik oluşumu hem 4. hem de 8. haftalarda diğer gruplara göre daha yüksek orandadır. Bu bulgular TZF'nin kemik defektlerinin iyileşmesinde olumlu etkileri olduğunu desteklemektedir.

TZP ve TZF etkinliğini karşılaştıran çalışmalarda; TZF pıhtısının santrifüj sırasında doğal polimerizasyon süreci sonucunda oluşan doğal fibrin yapısıyla büyüme faktörleri ve matriks glikoproteinlerinin yavaş salınımı mümkün olduğu belirtilmiştir (≥ 7 gün). Bu tip bir yavaş salınım mekanizması TZP tekniklerinde mümkün değildir.

Bu nedenle TZF uygulandığı bölgede TZP gibi Şiddetli trombosit aktivasyonuna neden olmamaktadır (112). Aynı zamanda TZP bileŐimine, elde edilmesinin son aşamasında koagölasyon ve ani fibrin polimerizasyonunun oluşması için sığır trombinini ve kalsiyum klorür eklenir. PıhtılaŐmayı sağlamak için ilave edilen trombin toksiktir. Bunun sonucunda bazı bireylerde iyileşme sırasında güçlü bir immün reaksiyon oluŐabilmekte ve buna bağlı olarak negatif iyileşme gerçekteŐebilmekte olduğu belirtilmiştir. TZF de ise karakteristik olarak santrifüj iŐlemi sırasında yavaş ve doğal bir polimerizasyon oluşur ve sığır trombin eklenmediği için toplanan otolog fibrinojen üzerindeki etkili trombin konsantrasyonları ile istenilen fizyolojik membran yapının elde edilmesi sağlanmış olur. Bu sayede fizyolojik iyileşme fazına destek olmaktadır.

TZF ile ilgili yayınlanmış makalelere baktığımızda TZF'nin membran olarak uygulandığı bir çok in-vitro çalışma yapılmıŐken, in vivo çalışmaya rastlanılmamıştır (51,100,101). Ancak yeni yayınlanan bir makalede TZF sinus lift cerrahisinde lateral pencereye membran olarak uygulanmış ve kollajen membranla karŐılaŐtırılmıŐtır. İkinci bir operasyonla implant cerrahisi sırasında trephin frezle örnekler alınıp histopatolojik olarak kemik kalitesi ölçölmüş ve iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görölmemiŐtir (113). Bizim çalışmamızda ise TZF membran olarak uygulandığında yeni kemik oluşumu en yüksek değerde görölmüş ve istatistiksel olarak anlamlı sonuç çıkmıştır. Ayrıca greftle kombine olarak çekim soketi koruma ve sinus lift cerrahisinde yapılan çalışmalar olmakla birlikte genelde TCP greft materyali, otojen ve allojenik kemik grefti ile karŐıtılarak uygulanmıştır (114-116). Bizim çalışmamızda farklı olarak greft materyali olarak %60 HA/%40 TCP içeren bifazik kalsiyum fosfat greft materyali kullanılmıştır. Ancak yeni yayınlanacak bir makalede TZF allojenik, otojen ve bifazik kalsiyum fosfat kemik greftiyle karŐıtılmıŐ ve yalnız başına tavşan kafatasında oluşturulan defektlere uygulanmış ve üzerleri titanyum membranla örtölmüştür. Bu çalışmanın sonucuna göre TZF yalnız başına uygulanan grupta yeni kemik oluşumunda daha iyi sonuçlar görölmüştür. Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görölmemiŐtir (117). Bu çalışmanın sonucuna benzer Şekilde bizim çalışmamızda da TZF bifazik kalsiyum fosfat greftiyle karŐıtılarak uygulandığında, sadece greft kullanılan gruba göre daha iyi yeni kemik oluşumu görölürken istatistiksel olarak anlamlı bir fark görölmemiŐtir.

Bulgular genel olarak değerlendirildiğinde kullandığımız TZF, kollajen membranın ve HA/TCP greft materyallerinin doku ile uyumlarının iyi olduğu görülmüştür. Histopatolojik kesitlerde greft materyalinin yalın olarak veya TZF ile kombine olarak kullanıldığında kemiğe direkt olarak bağlanabildiği ve arada fibröz doku oluşumuna izin vermediği görülmüştür.

Trombosit kaynaklı biyomateryallerin oral ve maksillofasial cerrahide kullanımı gündeme gelmiş ve yapılan çalışmalarla kemik rejenerasyonunu hızlandırdığı, kemik matürasyonu ve yoğunluğunu arttırdığı gösterilmiştir (2,107,113,118). Trombosit konsantrasyonlarından son jenerasyon TZF'nin etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada 4. ve 8. haftalarda TZF'nin membran olarak kullanıldığı grupta yeni kemik oluşumu diğer çalışma gruplarıyla kıyaslandığında en yüksek oranda görülmüştür. Sonuçların 4 ve 8 haftalar için benzer olması TZF'nin sadece kısa dönemde yeni kemik oluşumunu hızlandırmadığını uzun dönemde de yeni kemik oluşumunda etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca örnekler makroskopik olarak incelendiğinde TZF'nin hem 4 haftalık hemde 8 haftalık dönemlerde varlığını koruduğu, rezorbe olmadığı görülmüştür. 4 ve 8. haftalarda yeni oluşan kemik dokusunda kemik iliği varlığına baktığımızda Grup C'de en yüksek değer görülürken bunu sırasıyla Grup D, Grup B ve Grup A izlemektedir ve gruplar arası fark istatistiksel olarak anlamlıdır. Kemik iliği varlığının Grup C'de en fazla olması yeni kemik oluşumuna paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda yeni oluşan kemik dokusunun matür ve immatür komponent oranlarına baktığımızda gruplar arasında sadece 8. haftada matür kemik oluşumunda istatistiksel olarak anlamlı sonuç görüldü. 8. hafta matür kemik miktarı derecelerinde en yüksek değer TZF'nin membran olarak kullanıldığı grupta görüldü. Bu bulgu ışığında TZF'nin membran olarak kullanılmasının kemik matürasyonunu hızlandırdığını düşünülmüştür.

TZF'nin HA/TCP greft materyali ile karıştırılarak uygulandığı grupta yeni kemik, matür ve immatur kemik oluşum oranları, HA/TCP greftin tek başına uygulandığı grupla benzer sonuçlar vermiştir. Yapılan çalışmanın sonuçlarına göre kemik iyileşmesi yönünden olumlu sonuçlar gösterse de, TZF'nin greft materyali ile

kariştirilerek kullanılması yeni kemik dokusu oluşumuna ve kemik matürasyonuna anlamlı ölçüde katkı sağlamamıştır.

Dördüncü hafta enflamasyon derecelerinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunurken en yüksek değer Grup B'de belirlenmiştir ve bunu sırasıyla Grup D, Grup A, Grup C izlemiştir. TZF'nin yapısında bulunan büyüme faktörlerinden biri olan TGF- β güçlü antiinflamatuvar etkiye sahiptir (65). Bu antiinflamatuvar etki 4. haftada TZF'nin membran olarak kullanıldığı grupta en düşük enflamasyon derecelerine rastlanmış olmasını açıklayabilir. 4. haftada çalışma gruplarında belirlenen enflamasyon derecesinin 8. haftada belirgin ölçüde azaldığı görülmüştür. Enflamasyondaki belirgin azalma kemik iyilişme sürecinde beklenen bir sonuçtur.

Vasküler proliferasyonlar dereceleri değerlendirildiğinde çalışmamızda 4 haftalık dönemde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülürken, 8 haftalık dönemde istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir. Kısa dönemde Grup C'de vasküler proliferasyon derecesi en yüksek görülürken bunu sırasıyla Grup D, Grup B, Grup A izlemektedir. TZF'nin yapısında bulunan büyüme faktörlerinden VEGF ve PDGF'nin angiogenezi stimüle edici etkisi sayesinde vasküler proliferasyonun en yüksek oranda TZF'nin membran olarak ve greftle kombine olarak uygulandığı defektlerde oluşumu açıklanabilir (85).

Yeni oluşan bağ dokusu değerlendirildiğinde kısa ve uzun dönemlerin her ikisinde de gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıktığı görülmektedir. Her iki dönemde de yeni bağ dokusu oluşumunda en yüksek değer Grup A'da görülürken bunu takiben sırasıyla Grup D, Grup B ve Grup C'de ise en düşük değer görülmüştür. Sanılanın aksine, greftle kombine olarak TZF'nin uygulandığı defektlerde bağ dokusu oluşumu oranı kontrol grubu ile benzer oranlarda bulunmuştur. TZF 'nin membran olarak kullanılması kemik defektinde yeni bağ dokusu oluşumunu azalttığı böylece yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu için uygun bir ortam hazırladığı düşünülmüştür.

Histiosit hücre toplulukları incelendiğinde sadece TZF konulan gruplarda rastlanıldığı hatta TZF'nin membran olarak kullanıldığı defektlerde TZF membran

yüzeyinde, greftle kombine TZF uygulanan gruplarda ise defektin içinde dağınık olarak yerleştikleri histopatolojik inceleme sonrası fark edilmiştir. TZF'nin histiositlerin yerleşimi için çatı görevi yaptığı düşünülmüştür. 4 haftalık ve 8 haftalık dönemlerin herikisinde de histiosit hücre toplulukları derecelendirmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu görülmüştür. Grup C'de en yüksek görülürken Grup D ikinci sıradadır. TZF olmayan gruplarda histiosit hücre topluluklarına rastlanmamıştır. Bağışıklık sisteminin bir bölümünü oluşturan kemik iliğinde üretilen histiosit hücre topluluklarının sadece TZF olan bölgede görülmüş olması, TZF'nin içindeki büyüme faktörlerinin bu hücrelerin kemotaksisini stimule ettiğinin bir göstergesi olabilir. Bu konuyla ilgili daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Günümüzde diş hekimliği alanında kullanımı giderek yaygınlaşan TZF'nin, kemik defektlerinin iyileşmesinde membran veya greft materyali ile kombine olarak uygulanmasının etkilerini araştıran bu çalışmanın sonuçlarına göre;

- Tavşan modeli TZF çalışmalarında iyi bir model olarak düşünülebilir. Çalışılan 14 adet tavşanın hiçbirinde ameliyatlar sırasında veya sonrasında herhangi bir komplikasyon gelişmemiştir.
- Tavşan kafatasında oluşturulan defektlerin tedavisinde TZF'nin membran olarak kullanılması başarılı sonuçlar vermiştir. Özellikle yeni kemik oluşumunda, matür kemik ve kemik iliği oluşumunda, vasküler proliferasyonda gruplar arasında en iyi sonuçlar TZF'nin membran olarak kullanıldığı grupta görülmüştür.
- HA/TCP greft ve üzerine kollajen membran kullanılan grup ile karşılaştırıldığında greft olarak TZF ve HA/TCP kombinasyonu üzerine kollajen membran kullanılan grupta yeni kemik oluşumunda, matür kemik ve kemik iliği oluşumunda, vasküler proliferasyonda istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha başarılı sonuçlar görülmüştür.
- TZF'nin membran olarak kullanıldığı grupta inflamasyon en düşük düzeyde bulunurken, HA/TCP greft üzerine kollajen membran uygulanan grupta en yüksek düzeyde olduğu belirlenmiştir.
- TZF'nin membran olarak kullanıldığı grupta yeni bağ dokusu oluşumunun en düşük düzeyde, boş bırakılan grupta ise beklenen şekilde en yüksek düzeyde olduğu görülmüştür.
- Histopatolojik inceleme sonrası TZF'nin hem membran olarak hem de greft içerisinde histiosit hücre toplulukları için çatı oluşturduğu izlenmiştir.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, oral ve maksillofasial cerrahide bariyer membran olarak kollajen membran yerine hastanın kendi kanından elde edilen, hazırlanması kolay, maliyeti düşük, bol miktarda büyüme faktörü ve sitokin içeren TZF'nin membran olarak kullanılması önerilebilir.

Greft materyali ile kombine olarak TZF uygulanması yeni kemik oluşumuna olumlu katkıda bulunur ancak kemik matürasyonunun TZF'nin membran olarak kullanıldığı durumda daha başarılı olacağı göz önünde bulundurulmalıdır.

7. KAYNAKLAR

1. ABIRAMAN, S., VARMA, HK., UMASHANKAR, PR., JOHN, A. (2002). Fibrin glue as an osteoinductive protein in a mouse model. *Biomaterials*. **23**: 3023-3031
2. ANITUA, E., ANDIA, I., ARDANZA, B., NURDEN, P., NURDEN, AT. (2004). Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* **91**: 4-15.
3. ASPENBERG, P., VIRCHENKO, O. (2004). Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* **75**(1): 93-99
4. AYBAR, ODSTRCIL, A., TERRITORIALE, E., MISSANA, L. (2005) An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontol Latinoam*. **18**: 63-7.
5. DOHAN, EHRENFEST, DM., BIELECKI, T., JIMBO, R., BARBÉ, G., DEL, CORSO, M., INCHINGOLO, F., SAMMARTINO, G. (2012). Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol*. Jun;**13**(7):1145-52. Review. PubMed PMID: 21740377.
6. DOHAN, EHRENFEST, DM., DE, PEPPA, GM., DOGLIOLI, P., SAMMARTINO, G. (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*. Feb;**27**(1):63-9.7.
7. BANCROFT, JD., STEVENS, A. (1996). Theory and Practice of Histological Techniques. 4th ed. Churchill Livingstone, Newyork, Chapter 15, page 309-339.
8. ONAT, T., EMERK, K., SÖZMEN, E. (2002). İnsan Biyokimyası, 1.Basım, Ankara Palme Yayıncılık 2002;605.
9. AKAY, M.T. (2001). Genel Histoloji, Beşinci Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
10. ERDOĞAN, D., GÖRGÜN, M., HATİBOĞLU, MT., ILGAZ, C. (1999). Genel Histoloji 2. Baskı, Ankara, Hatiboğlu Yayınevi.
11. MÜFTÜOĞLU, S.F. (2005). Kemik Dokusu. Erişim:[http://www.medinfo.hacettepe.edu.tr/ders/TR/D2/1/1930_files/frame.htm#slide_0024.htm]. Erişim Tarihi: 08.02.2006.
12. GARG, KA. (2004). Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants. 1th ed. China, Quintessence Publishing, p1-13
13. KIERSZENBAUM, AL. (2002). Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology, 1st ed. Mosby Inc., St. Louis, Chapter 5, page 131.

14. JUNQUEIRA, LC, CARNEIRO, J. (2003). Basic Histology, 10th ed., McGraw-Hill, New York, Chapter 8, page: 144-146, 2003
15. FAWCET, D.W. (1994). Bloom and Fawcet: A Textbook of Histology, Twelfth Edition, Chapman & Hall, New York.
16. BOZKAYA, S. (2005). Deproteinize ve Demineralize Kemik Greftlerinin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Doktora Tezi, Ankara.
17. SODEK, J., MCKEE, M.D. (2000). Molecular and Cellular Biology of Alveolar Bone, *Periodontol.* 2000, **24**, 99-126.
18. FONSECA, RJ., WALKER, RV. (1991). Oral and Maxillofacial Trauma, 1.ed Philadelphia W.B. Saunders Company, p 31-44..
19. AYTEKİN, Y., SOLAKOĞLU, S. (2006). Histoloji Kemik Dokusu, 1. Basım, İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, p141-246.
20. EROSCHENKO, VP. (2001). Histoloji Atlası fonksiyonel ilişkileriyle. Demir R. 9. Baskı, Ankara, Palme Yayıncılık, 2001.
21. ERKOÇAK, A. (1975). Genel Histoloji, Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara.
22. SOYDAN, N. (1992). Genel Histoloji, İstanbul.
23. MILORO, M. (2004). Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery, second edition. BC Decker Inc. 783-802.
24. MILLER, MARK, D. (1996). Review of Orthopaedics. 2nd edition. 1-22
25. KHAN, SN. (2000). Bone growth factors:Orthop. *Clin. North Am.* **31**(3):375-388
26. JILKA, RL. (2003). Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. *Med Pediatr Oncol*, **41**:182-5.
27. OPPENHEIMER, AJ., MESA, J., BUCHMAN, SR. (2012). Current and emerging basic science concepts in bone biology: implications in craniofacial surgery. *J Craniofac Surg. Jan*; **23**(1):30-6.
28. FROMMELT, H. (1987). Polymers for medical applications. *Macromol Chem Makromol Symp*, **12**:281
29. PRIPATNANONT, P., NUNTANARANONT, T., VONGVATCHARANON, S. (2009). Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **38**: 356-362.
30. VAN, MEEKREN, J. (1982). *Observationes medicochirurgicae*. Amsterdam:

Henrici and Bloom.

31. OLLIER, L. (1867). Traite Experimental et Linique de la Regeneration des Os et de la Production Artificielle du Tissue Osseux. Paris: Masson et Fils.
32. BARTH, A. (1893). Uber histologische Befunde nach Knochenimplantation. *Arch Klin Chir*, **46**:409
33. HUPP, J.R., ELLISE, TUCKER, M.R. (2008). Contemporary oral and maxillofacial surgery 5th edition. *Mosby*; 605-18.
34. BURCHARDT, H. (1987). Biology of bone transplantation. *Orthop Clin North Am*; **18**(2):187–196
35. MULLIKEN, JB., KABAN, LB., GLOWACKI, J. (1984). Induced osteogenesis: the biological principle and clinical applications. *J Surg Res*; **37**:487–496 12.
36. HESLOP, BF., ZEISS, IM., NISBET, NW. (1960). Studies on transference of bone: I. A comparison of autologous and homologous bone implants with reference to osteocyte survival, osteogenesis, and host reaction. *Br J Exp Pathol*, **41**:269–287
37. GROSS, TP., JINNAH, RH., CLARKE, HJ., COX, QG. (1991). The biology of bone grafting. *Orthopedics*, **14**(5):563–568
38. SCHMITZ, JP., HOLLINGER, JO. (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res*, **205**:299–308
39. JABLANSKI, S. (1982). Illustrated Dictionary of Dentistry. W.B.Saunders Company, Philadelphia.
40. BOYNE, P.J. (1984). Tissue Transplantations. in: Textbook of Oral and Maxillofacial Surgery. *Kruger G.O.* (ed) 6th ed., C.V. Mosby Co., St. Louis p: 296 - 332.
41. BERNARD, G.W. (1991). Healing and Repair of Osseous Defects; *Dental Clinics of North America*, **35**(3), 469-77.
42. SCHELIEPHAKE, H., LAGNER, M. (1997). Reconstruction of the mandible by prefabricated autogenous bone grafts; *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, **26**, 244-252.
43. ERSU, B. (2007). İmplant dış hekimliğinde kullanılan ağız içi otojen kemik greftleri. *Cumhuriyet Üniv. Diş Hek. Fak. Dergisi*, Cilt: **10**(2):135-140.
44. BUSER, D., DULA, K., BELSER, U., HIRT, H.P. & BERT- HOLD, H. (1993). Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. 1. Surgical procedure in the maxilla. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* **13**: 29–45.
45. ROTHAMEL, D., SCHWARZ, F., SAGER, M., HERTEN, M., SCULEAN, A. BECKER, J. (2005). Biodegradation of differently crosslinked collagen

- membranes: an experimental study in the rat. *Journal of Clinical Oral Implants Research* **16**: 369–378.
46. ALBERIUS, P., DAHLIN, C., LINDE, A. (1992). Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull: a study in adult rats using a membrane technique. *J Oral Maxillofac Surg.* Aug;**50**(8):829-834.
 47. MELLADO, JR., SALKIN, LM., FREEDMAN, AL., STEIN, MD. (1995). A Comparative study of ePTFE periodontal membranes with and without decalcified freeze-dried bone allografts for the regeneration of interproximal intraosseous defects. *J Periodontol.* Sep;**66**(9):751-755.
 48. TUSKAN, C. (2002). Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateryaller. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yayınları no 100, İstanbul.
 49. BUNYARATAVEJ, P., WANG, H.L. (2001). Collagen membranes: a review. *Journal of Periodontology*, **72**: 215–229.
 50. TAGUCHI, Y., AMIZUKA, N., NAKADATE, M., OHNISHI, H., FUJII, N., ODA, K., NOMURA, S., MAEDA, T. (2005). A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*, **26**: 6158–6166.
 51. GASSLING, V., HEDDERICH, J., AÇIL, Y., PURCZ, N., WILTFANG, J., DOUGLAS, T. (2013). Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res.* Mar;**24**(3):320-8.
 52. CLARK, RA. (2001). Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci.*, **936**:355-67.
 53. COLLEN, A., KOOLWIJK, P., KROON, M., VAN, HINSBERGH, VW. (1998). Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary like tubules by human microvascular endothelial cells. *Angiogenesis*, **2**:153-65.
 54. VAN, HINSBERGH, VW., COLLEN, A., KOOLWIJK, P. (2001). Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci.*, **936**:426-37.
 55. WHITMAN, DH., BERRY, RL., GREEN, DM. (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg.*, **55**: 1294-1299.
 56. DOHAN, DM., RASMUSSEN, L., ALBREKTSSON, T. (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*; **27**: 158-167.
 57. DOHAN, DM., CHOUKROUN, J., DISS, A., DOHAN, SL., DOHAN, AJ., MOUHYI, J., GOGLY, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **101**: e51-55.

58. INTINI, G. (2009). The use of platelet rich plasma in bone reconstruction therapy. *Biomaterials*, **30**:4956-4966.
59. MANNAIONI, P.F., DI BELLO, M.G. MASINI, E. (1997). Platelets and inflammation: role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine. *Inflammation Research*, **46**: 4–18.
60. MOSESSON, M.W. (2005). Fibrinogen and fibrin structure and functions. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **3**: 1894–1904.
61. DOHAN, DM., CHOUKROUN, J., DISS, A., DOHAN, SL., DOHAN, AJ., MOUHYI, J., GOGLY, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **101**: e37-44.
62. DOHAN, DM., CHOUKROUN, J., DISS, A., DOHAN, SL., DOHAN, AJ., MOUHYI, J., GOGLY, B. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **101**: e45-50
63. ANITUA, E., SÁNCHEZ, M., ORIVE, G., ANDÍA, I. (2007). The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, **28**: 4551-4560
64. BORDER, WA., NOBLE, NA. (1994). Transforming growth factor beta in tissue fibrosis. *N Engl J Med*, **331**: 1286-1292.
65. LIEBERMAN, JR., DALUŠKÍ, A., EINHORN, TH. A. (2002). The role of growth factor in the repair of bone: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. **84**-A: 1032-1044
66. BARRIENTOS, S., STOJADINOVIC, O., GOLINKO, MS., BREM, H., TOMICCANIC, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen*, **16**:585–601.
67. ANDRAE, J., GALLINI, R., BETSHOLTZ, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*, **22**:1276–1312.
68. GRAHAM, S., LEONIDOU, A., LESTER, M., HELIOTIS, M., MANTALARIS, A., TSIRIDIS, E. (2009). Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs*, **18**:1633–1654.
69. SU, Y.C., KUO, YP., TSENG, YH., SU, CH., BURNOUF, T. (2009). In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **108**: 56-61.
70. RUIZ, DE., ALMODOVAR, C., LAMBRECHTS, D., MAZZONE, M., CARMELIET, P. (2009). Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*, **89**:607–648.

71. MACKENZIE, F., RUHRBERG, C. (2012). Diverse roles for VEGF-A in the nervous system. *Development*, **139**:1371–1380.
72. LUNDQUIST, R., DZIEGIEL, MH., AGREN, MS. (2008). Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair Regen*, **16**: 356–363.
73. YILDIZ, (KAYA), M. (2006). Kemik iyileşmesinde trombosit zengin plazmanın (platelet rich plasma–prp) etkisinin deneysel olarak değerlendirilmesi. Doktora tezi, Ankara.
74. LIND, M. (1996). Growth Factors: Possible New Clinical Tools. A review. *Acta Orthop. Scand.* **67**(4); 407–417.
75. LIND, M., SCHUMACKER, B., SOBALLE, K., KELLER, J., BUNGER, C. (1993). Transforming Growth Factor Enhances Fracture Healing in Rabbit Tibiae. *Acta. Orthop. Scand.* **64**: 553 – 556.
76. ANITUA, E., AGUIRRE, JJ., ALGORTA, J., AYERDI, E., CABEZAS, AI., ORIVE, G., ANDIA, I. (2008). Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater. Feb*; **84**(2):415-21.
77. RUTKOWSKI, JL., THOMAS, JM., BERING, CL., SPEICHER, JL., RADIO, NM., SMITH, DM., JOHNSON, DA. (2008). Analysis of a rapid, simple, and inexpensive technique used to obtain platelet-rich plasma for use in clinical practice. *J Oral Implantol.* **34**(1):25-33.
78. DINARELLO, CA. (2004). Therapeutic strategies to reduce IL-1 activity in treating local and systemic inflammation. *Curr Opin Pharmacol*, **4**: 378-385.
79. KWAN, TATS., PADRINES, M., THEOLEYRE, S., HEYMANN, D., FORTUN, Y. (2004). IL- 6, RANKL, TNF alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*, **15**: 49-60.
80. GAUR, U., AGGARWAL, BB. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochem Pharmacol*, **66**:1403-1408.
81. TIGGELMAN AM, BOERS W, LINTHORST C, SALA M, CHAMULEAU RA. (1995). Collagen synthesis by human liver (myo) fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *J Hepatol*, **23**: 307-317.
82. HAYASHI, Y., KOBAYASHI, M., KUWATA, H., ATSUMI, G., DEGUCHI, K., KUDO, I., HASEGAWA, K. (2000). Interferon-gamma and interleukin 4 inhibit interleukin 1beta-induced delayed prostaglandin E(2) generation through suppression of cyclooxygenase-2 expression in human fibroblasts. *Cytokine*, **12**: 603-612.
83. ZACHARY, I. (2003). VEGF signalling: integration and multi tasking in endothelial

cell biology. *Biochem Soc Trans*, **31**: 1171-1177.

84. HARRY, LE., PALEOLOG, EM. (2003). From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis. *Birth Defects Res C Embryo Today*, **69**: 363-374.
85. RUHRBERG C. (2003). Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF. *Bioessays*, **25**: 1052-1060.
86. GRAY, AJ., BISHOP, JE., REEVES, JT., LAURENT, GJ. (1993). A alpha and B beta chains of fibrinogen stimulate proliferation of human fibroblasts. *J Cell Sci.*, **104**: 409-413.
87. BALCI, H., TOKER, H. (2011). Trombositten zengin fibrin: özellikleri ve diş hekimliğinde kullanımı. *GÜ Diş Hek Fak Derg.*, 183 **29**(3): 183-192, 2012
88. LANDESBURG, R., ROY, M. (2000). Quantification Of Groth Factor Levels Using A Simplified Method Of Platelet-Rich Plasma Gel Preparation. *J Oral Maxillofac Surg.*, **58**:297-300.
89. ÇAKILCI, B. (2007). Kemik İçi Defektlerin Tedavisinde Trombositten Zengin Plazma Uygulama Sonuçlarının Karşılaştırılması Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji AD. Ankara: Gazi Üniversitesi.
90. SÁNCHEZ, AR., SHERIDAN, PJ., KUPP, LI. (2003). Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *Int J Oral Maxillofac Implants* **18**:93-103.
91. CHOUKROUN, J., ADDA, F., SCHOEFFLER, C., VERVELLE, A. (2001). An opportunity in perio- implantology: the PRF. *Implantodontie*, **42**:55–62 [in French].
92. JUNG, RE., SCHMOEKEL, HG. (2005). Platelet-rich plasma and fibrin as delivery system for rhBMP-2. *Clin Oral Implants Res.*, **16**:676-82.
93. BUTTERFIELD, K.J., BENNET, J., GRONOWICZ, G., ADAMS, D. (2005). Effect of Platelet-Rich Plasma With Autogenous Bone Graft For Maxillary Sinus Augmentation in a Rabbit Model. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **63**: 370 – 376.
94. PARFITT, AM. (1990). Pharmacologic manipulation of bone remodelling and calcium homeostasis In: Kanis AJ . Calcium Metabolism. *Basel: Karger*, **1**
95. ROBERTS, WE., SMITH, RK., ZIBERMAN, Y., MOZSARY, PG., SMITH, RS. (1984). Osseous adaptation to continuous loading of rigid endosseous implants. *Am J. Orthod*, Aug;**86**(2): 86-95
96. DODDE, R., YAVUZER, R., BIER, U., ALKADRI, A., JACKSON, I. (2000). Spontaneous Bone Healing in the Rabbit; *The Journal of Craniofacial Surgery.*, **11**(4), 346-349.
97. LEE, EH., KIM, JY., KWEON, HY., JO, YY., MIN, SK., PARK, YW., CHOI, JY., KIM, SG. A combination graft of low-molecular-weight silk fibroin with

Choukroun platelet-rich fibrin for rabbit calvarial defect. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*.

98. TUNALI, M., OZDEMIR, H., KÜÇÜKODACI, Z., AKMAN, S., FIRATLI, E. (2012). In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *Br J Oral Maxillofac Surg*. Aug 27.
99. TAKATA, T., WANG, H.L. MIYAUCHI, M. (2001). Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes. *Journal of Clinical Oral Implants Research*, **12**: 332–338.
100. GASSLING, V., DOUGLAS, T., WARNKE, PH., AÇIL, Y., WILTFANG, J., BECKER, ST. (2010). Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering. *Clin Oral Implants Res*. May; **21**(5):543-9.
101. GASSLING, V., HEDDERICH, J., AÇIL, Y., PURCZ, N., WILTFANG, J., DOUGLAS, T. (2013). Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications. *Clin Oral Implants Res*. Mar; **24**(3):320-8.
102. ARNOLD, U., LINDENHAYN, K. PERKA, C. (2002). In vitro-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials* **23**: 2303–2310.
103. MARX, R.E. (2004). Platelet Rich Plasma: Evidence to Support its Use. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **62**: 489 – 496.
104. CHOUKROUN, J, DISS, A., SİMONPIERİ, A., GİRARD, M.O. SCHOEFFLER, C. STEVE, DOHAN. L. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **101**:E56-60.
105. BAEYENS, W., GLİNEUR, R., EVRARD, L. (2010). The use of platelet concentrates: platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in bone reconstruction prior to dental implant surgery: *Rev Med Brux. Nov-Dec.*, **31**(6):521-7.
106. MARX, RE, CARLSON, ER, EİCHSTAEDT, RM, SCHİMMELE, SR, STRAUSS, JE, GEORGEFF, KR. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **85**(6): 638-46.
107. MEKİKOĞLU, S. (2008). Trombositten zengin plazmanın implant stabilitesi üzerindeki etkisinin rezonans frekans analizi ile incelenmesi Doktora. Ankara: Gazi üniversitesi.
108. CHOİ, BH., ZHU, SJ., KİM, BY., HUH, JY., LEE, SH., JUNG, JH. (2005). Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, **34**(4): 420-4
109. WEİBRİCH, G., HANSEN, T, KLEİS, W., BUCH, R., HİTZLER, WE. (2004).

Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* **34**(4): 665-71

110. KLONGOŃ, B., RUPPRECHT, S., KESSLER, P., ZIMMERMANN, R., THORWARTH, M., PONGSIRI, S., NEUKAM, FW., WILTFANG, J., SCHLEGEL, KA. (2006). Lack of beneficial effects of platelet-rich plasma on sinus augmentation using a fluorohydroxyapatite or autogenous bone: an explorative study. *J Clin Periodontol*, **33**(7): 500-509
111. CHOUKROUN, J., DISS, A., SIMONPIERI, A., GIRARD, M.O., SCHOEFFLER, C., DOHAN, S.L. (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing: *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **101**:E56-60.
112. OYAMA, T., NISHIMOTO, S., TSUGAWA, T., SHIMIZU, F.. (2004). Efficacy of platelet-rich plasma in alveolar bone grafting. *J Oral Maxillofac Surg*. **62**:555–558.
113. GASSLING, V., PURCZ, N., BRAESEN, JH., WILL, M., GIERLOFF, M., BEHRENS, E., AÇIL, Y., WILTFANG, J. (2013). Comparison of two different absorbable membranes for the coverage of lateral osteotomy sites in maxillary sinus augmentation: a preliminary study. *J Craniomaxillofac Surg*. Jan;41(1):76-82.
114. KRASNY, M., KRASNY, K., KAMIŃSKI, A., ZADURSKA, M., PIEKARCZYK, P., FIEDOR, P. (2012). Evaluation of safety and efficacy of radiation-sterilized bone allografts in reconstructive oral surgery. *Cell Tissue Bank*. Dec 13.
115. JAYALAKSHMI, KB., AGARWAL, S., SINGH, MP., VISHWANATH, BT., KRISHNA, A., AGRAWAL, R. (2012). Platelet-Rich Fibrin with β -Tricalcium Phosphate-A Novel Approach for Bone Augmentation in Chronic Periapical Lesion: A Case Report. *Case Rep Dent*. 902858.
116. KIM, BJ., KWON, TK., BAEK, HS., HWANG, DS., KIM, CH., CHUNG, IK., JEONG, JS., SHIN, SH. (2012). A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 May;113(5):583-92.
117. OZDEMIR, H., EZIRGANLI, S., ISA, KARA, M., MIHMANLI, A., BARIS, E. (2012). Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. Article in press. *Arch Oral Biol*. Nov 6.
118. OBARRIO, JJ., ARAUZ-DUTARI, JI., CHAMBERLAIN, TM., CROSTON, A. (2000). The use of autologous growth factors in periodontal surgical therapy: platelet gel biotechnology—case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent*, **20**:486–497.