

T.C.
İZMİR KATİP ÇELEBİ ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
AĞIZ, DIŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**ENJEKTE EDİLEBİLİR TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİN (i-TZF)
İLAVESİNİN FARKLI PARTİKÜL BOYUTLARINDAKİ KEMİK
GREFTLERİNE ETKİNLİĞİNİN HİSTOLOJİK VE
İMMÜNOHİSTOKİMYASAL OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Oya TÖRÜN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKÇAY

2022- İZMİR

KABUL VE ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Doktora Programı** çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29 / 06 / 2022

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKÇAY

Üye: Prof. Dr. Mehmet Cemal AKAY

Üye: Prof. Dr. Uğur TEKİN

Üye: Doç. Dr. Murat ULU

Üye: Dr. Öğr. Üyesi Fatma Gülfeşan ÇANAKÇI

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan doktora tezimin tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini İzmir Katip Çelebi Üniversitesi'ne verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanılması zorunlu metinlerin yazılı izin alınarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

o Tezimin tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekte teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, teziniz arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

o Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını istemiyorum (İç kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç)

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.)

o Tezimin tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

o Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

....../....../....

Oya Törün



EGE ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU

SAYI: 2020-076
KONU: Onay

24.06.2020

Etik kurulumuza yapmış olduğunuz başvuru doğrultusunda **“ENJEKTE EDİLEBİLİR TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN(İ-PRF) FARKLI PARTİKÜL BOYUTLU SIĞIR KAYNAKLI KEMİK GREFTLERİNE İLAVESİNİN YENİ KEMİK OLUŞUMU VE ANJİOGENESİSE ETKİSİNİN HİSTOLOJİK OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ”** isimli araştırma projeniz değerlendirilmiştir.

Yürütücü: Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin AKÇAY, İKÇÜ Diş Hekimliği Fak. Ağız Diş ve Çene Cer. AD
Arş. Gör. Dt. Oya Törün, İKÇÜ Diş Hekimliği Fak. Ağız Diş ve Çene Cerr. AD
Dr. Öğr. Üyesi Fatma E. ŞİMŞEK, İKÇÜ Histoloji ve Embriyoloji AD

Proje başvuru formunuzda belirtildiği koşullarda 20 adet her iki eşeyden Yeni Zelanda Tavşan deney hayvanı kullanarak araştırmayı gerçekleştirmeniz kurulumuz tarafından uygun bulunmuştur. Saygılarımla bilgilerinizi rica ederim.

ETİK BEYAN

Bu çalışmadaki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, kullandığım verilerde herhangi bir tahribat yapmadığımı, yararlandığım kaynaklara bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu, tezimin kaynak gösterilen durumlar dışında özgün olduğunu, tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin Akçay danışmanlığında tarafımdan üretildiğini ve İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna göre yazıldığını beyan ederim.

....../....../....

Oya Törün

TEŞEKKÜRLER

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nda doktora programına başladığımdan bu yana benden desteklerini hiç esirgemeyen, tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimiyle bana yol gösteren başta tez danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Hüseyin AKÇAY'a,

Doktora eğitimim boyunca teorik ve pratik olarak benimle bilgilerini paylaşarak bugün bulunduğum yere gelmemde büyük emeği olan Prof. Dr. Gülten KAVAK, Prof. Dr. Nergiz YILMAZ, Doç. Dr. Murat ULU, Doç. Dr. Nihat LAÇİN, Doç. Dr. Onur ŞAHİN'e,

Tezimin histolojik inceleme aşamasındaki değerli katkılarından dolayı Dr. Öğr. Üyesi Fatma Ela ŞİMŞEK ve Arş. Gör. Ayşe SARI'ya,

Doktora eğitimine birlikte başladığımız, zor günleri birlikte atlattığımız her biri birbirinden değerli eş kıdemlilerim, kader ortaklarım Dr. Ceren EKMEKÇİOĞLU, Eynar BERDELİ, Malik BAYRAMOV, Ömer ANKAYA, Xhini RIZAJ'a

Tezimin deney aşamasında büyük fedakarlıklar gösteren, destekleriyle her zaman yanımda olan canım arkadaşlarım Denizcan ATALAY ve Onur KUTLU'ya,

Birlikte çalıştığım için kendimi çok şanslı hissettiğim hem güzel hem de kötü günlerde hep yanımda olan, varlığı yeter canım dostum Uzm. Dt. Aynur TÜZÜNTÜRK'e,

Benim için her zaman kıdemlilerim olmaktan çok daha ötesi olan, cerrahi pratiğime büyük katkı sağlamanın ötesinde varlıklarıyla hayatımı daha güzel kılan değerli arkadaşlarım Dr. Dt. Hazal CANKURT ARAS, Uzm. Dt. Birkan TATAR, Uzm. Dt. Gökcan ŞAHİN, Uzm. Dt. Berat Metin ADAK'a,

Hayatım boyunca her anımda yanımda olan, zorlu eğitim süreçlerimde maddi ve manevi desteğini esirgemeyen en değerlilerim annem Olcay TÖRÜN, babam Ali TÖRÜN ve canımın yarısı ablam Aslı ERBENGİ'ye çok teşekkür ederim.



ÖZET

TÖRÜN O. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (İ-TZF) İlavesinin Farklı Partikül Boyutlarındaki Kemik Greftlerine Etkinliğinin Histolojik ve İmmünohistokimyasal Olarak Değerlendirilmesi İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi, İzmir, 2022

Amaç: Bu çalışmada, tavşan modelinde oluşturulan kemik defektine uygulanan, enjekte edilebilir trombositten zengin fibrinin (i-TZF) farklı partikül boyutundaki sığır kaynaklı kemik greftine ilavesinin kemik oluşumuna ve damarlanmaya etkisinin karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 18 adet Yeni Zelanda türü tavşanın kalvaryumunda 4 adet yuvarlak formda defekt oluşturulmuştur. Defektlere, küçük (0.25-1.0 mm) ve büyük (1.0-2.0 mm) olmak üzere iki farklı partikül boyutundaki sığır kaynaklı kemik greftleri; tek başına veya enjekte edilebilir trombositten zengin fibrin (i-TZF) ilave edilerek yerleştirilmiştir. Operasyon sonrası kemik iyileşmesinin erken ve geç dönem takibi için hayvanlar 4. ve 10. haftaların sonunda sakrifiye edilmiştir. Elde edilen kemik örnekleri yeni kemik oluşumu, damarlanma, rezidüel greft açısından histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Ölçümlerden elde edilen değerler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Sonuç: Histolojik sonuçlara göre, küçük partiküllü kemik grefti ile i-TZF karışımı kullanılan grubun (K+i-TZF) hem erken hem geç dönemde yeni kemik oluşum oranı anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. İmmünohistokimyasal incelemede çalışma grupları arasında erken dönemde anlamlı bir fark bulunamazken; geç dönemde K+i-TZF grubunun vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) antikorunun skorlarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Geç kemik iyileşmesi döneminde K+i-TZF grubunun osteokalsin (OCN) antikor skorları diğer gruplara kıyasla anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Bununla beraber, i-TZF ilave edilen gruplarda osteokalsin (OCN) antikoruna karşı immünoreaktivite diğer gruplardan daha yüksek bulunmuştur. İ-TZF'nin farklı partikül boyutlarındaki etkinliğinin araştırıldığı bu çalışmada küçük partiküllü kemik greftine i-TZF ilavesinin yeni kemik oluşumunu artırdığı sonucuna ulaşılmıştır. Enjekte edilebilir TZF'nin partiküllü kemik greftine

ilavesiyle elde edilen sticky bone greft formu, pratik kullanımı ve kemik iyileşmesine olumlu etkilerinin klinik uygulamalarla daha fazla desteklenmelidir. Kemik grefti partikül boyutundaki değişikliklerin yeni kemik oluşumu ve damarlanmaya etkisi, farklı ogmentasyon yöntemleri kullanılarak daha geniş bir alanda incelenmelidir.

Anahtar Kelimeler: i-TZF, ksenogreft, partikül boyutu, kemik iyileşmesi



ABSTRACT

TÖRÜN O. Evaluation of the Efficacy of Injectable Platelet-Rich Fibrin (I-PRF) Addition to Bone Grafts of Different Particle Sizes Histologically, İzmir Katip Çelebi University, İzmir Katip Çelebi University Health Science Institute, Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Doctoral Thesis, İzmir, 2022

Aim: In this study, it was aimed to compare the effectiveness of the injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) addition to bovine bone graft with different particle size on bone formation and vascularization.

Materials and Methods: Four round-shaped defects were created in the calvarium of 18 New Zealand rabbits. Bovine bone grafts of two different particle sizes, small (0.25-1.0 mm) and large (1.0-2.0 mm) were applied with injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) and without i-PRF. Animals were sacrificed at the end of the 4th and 10th weeks for examining early and late bone healing. Bone samples obtained were examined histomorphometrically and immunohistochemically.

Conclusion: According to the histological results, the percentage of new bone formation was found to be significantly higher in the group that small particle bone graft and i-PRF mixture was applied, both in the early and late periods. In the immunohistochemical examination, there was no significant difference between the study groups in the early period; in the late period, statistically significant difference was found in the scores of the vascular endothelial growth factor (VEGF) antibody of the S+i-PRF group. In the late bone healing period, osteocalcin (OCN) antibody scores of the S+i-PRF group were found to be significantly higher than the other groups. However, immunoreactivity against osteocalcin (OCN) antibody was higher in the i-PRF added groups than in the other groups. In this study, which investigated the effectiveness of i-PRF in different particle sizes, it was concluded that the addition of i-PRF to small particle bone graft increased new bone formation. The sticky bone graft form obtained by adding injectable PRF to the particulate bone graft, its practical use and positive effects on bone healing should be further supported by clinical applications. The effect of particle sizes of bone graft on new bone formation and

vascularization should be evaluated with further researches using different augmentation methods.

Keywords: i-PRF, xenograft, particle size, bone healing



İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	i
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI.....	ii
ETİK BEYAN.....	v
TEŞEKKÜRLER	ivi
ÖZET	vi
ii	
ABSTRACT	x
İÇİNDEKİLER	xii
Simgeler ve Kısaltmalar	xv
Şekiller Dizini	xvii
Resimler Dizini	xviii
Tablolar Dizini.....	xx
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kemik Dokusu	4
2.1.2. Kemik Matriksi	6
2.1.3. Kemik Zarları.....	9
2.2. Kemik İyileşmesi	10
2.2.1. Kritik Boyutta Kemik Defekti	17
2.3. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri.....	18
2.3.1. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması.....	18
2.3.2. Kemik Greftlerinin Patofizyolojisi	23
2.3.3. Kemik Grefti Partikül Büyüklüğü.....	25

2.4.	Trombosit Konsantrasyonlarının Tarihsel Gelişimi.....	26
2.4.1.	Trombositten Zengin Fibrin(TZF)	28
2.4.2.	Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrinin (İ-TZF) Gelişimi	31
2.4.3.	İ- TZF'nin Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Uygulama Alanları.....	33
3.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	35
3.1.	Etik Kurul.....	35
3.2.	Kullanılan Araç ve Gereçler	35
3.2.1.	Deney Hayvanları.....	35
3.2.2.	İ-TZF'nin Eldesi.....	35
3.3.	Yöntemler.....	40
3.3.1.	Deney Hayvanlarının Hazırlanması	40
3.3.3.	Cerrahi Yöntem.....	41
3.3.4.	Operasyon Sonrası Bakım.....	46
3.3.5.	Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Kemik Örneği Elde Edilmesi.....	46
3.4.	Histopatolojik İnceleme	48
3.5.	İstatistiksel Analiz	53
4.	BULGULAR.....	54
4.1.	Histolojik Bulgular.....	54
4.1.1.	Histomorfometrik Bulgular	54
4.1.2.	İmmunohistokimyasal Bulgular	63
4.1.2.1.	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	63
4.1.2.2.	Osteokalsin (OCN)	66
5.	TARTIŞMA	70
6.	SONUÇ VE ÖNERİLER.....	95
	KAYNAKLAR	97



Simgeler ve Kısaltmalar

ALP: Alkalen Fosfataz

ANOVA: Analysis of Variance

BMP: Kemik Morfogenik Proteini

BMU: Temel Multisellüler Üniteler

CGF: Konsantre Büyüme Faktörü

Dk: Dakika

EGF: Epidermal Büyüme Faktörü

HA: Hidroksiapatit

HCl: Hidroklorik asit

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IGF: İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

i-TZF: Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin

M-CSF: Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör

Mm: Milimetre

OCN: Osteokalsin

OPG: Osteoprotegerin

PDGF: Platelet Kaynaklı Büyüme Faktörü

PRP: Plateletten Zengin Plazma

RANKL: Nükleer Kappa Ligand Reseptör Aktivatör

RCF: Rölatif Santrifüj Kuvveti

Rpm: Dakikadaki Devir Sayısı (Devir/Dakika)

RUNX2: Runt-related transcription factor 2

TGF: Transformal Büyüme Faktörü

TNF-alfa: Tümör Nekroz Faktörü

TZF: Trombositten Zengin Fibrin

VEGF: Vasküler Endotelyal Kaynaklı Büyüme Faktörü

YKR: Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu

β -TCP: Beta trikalsiyum fosfat

μ m: Mikrometre

%: Yüzde

$^{\circ}$ C: Santigrat derece



Şekiller Dizini

Şekil 1: Kemiğin hücresel komponentleri.....	6
Şekil 2: Kemik dokunun makroskobik incelemesi	7
Şekil 3: Kemiğin mikroskobik incelemesi (15)	8
Şekil 4: Kemik oluşum mekanizması.....	9
Şekil 5: Kemik iyileşmesi aşamaları	11
Şekil 6: Doğrudan ve dolaylı kemik iyileşmesi	12
Şekil 7: Kemik yapım yıkım döngüsü.....	16
Şekil 8: TZF'nin üç ana bileşeni.....	28
Şekil 9: Düşük santrifüj hızı konsepti ve platelet konsantrasyonları	33

Resimler Dizini

Resim 1: Tavşanın kulak veninden kan alınması	36
Resim 2 Santrifüj cihazına tüplerin dengeli olacak şekilde yerleştirilmesi ve devirin 700 rpm/3 dk ayarlanması	36
Resim 3: i-TZF'nin eldesi ve enjektöre çekilmesi	37
Resim 4: Küçük (0,25-1.0 mm) ve Büyük (1.0-2.0 mm) partiküllü sığır kaynaklı kemik grefti	38
Resim 5: Greftler ile i-TZF'nin godede karıştırılması ve Sticky Bone eldesi	39
Resim 6: Kulaklarına kadar traş edilen tavşanlarda povidon iyodin ile cilt antisepsisi sağlanması	42
Resim 7: Sırasıyla cilt- periost insizyonu ve kalvaryanın açığa çıkarılması	43
Resim 8: Trefan frez ile kalvaryada defekt sınırlarının belirlenmesi ve disklerin tam kalınlıkta çıkarılması	44
Resim 9: Defektlerin greftle doldurulması (Sol üst: K+i-TZF; Sol alt: B+iTZF; Sağ üst: K; Sağ alt: B)	45
Resim 10: Sırayla periost ve cildin sütüre edilmesi	46
Resim 11: Sakrifiye edilen tavşanın kalvaryumundan disk şeklinde kemik örneği alınması	47
Resim 12: K+ i-TZF grubunun 4. Haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft parçacıkları Üçgen: bağ dokusu)	55
Resim 13: B+ i-TZF grubunun 4. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)	55
Resim 14: B grubunun 4. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)	56
Resim 15: K grubunun 4. haftada alınan örneğine ait grubunun Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)	56

Resim 16: K+ i-TZF grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)	58
Resim 17: B+ i-TZF grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft, Üçgen: bağ dokusu)	59
Resim 18: K grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft, Üçgen: bağ dokusu)	60
Resim 19: B grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)	60
Resim 20: Gruplardan 4. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak VEGF primer antikoru ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D: K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite). .	63
Resim 21: Gruplardan 10. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak VEGF primer antikoru ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D: K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite). .	65
Resim 22: Gruplardan 4. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak OCN primer antikoru ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D: K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite). .	66
Resim 23: Gruplardan 10. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak OCN primer antikoru ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D: K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite). .	67

Tablolar Dizini

Tablo 1: Hematoksilen-eozin boyama protokolü.....	50
Tablo 2: İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü.....	51
Tablo 3: Çalışma gruplarının erken dönemde yeni kemik ölçüm ortalamalarının (%) karşılaştırılması	57
Tablo 4: Çalışma gruplarının geç dönemde yeni kemik ölçüm ortalamalarının (%) karşılaştırılması	58
Tablo 5: Çalışma gruplarının erken dönemde rezidüel greft ortalamalarının (%) karşılaştırılması	61
Tablo 6: Çalışma gruplarının geç dönemde rezidüel greft ortalamalarının (%) karşılaştırılması	61
Tablo 7: Çalışma gruplarının erken dönemde bağ doku ortalamalarının (%) karşılaştırılması	62
Tablo 8: Çalışma gruplarının geç dönemde bağ doku ortalamalarının (%) karşılaştırılması	62
Tablo 9: Çalışma gruplarının erken dönem VEGF antikor boyanma durumlarının karşılaştırılması	64
Tablo 10: Çalışma gruplarının geç dönem VEGF antikor boyanma durumlarının karşılaştırılması	64
Tablo 11: Çalışma gruplarının erken dönem OCN antikor boyanma durumlarının karşılaştırılması	68
Tablo 12: Çalışma gruplarının geç dönem OCN antikor boyanma durumlarının karşılaştırılması	68
Tablo 13: Greftlere yapılan i-TZF ilavesi ile OCN antikor boyanma derecesi arasındaki ilişki tablosu.....	69

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Çene ve yüz kemiği defektlerinin etyolojisinde kistik ve neoplastik oluşumlar, travma, enfeksiyon, konjenital ve gelişimsel malformasyonlar sayılabilir. Rekonstrükte edilmesi gereken defektler küçük boyutlu alveoler defektlerden geniş mandibulektomi defektlerine kadar değişkenlik gösterebilir. Defekt, rekonstrüktif cerrahi ile boyut, şekil ve pozisyon olarak iyileştirilebilmektedir (1).

Kemik defektlerinin onarımında ihtiyaç duyulan kemik grefti veya biyomateriyallerin hedefi, alıcı sahanın en kısa sürede uygun bir anatomik formda iyileşmesini sağlayarak yeni kemik oluşumuna ortam hazırlamaktır. İdeal bir kemik grefti; cerrahi sahaya gelebilecek olan kuvvetlere karşı dayanıklı olmalı, gerekli miktarda temin edilebilmeli, uygun maliyetle olmalı, ikinci bir operasyon sahasına ihtiyaç duymamalı, istenilen şekle kolayca getirilebilmeli, defekt bölgesi içerisinde stabil olmalı ve formunu muhafaza edebilmeli, kolay uygulanmalı, raf ömrü uzun olmalı ve antijenik özellikte olmamalıdır. (2,3).

İdeal greft özelliklerine göre, otojen kemik greftleri, hala altın standart bir greft materyali olarak kabul edilmektedir. Ancak, otojen greftlerin çeşitli dezavantajları ve doku mühendisliğindeki gelişmelerle birlikte alternatif biyomateriyallerin kullanımı oral ve maksillofasiyal cerrahide her geçen gün artmaktadır (4,5).

Zenojenik kemik greftleri bu alternatiflerin içinde oral ve maksillofasiyal cerrahide en sık kullanılan, biyouyumlu ve osteokondüktif özellikte bir greft çeşididir. Üretim aşamasında blok ve partikül gibi çeşitli formlarda üretilebilmekle beraber oral ve maksillofasiyal cerrahide çoğunlukla tercih edilen formu partikül şeklindedir (6). Klinik uygulamada kullanım için farklı partikül boyutları mevcut olan kemik greftlerinde partiküllerin boyutunun osteogenez ve kemik onarımında rol oynadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (7,8).

Son yıllarda, oral cerrahi ve implantoloji alanında greft materyallerinin yanı sıra otolog kan ürünleri de oldukça yaygın kullanılmaya başlanmıştır. İlk ortaya çıkan birinci nesil trombositten zengin plazma (TZP) ürünleridir. İkinci nesil olarak ortaya çıkan form, Choukroun ve ark (9). tarafından geliştirilmiş olan *trombositten zengin fibrin (TZF)* ürünleridir (10,11). Hastadan kan alınır, herhangi bir antikoagülan ilavesi olmayan tüp hemen santrifüjlenir. Daha sonra doğal bir pıhtılaşma süreci gerçekleşir ve kanın herhangi bir biyokimyasal modifikasyonuna gerek kalmadan, yani antikoagülan, trombin veya kalsiyum klorür olmadan lökosit ve trombosit bakımından zengin fibrin (L-TZF) matrisinin kolayca toplanmasına izin verir. En yaygın kullanılan trombositten zengin fibrin (TZF) ürünlerinin kemik iyileşmesine olumlu etkisinin kanıtlandığı çalışmalar literatürde mevcuttur (10,12–14).

Daha düşük hız ve kısa süreli santrifüj değerlerinden yararlanarak oluşturulan TZF formülasyonlarının, diğer formlara kıyasla daha yüksek büyüme faktör konsantrasyonlarına ve rejeneratif hücre varlığına sahip olduğu gözlemlenmiştir (15). Standartlaştırılmış TZF, fibrin matriksi içinde kapsüllenmiş büyüme faktörü konsantrasyonunun çoğunu içerdiğinden, ilk TZF formülasyonlarında sıvı protein konsantresi içermemektedir. Bu nedenlerle, son zamanlarda herhangi bir antikoagülan veya fibrin matrisi içermeyen sıvı bir TZF formülasyonu geliştirmek amacıyla çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Büyüme faktörü salınımının daha geniş alanlara ulaşarak yavaş yayılım göstermesi beklenmiştir (16). Literatürde hala sınırlı bilgi edinilebilen enjekte edilebilir trombositten zengin fibrinin (i-TZF) kemik oluşumu üzerinde de olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir (11).

TZF formülasyonlarının tek başına kemik iyileşmesine olan olumlu etkilerinin yanı sıra kemik grefti materyalleriyle birlikte kullanımlarının da getirdiği pek çok avantaj ile oral ve maksillofasiyal cerrahi alanında kullanımı yaygınlaşmaktadır (17). Enjekte edilebilir TZF ile partiküllü kemik grefti karıştırıldığında yapışkan kemik (sticky bone) şeklinde bir form elde edildiği bulunmuştur. Elde edilen bu formun operasyon sahasına kolay taşınma, uzun dönemde büyüme faktörleri salgılama gibi avantajları mevcuttur (18).

Bu çalışmada, tavşan kalvaryum modelinde oluşturulan kemik defektine uygulanan, i-TZF'nin farklı partikül boyutundaki sığır kaynaklı kemik greftine ilavesinin kemik oluşumuna ve damarlanmaya etkinliğinin karşılaştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen bulgular, mevcut literatür ışığında tartışılmıştır.

Çalışmamızda test edilecek sıfır hipotezi řu şekilde oluşturulmuştur:

H₀: i-TZF'nin farklı partikül boyutundaki sığır kaynaklı kemik greftine ilavesinin kemik defektlerine uygulanmasında kemik oluşumu ve damarlanmaya olan etkileri arasında herhangi bir farklılık yoktur.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokusu; iyi organize olmuş ve içeriğindeki kalsiyum sebebi ile sertleşmiş özel bir dokudur. Kemik, iskelet sisteminin en temel yapıtaşını oluşturur. Diğer önemli görevleri ise kaslarla beraber vücut hareketini sağlaması, kranium ve toraks boşluğundaki organları çevreleyerek koruması, içerdiği hematopoetik yapı ile kan hücrelerini üretmesi ve kalsiyum-fosfor deposu olarak görev görmesidir.

Yaşam boyu remodelasyonu devam eden kemik metabolik, hormonal ve mekanik değişimlere karşı duyarlı olan aktif bir dokudur. Kendi kendini onarım ve skar doku oluşturmada iyileşebilme özelliği mevcuttur.

2.1.1. Kemiğin Hücresel Komponentleri

Osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar ve osteositler kemiğin hücresel komponentlerini oluşturmaktadır.

2.1.1.1. Osteoprogenitör Hücreler

Mezenşimden köken alan osteojenik hücreler kemiğin ana hücreleridir. Asidofilik sitoplazma ve soluk boyanan çekirdeğe sahiptirler. Büyüme sürecinde görev alan bu hücreler, erişkinlerde sadece kırık tamiri gibi durumlarda görev alır (3).

2.1.1.2. Osteoblastlar

Kemik matriksinin (Tip 1 kollagen, proteoglikan ve glikoproteinler) üretilmesinden sorumlu olan hücrelerdir. Bu nedenle kemik yapımı sırasında bol olarak bulunurlar. Şekillenmekte olan kemik trabeküllerinin yüzeyinde epitel hücrelerini andırır şekilde tek sıra halinde yan yana dizilirler. Osteoblastlar özellikle kemik yüzeylerinde tek katlı epitel dokuya benzer şekilde bulunurlar. Aktif olarak

matriks sentezi gerçekleştiren osteoblastlar kübik şekilden prizmatığe kadar değişen şekil ve bazofilik bir sitoplazmaya sahiptirler. (3).

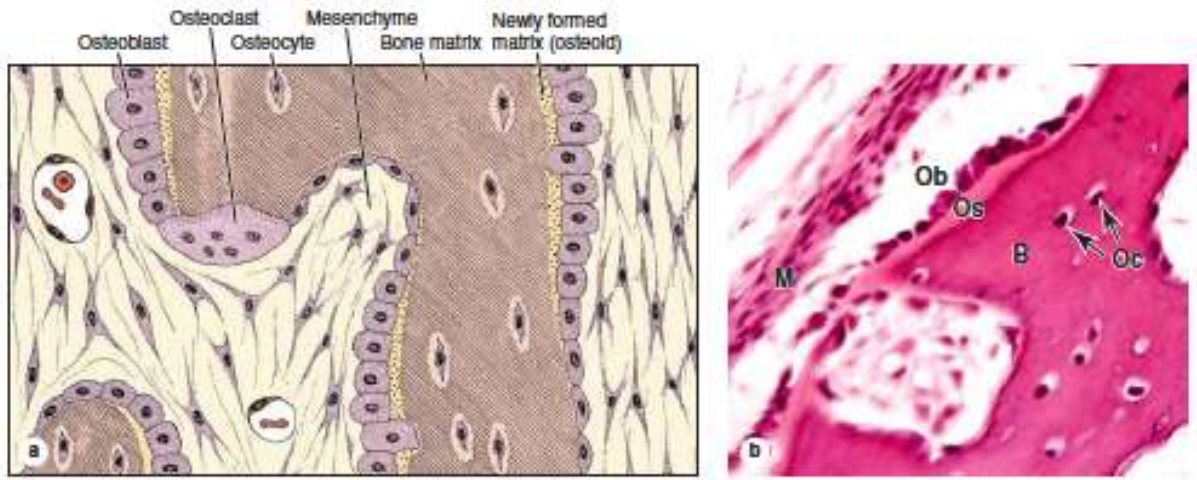
Kemik matriksinin oluşmasında ve osteoklast hücrelerinin diferansiyasyonunda rol alan bu hücreler yüksek seviyede alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi gösterirler (2). Kemik oluşumunun aktif olduğu bölgelerde periosteumun altında diziler halinde düzenli olarak sıralanırlar (20). Osteoblastlar tarafından yeni sentezlenen ve henüz kalsifiye olmamış olan kemik matriksine **osteoid** adı verilir. Osteoblastlar kalsifiye kemikte osteosite dönüşür. Kemik yıkımı esnasında osteojenik hücrelere dönüşme özelliğine sahiptirler. Kalsiyumun kemik dokusundan dolaşıma katılmasında önemli bir rol oynarlar(21).

2.1.1.3. Osteoklastlar

Kemiğin içindeki Howship lakünası denilen alanlarda yer alırlar. Osteoklastların çekirdekleri dış yüzeye yakın konumlanır (2). Kemiğin rezorbsiyonunu sağlayan girintili çıkıntılı yapısı nedeniyle dantel kenar adı verilen yapı bu hücrelerin karakteristik görüntüsünü oluşturur. Kemik dokusunun rezorbsiyonu, içerdikleri kollajenaz ve proteolitik enzimler ile gerçekleştirir. Rezorbe olan kemik dokusu, dantel kenarda gerçekleşen basit hareketler ile hücre içine alırlar (2,3,20). Osteoklastlar, kalsitonin reseptörlerine sahiptir, ancak paratiroid hormonu reseptörlerine sahip değildirler. Bununla birlikte, osteoblastlarda paratiroid hormon reseptörü vardır ve bu hormon ile uyarıldıklarında osteoklast uyarıcı faktör denilen sitokini üretirler (3).

2.1.1.4. Osteositler

Osteoblastlardan köken alan osteositler, kemik matriksinde bulunan lakunalar içinde yer alır. Kalsifiye kemik dokusu içerisinde yer alırlar. Hücrelerden çıkan sitoplazma uzantıları kan damarları ve osteositlere doğru uzama göstererek ağ biçimini alırlar. Komşu osteosit hücreleri, birbirleri ile yaptıkları haberleşme sayesinde hücreden hücreye besin alışverişini sağlar (19) (Şekil 1).



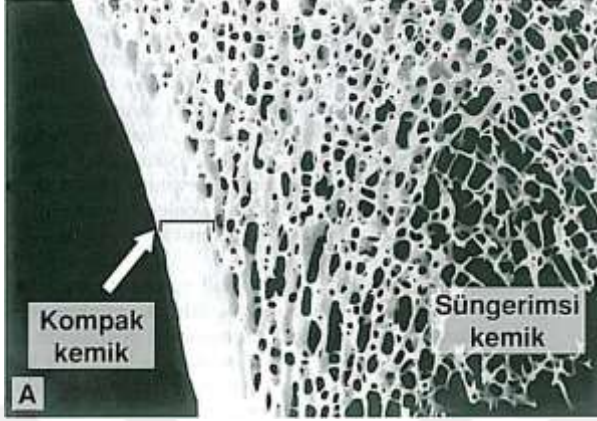
Şekil 1: Kemik hücresel komponentleri

2.1.2. Kemik Matriksi

Kemik matrisinin yaklaşık %50'sini inorganik bileşenler oluşturur. Fazla miktarda kalsiyum hidroksiapatit içerir, ayrıca bikarbonat, sitrat, magnezyum, potasyum ve sodyum iyonları da bulunur. Önemli miktarlarda amorf (kristalin olmayan) kalsiyum fosfat da mevcuttur. Hidroksiapatit kristallerinin yüzey iyonları hidratlanır. Kristalin etrafındaki su tabakası, mineral ve vücut sıvıları arasındaki iyon değişimini kolaylaştırır. Kalsifiye matrikste gömülü organik madde, tip I kollajeni, proteoglikan agregalarını ve osteonektin gibi kemiğe özgü çok yapışkan glikoproteinleri içerir. Kalsiyum bağlayıcı glikoproteinler, özellikle osteokalsin ve matris veziküllerde osteoblastlar tarafından salınan fosfatazlar, matrisin kalsifikasyonunu destekler. Tip I kollajen içeren diğer dokular, osteokalsin veya matriks veziküller içermez ve normal olarak kireçlenmez. Yüksek kolajen içeriğinden dolayı, kalsifiye kemik matrisi genellikle asidofiliktir. (11).

Bir kemik kesitinin makroskopik olarak incelenmesi esnasında iki farklı alan göze çarpar. Bunlar; toplam kemik kütlelerinin %80'ini temsil eden kompakt (kortikal) kemiğe karşılık gelen yüzeye yakın yoğun bir alan ve geriye kalan %20'yi oluşturan

süngerimsi (trabeküler) kemik olarak adlandırılan çok sayıda birbirine bağlı boşluklu daha derin alanlardır (Şekil 2).



Şekil 2: Kemik dokunun makroskobik incelemesi

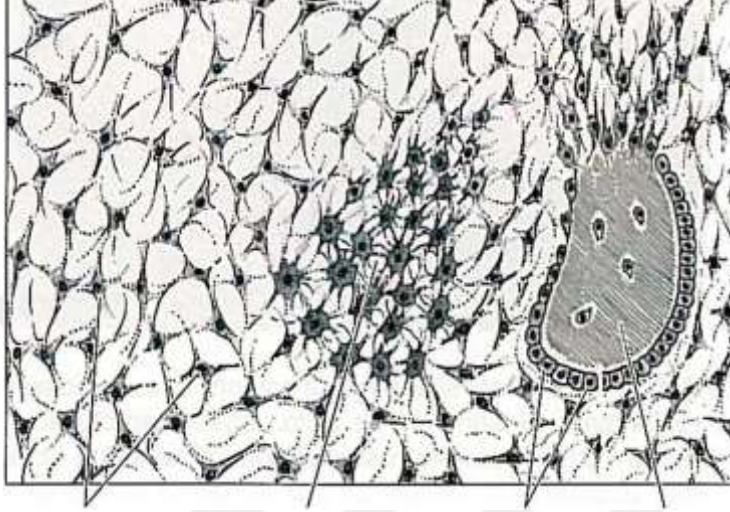
Kemik dokusu mikroskobik olarak ise iki temel çeşitle incelenmektedir (Şekil 3):

Primer kemik doku (immatür kemik doku), tamir veya yeni oluşum sürecinde ortaya çıkan ilk dokudur. Doğumda var olan primer kemik doku sonraki dönemde sekonder kemik doku ile yer değiştirir. Bu doku, düzensiz yerleşmiş kollajen liflerinin yanı sıra düşük mineral ve yüksek osteosit içerir.

Sekonder kemik doku ise erişkin dönemde görülen kemik dokusudur. Sekonder kemik dokuda kollajen lifler ya birbirlerine paralel lamellar yerleşim ya da vasküler bir kanal etrafında dizilim gösterirler (3).

İntramembranöz kemik oluşumunda kemikleşmenin olduğu yer, mezenkimal dokunun yoğun olduğu bir tabakadır. Bu tip bir oluşum, vücuttaki çoğu yassı kemiğin oluşması için geçerli olan mekanizmadır. Kafatası kemiklerinden frontal, oksipital, parietal, temporal kemikler, mandibula ve maksillanın bazı kısımları intramembranöz kemikleşme ile oluşur. Yüksek oranda vaskülarize olan embriyonik bağ doku içinde yer alan mezenkimal hücrelerin preosteoblast ve osteoblastlara dönüşmektedir.

Ossifikasyonun başladığı noktaya primer ossifikasyon merkezi denir. Kemikleşme merkezleri ışınsal büyüme paternine sahiptir, son aşamada kaynaşma meydana gelir ve kemik doku oluşur. Buna verilebilecek en iyi örnek, bebeklerin kafatasında yer alan henüz kemikleşmemiş fontanel adı verilen yumuşak bölgelerdir. (15,16).

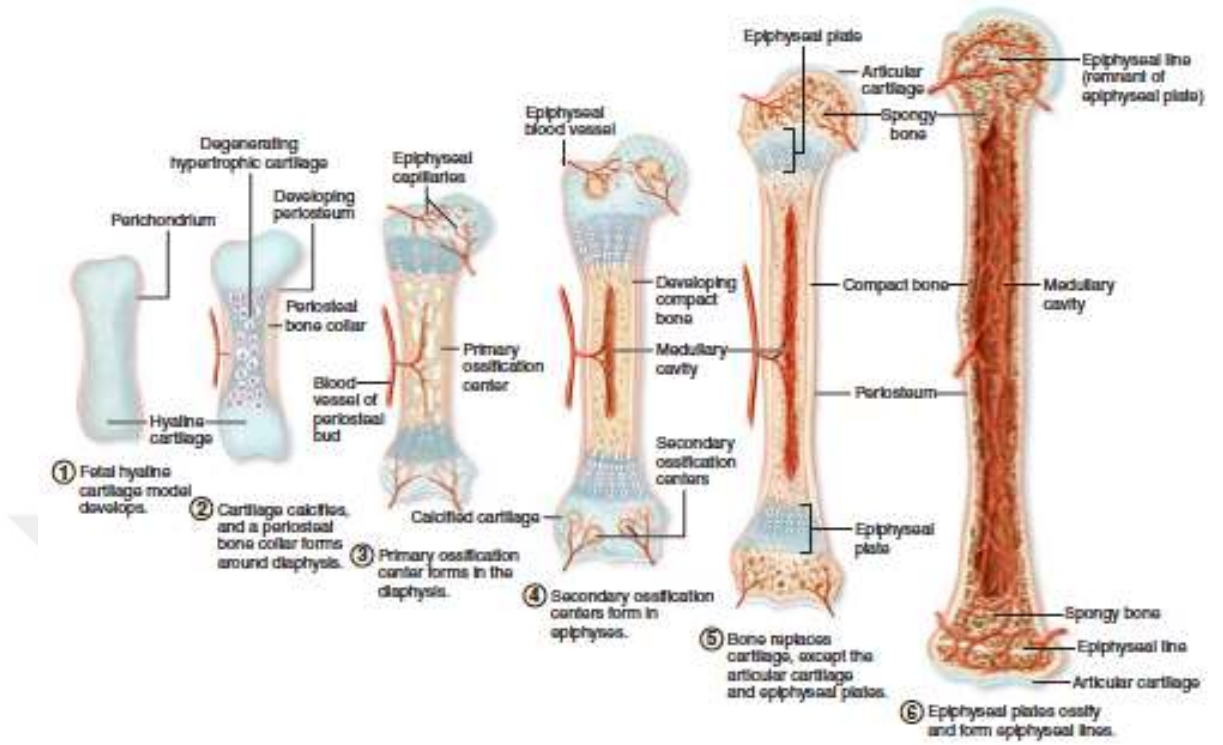


Mezenkim Kemik blasteması Osteoblast Birincil kemik dokusu

Şekil 3: Kemik mikroskopik incelemesi (15)

Endokondral ossifikasyon, temelde kısa ve uzun kemiklerin oluşumundan sorumlu olan mekanizmadır. Oluşum mekanizmasının başlangıcında damarlanması olmayan bir kıkırdak dokusu (kemik halkası) mevcuttur. Kemik halkası, prekondroblastların kondroblastlara dönüşmesiyle meydana gelir. Perikondrium bölgesinde bulunan mezenkimal hücreler sürekli bölünme ve farklılaşma eğilimindedir. Apozisyonel büyüme denen bu olayın sonucunda kondrositler hipertrofiye olurlar ve sonra da ölürlar. Böylece kemik yapıya benzer kıkırdak bir model oluşturulur. Uzun kemiklerin oluşumunda diafizi oluşturacak olan kısımdaki perikondrium tabakasının içerisinde oluşan kemik doku, ortaya çıkan ilk kemik dokudur (19) (Şekil 4).

Kemik oluşumunu; büyüme hormonu (GH), parathormon (PTH), kalsitonin (C) ve cinsiyet hormonları (Östrojen/Testosteron) kontrol eder (20).



Şekil 4: Kemik oluşum mekanizması

2.1.3. Kemik Zarları

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri, sırasıyla periosteum ve endosteum adı verilen kemik oluşturan hücrelere sahip doku katmanlarıyla kaplıdır.

- **Periosteum**

Perikondrium gibi organize edilmiştir. Dış katmanı, küçük kan damarları, kollajen demetleri ve fibroblastlarla yoğun bağ dokusundan oluşmaktadır. Perforan (veya Sharpey) lifler olarak adlandırılan periosteal kolajen lif demetleri, periosteumu kemiğe bağlayarak kemik matrisine nüfuz eder. Periosteumun iç katmanı, kemik astar hücreleri, osteoblastlar ve osteoprogenitör hücreler olarak adlandırılan mezenkimal

kök hücreleri içeren daha hücresel bir katmandır. Periosteumun temel işlevleri, kemik dokusunu beslemek ve apozisyonel kemik büyümesi veya onarımı için sürekli yeni osteoblastlar sağlamaktır.

- **Endosteum**

Periosteumdan önemli ölçüde daha ince olmasına rağmen, endosteum ayrıca osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar ve kemik astar hücreleri içerir (19).

Kemik zarlarının esas işlevi; kemiğin beslenmesi, büyümesi ve rejenerasyonunda kritik görevi olan osteoblast hücrelerinin sürekli sağlanmasıdır. Bu nedenle cerrahi işlemlerde kemik zarlarının bütünlüğünün korunması önem teşkil eder. (3).

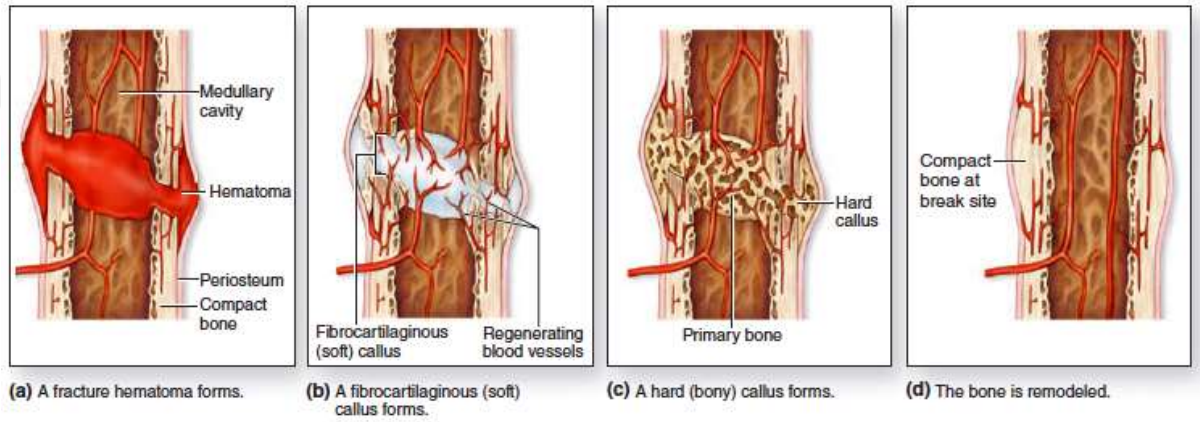
2.2. Kemik İyileşmesi

Kemik, periosteum, endosteum ve kemik iliğinde osteoprogenitör kök hücreler içerdiğinden ve çok iyi vaskülarize olduğundan mükemmel bir onarım kapasitesine sahiptir. Kemik kırıklarının ve diğer hasarların onarımı, hücreleri, sinyal moleküllerini ve kemiğin yeniden şekillenmesinde halihazırda aktif olan süreçleri verimli bir şekilde kullanır. Kemikte cerrahi olarak oluşturulan boşluklar, özellikle periostal doku mevcudiyetinde vücut tarafından yeni kemikle doldurulabilir (19).

Kemik iyileşmesi süreci, bağ dokusu matrisinin kireçlenmesini de içermesi dışında, cilt iyileşmesine benzer birçok özelliğe sahiptir. Kemik, biyolojik olarak ayrıcalıklı bir dokudur, çünkü onarımdan ziyade rejenerasyonla iyileşir. Tek başına bırakıldığında, kırık kemik sıralı doku oluşumu ve farklılaşması yoluyla kendi kendini onarabilir, bu süreç aynı zamanda dolaylı iyileşme olarak da adlandırılır (20).

Deride olduğu gibi, yaralanmadan kısa bir süre sonra kırık fragmanları arasında oluşan trombüs, haversian kanalları, kemik iliği ve periosteumdaki rüptüre damarlardan kanamayı durdurur. Kırık bölgesindeki nekrotik materyal, polimorfonükleer lökositleri ve ardından makrofajları kırık bölgesine çeken ani ve yoğun bir akut enflamatuar tepkiye neden olur. Düzenleyici hematom, onarıcı

hücrelerin göç edip işlevlerini yerine getirebileceği bir fibrin iskelesi görevi görür. İnflamatuar hücreler ve takip eden pluripotansiyel mezenkimal hücreler, hızlı bir şekilde fragmanlar arası boşlukları dolduran yumuşak bir doku üretmeye başlar. Kallus adı verilen bu lifli doku, kırıldak ve genç olgunlaşmamış lif kemiğinden oluşan yumuşak, ayrılmış kemik parçalarını bağlayarak ve parçalar arası hareketi sönümleyerek biyolojik bir atel görevi görür. Doku farklılaşmasının ve olgunlaşmasının düzenli bir şekilde ilerlemesi, sonunda kırık konsolidasyonuna ve kemik devamlılığının restorasyonuna yol açar (22) (Şekil 5).



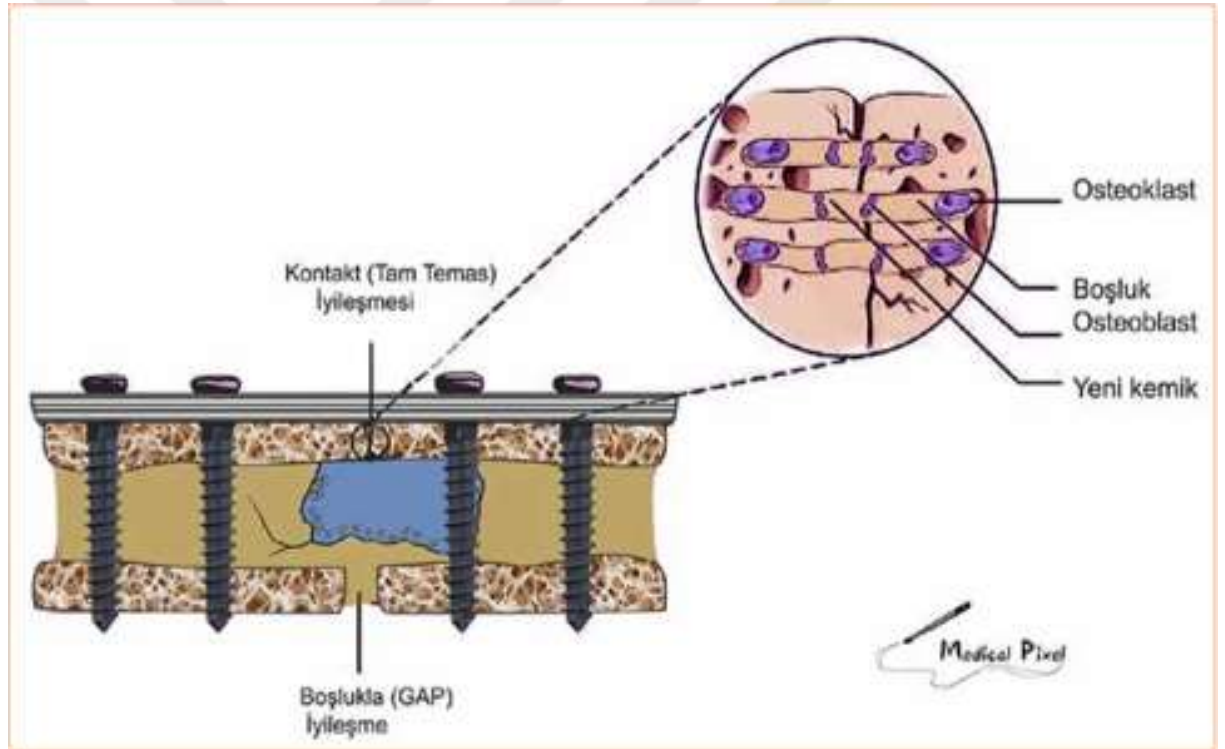
Şekil 5: Kemik iyileşmesi aşamaları

*Decker BC. Peterson ' s principles of oral and maxillofacial surgery , 2 nd edition by Michael. 2016. 2004–2006 p.

Kemik iyileşmesi, doğrudan(direkt) ve dolaylı (indirekt) olarak iki grupta incelenir:

2.2.1. Doğrudan/direkt iyileşme (primer iyileşme):

Kırık iyileşmesinin doğal sürecinde nadiren primer iyileşme görülür. Fragmanlar arasında hareketin olmadığı durumlarda, anatomik redükte pozisyonda doku kanlanmasında herhangi bir bozukluk yok ise, kallus dokusu oluşmadan, osteoblast ve osteoklast aktivitesiyle gerçekleşen iyileşmedir. Kırık, tam denge ve katı (rijid) tespit mevcudiyetinde primer olarak iyileşir. Temas ile ve küçük boşluk ile iyileşme olarak iki farklı şekilde gerçekleşebilen primer iyileşmede sonuç olarak dayanıklı bir kemik doku meydana gelir.



Şekil 6: Doğrudan ve dolaylı kemik iyileşmesi

* Tanrıkulu S, Gönen E. Kırık iyileşmesi. TOTBID Derg. 2017;16(6):455–75.

2.2.2. Dolaylı/indirekt (sekonder) iyileşme:

Genel olarak kırığın iyileşme şekli olan sekonder iyileşmede kırık fragmanları arasında mobilite olduğunda öncelikle yumuşak kallus, daha sonra ise sert kallus oluşur. Kırık bölgesinde periost altında intramembranöz kemikleşme ile medüller sert kallus, kırık uçlarında ve supraparisoteal alanda enkondral kemikleşme ile yumuşak kallus oluşur (Şekil 6).

Sekonder kemik iyileşmesinin yara iyileşmesine benzer şekilde 3 safhası vardır:

□ İnflamasyon Safhası

Travma sonrası çevresel ve intramedüller kanamayla hematoma oluşur, ardından inflamatuvar yanıt başlar. Bununla birlikte kırık çevresinde ve kırık uçları arasındaki hematoma pıhtılaşma ile oluşan fibrin, onarıcı hücrelerin göçünü kolaylaştıran iskelet görevi görür ve trombositler büyüme faktörlerini salgılar. Hematom, hematopoietik kök hücrelerin ve büyüme faktörlerinin salındığı bir kaynaktır. Bu bölgedeki hasarlı osteositler ve matriks dokusu nedeniyle oluşan inflamatuvar mediyatörler (TNF alfa, TGF beta, IL1 BETA, IL6, IL17F, IL18 ve IL23) vasodilatasyona ve inflamatuvar hücrelerin (PMNL, makrofaj, lenfosit) bu bölgeye toplanmasına neden olur (23).

Enflamasyon safhasında ilk görülen hücreler mezenkimal kök hücreleridir. Bölgeye göç eden mezenkimal kök hücreler burada pıhtıyı organize hale getirir. Daha sonra içeriye doğru migrasyon yapan kapillerler sayesinde pıhtı, 3 ila 4 gün içinde onarıcı fibrovasküler granülasyon dokusu ile yer değiştirir (11). İnflamasyon fazında hasarlı, ölü dokular uzaklaştırılır, inflamatuvar hücrelerden salınan sitokinler sayesinde anjiyogenezis uyarılır. (11,17).

□ Onarım Safhası

Hasarlı dokunun yerini iyileşme dokusuna bırakması sonrası, artan hücre sayısı ve matriks üretimi ile birlikte onarım başlar. İyileşme sürecinde kemik morfogenetik proteini, mezenkimal hücre çoğalmasının yanı sıra, farklılaşması ve hücre göçünde önemli role sahip bir proteindir. Sekonder iyileşmede hem intramembranöz hem enkondral kemikleşme gerçekleşir. Damarlanma anjiyopoetine ve VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü)'ye bağımlı olarak iki yoldan gerçekleşir (20,24).

Yumuşak kallusun sert kallus ile yer değiştirmesi sürecinde M-CSF (makrofaj koloni uyarıcı faktör), RANKL (nükleer kappa ligand reseptör aktivatör), OPG (osteoprotegerin) ve TNF-alfa etkisiyle mineralize kıkırdak doku rezorpsiyonu başlar. Kemik yapımında osteoblast ve osteoklastlar üzerine M-CSF, RANKL, OPG'nin önemli oranda etkisi olduğu düşünülmektedir. TNF-alfa'nın kondrosit apoptozunu başlatmasının yanı sıra mezenkimal kök hücreleri uyarıcı etkisi de vardır (20).

Onarım safhası, kemik parçaları birleşene ve kortikal kemik uçlarında devamlılık sağlanana kadar sürer. İyileşme dokusu oluşumunun hızı, miktarı, içeriği ve şekli değişkenlik gösterebilir. Ayrıca, kemiğin spongios veya kortikal yapısı, çevresinde yer alan yumuşak dokunun desteği ve stabilitesine göre iyileşme değişkenlik gösterir (20,23,25).

□ Yeniden Yapılanma Safhası (Remodelling)

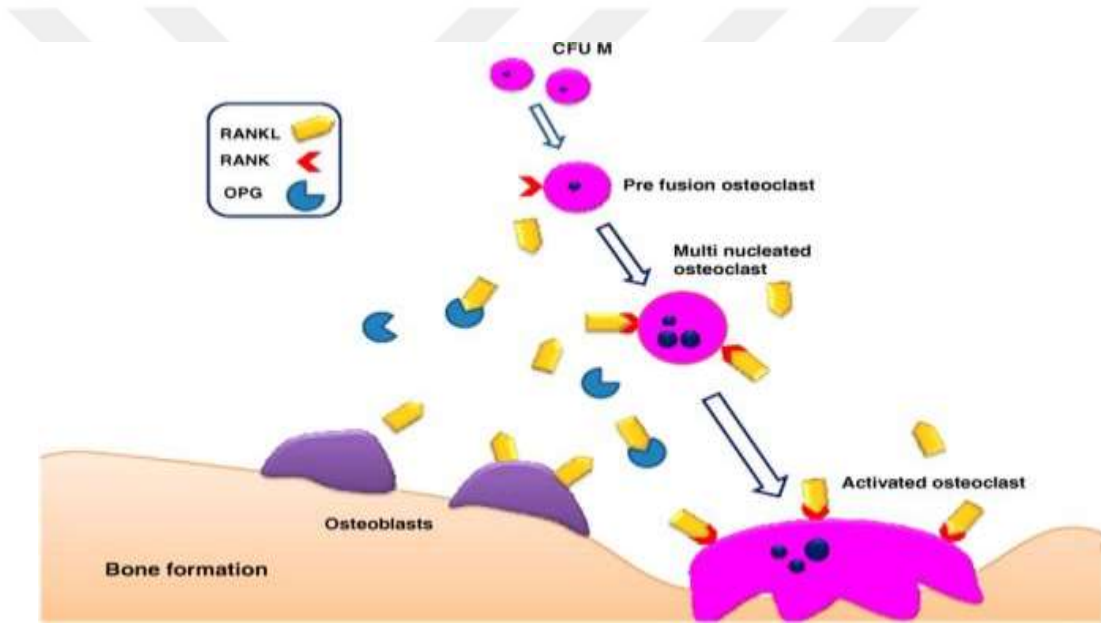
Kırık onarımı esnasında 3–4. haftalardan itibaren başlayan bu safha klinik olarak iyileşme olsa da yıllarca devam edebilmektedir. Kemik, üzerinde meydana gelen streslere bağlı olarak yeniden şekillenme özelliğine sahip bir dokudur. Dış kallus dokusu lamellar kemiğe; iç kallus dokusu ise medüller kaviteye dönüşür. (26).

Kemik yeniden oluşumu (remodelling) beş aşamadan oluşan bir süreçtir. Bu süreçle ilgili, iskelet yapının içindeki katmanlarda bulunan ve kemik döngüsünün içinde gerçekleştiği temel multisellüler üniteler (basic multicellular units= BMU) adıyla oluşumlar tanımlanmıştır (22,23).

1. Aktivasyon: Remodelling oluşturulacak olan alandaki temel multisellüler üniteler aktive edilirler. Osteoklastlar ilk görev alan hücrelerdir ve belirli miktardaki kemik hacmini rezorbe etmek ile görevlidir.
2. Rezorbsiyon: Aktif osteoklastların kemiği yıktığı aşamadır. Osteoklastlar, organelleri aracılığıyla kemik bölgesine tutunur ve salgıladıkları proteolitik enzimlerle kemik yıkımını gerçekleştirirler.
3. Geri dönüşüm: Osteoblastlar rezorbsiyon alanına yönelmeye başlamıştır. Dönüşüm fazında osteoklastların aktivite gösterdiği alanda, bazı mononükleer-makrofaj benzeri hücrelerin aktivasyonu ile bir sement hattı oluşturulur. Oluşturulan bu hat rezorbsiyon alanının sınırlarının belirlemesi için önemlidir. Sement hattının ayrıca rezorbsiyonu sonlandıran sinyalleri ürettiği de düşünülmektedir. Sonuçta oluşan yeni kemik doku ile eski doku birbirlerinden ayrı tutulurlar.
4. Formasyon: Bu safhanın temel hücreleri osteoblastlardır. Formasyon aşamasındaki osteoblast aktivitesi ortalama 2-3 ay kadar sürmektedir. Osteoid dokunun mineralizasyonu bu safhada gerçekleşir ve yaklaşık 10 gün sürer. Bu faz tamamlandığında, yüzey yassı astar hücreleri tarafından kaplanır ve yeni remodeling döngüsü başlayana kadar kemik yüzeyinde hücresel aktivitenin az olduğu, uzun süren bir dinlenme periyoduna geçilir.
5. Sukûnet: Bu aşamada yeniden şekillenme alanında oluşan kemik doku yeni bir remodelling döngüsüne kadar dinlenme evresinde kalır (15, 17).

Osteoblast ve osteoklast hücrelerinin birlikte fonksiyon görmesi kemik yapım-yıkım döngüsünün temelini oluşturan kritik etkenlerdendir. Kemik rezorpsiyonunu uyarıcı hormonlar, sitokinler gibi faktörlerin osteoblastları uyarmasıyla osteoblastların hücre membranında RANKL (Reseptör Aktivator Nükleer Kappa B) sentezlenir.

Osteoblastik hücreler ayrıca M-CSF'nin sentezini gerçekleştirir. RANKL ve M-CSF varlığında osteoklast öncül hücreleri membranlarında RANK ve c-Fms(koloni uyarıcı faktör) sentezlenir. Bu reseptörlerin etkileşimi ile (RANK/RANKL ve M-CSF/c-Fms) preosteoklastlar matür osteoklastlara farklılaşarak kemik yıkımı gerçekleştirirler. Bunun yanı sıra yine osteoblastlar tarafından sentezlenen osteoprotegerin (OPG), RANKL için yalancı reseptör görevi görerek RANK/RANKL bağlanmasını engeller ve böylece osteoklastik aktivite engellenir. Yapılan çalışmalar sonucunda OPG/RANKL oranının kemik kütlesini belirleyen esas faktör olduğu görülmüştür (2,27) (Şekil 7).



Şekil 7: Kemik yapım yıkım döngüsü

*<http://tip.baskent.edu.tr/kw/upload/464/dosyalar/cg/sempozyum/ogrsmpznm16/16.P9.pdf>

Periosteum, endosteum ve kemik iliği osteoprogenitör kök hücreler içermesi ve çok iyi vaskülarize olması nedeniyle, kemik normal olarak mükemmel bir onarım kapasitesine sahiptir. Kemikte cerrahi olarak oluşturulan boşluklar, özellikle periostal doku mevcudiyetinde yeni kemikle doldurulabilir (19).

2.2.1. Kritik Boyutta Kemik Defekti

Kendiliğinden iyileşmeye bırakılan bazı kemik defektlerinde, kavite fibröz konnektif doku ile dolar ve istenilen düzeyde bir yeni kemik formasyonu meydana gelemez. Bu durum, kemik iyileşmesinde olumlu etkilere sahip olan kemik greftleri, kemiğe benzer biyomateriyaller, otolog kan ürünleri veya rekombinant büyüme faktörleri gibi pek çok materyale olan gereksinimi artırmıştır (4,9,28).

Kritik boyutlu defektin standart bir tanımı yoktur. Defektler hem göreceli hem de mutlak olarak değerlendirilebilir ve hayvan modelleri veya insanlar açısından farklılık gösterebilir. Genel olarak, "kritik boyutta" bir defekt, cerrahi stabilizasyona rağmen kendiliğinden iyileşmeyen ve daha fazla cerrahi müdahale gerektiren bir boşluk olarak kabul edilir (29). Literatürde bu amaçla, dairesel, tam kat ve hayvanın yaşamı boyunca kendiliğinden kapanma şansı olmayan en küçük boyutta kemik defektleri şeklinde bir tanım geliştirilmiştir. Hayvan türü, yaşı ve bölge anatomisine göre boyutları farklılık gösteren bu defektlerde iyileşme kemikleşmeden ziyade bağ dokusu ile gerçekleşmektedir (17,30–32). Tavşan kalvaryası; intramembranöz gelişim göstermesi, kemik yapım yıkım döngüsünün hızlı olması ve bikortikal yapısıyla mandibulaya benzerlik göstermesi gibi avantajlarıyla maksillofasiyal cerrahi biyomateriyal araştırmaları için tercih edilen bir modeldir. Kalvaryada oluşturulan kritik boyutlu defektler ile ilgili yapılan çalışmada ideal boyutun 11mm olduğu bulunmuştur. Ancak grup sayısının artırılacağı durumlarda kritik boyutun 6 ila 8 mm'ye kadar düşürülebilmesi uygun görülmüştür (33,34). Kemik iyileşmesinin erken dönemi için 2-4 hafta; materyal stabilitesinin araştırılması ve geç dönem iyileşme takibi için tavşan kalvaryası modelinde 10-12 hafta ideal süreler olarak belirlenmiştir (33).

2.3. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Kemik Greftleri

Kemik greftlerinin oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanım amacı temel olarak istenen bölgede kemik iyileşmesi için yanıt oluşturmaktır. Greft uygulamasında oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevre kemik dokusu ile yapısal olarak bütünleşmesi ve oluşan kemiğin fonksiyon görmek için yeterli mekanik dayanıklılığa sahip olması beklenir (35).

İdeal bir greft materyalinde olması gereken özellikler şöyledir:

- ✓ Alıcı sahaya gelen dış etkenlere karşı dirençli olmalı,
- ✓ Gerekli miktarda elde edilebilmeli,
- ✓ Başka bir cerrahi yapılmasını gerektirmemeli,
- ✓ Uygun şekle getirilmesi kolay olmalı,
- ✓ Alıcı sahada konum ve formunu korumalı,
- ✓ Antijenik özellik taşımamalıdır.
- ✓ Maliyeti uygun olmalı ve uzun ömürlü olmalıdır (4,36).

2.3.1. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması

2.3.1.1. Otojen Kemik Greftleri (Otogreftler)

Otogreft olarak da bilinen, aynı kişide bir bölgeden başka bir bölgeye nakil yoluyla kullanılan greft tipidir. Otogreftlerin kullanımı kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda sıklıkla tercih edilen bir seçenektir, çünkü immunolojik olarak uyumlu osteoblast hücrelerini ve kemik morfogenetik proteinlerinin varlığında osteoblastlara dönüşebilen mezenkimal hücreleri sağlamaktadır. Kemik formasyonunda çatı görevi görerek yeni oluşan kemiğe uygun ortam sağlamaları ve

osteoinduktif potansiyele sahip büyüme faktörleri içermesi avantajları arasındadır. Bu nedenle osteogenetik, osteoinduktif ve osteokondüktif özelliklere sahip tek greft materyalidir. Otojen greft verici bölgeleri intraoral ve ekstraoral olarak ikiye ayrılmaktadır (5,37).

Otojen greftler kortikal, kansellöz ve kortikokansellöz, olmak üzere 3 şekilde elde edilebilir (4):

a. Kortikal Otojen Kemik Greftleri

Porozitesinin az olması nedeniyle damarsal yapıların greftin içine doğru ilerlemesi daha zor ve yavaştır. Kortikal kemikte kansellöz kemige nazaran daha az sayıda osteoblastik progenitör hücre bulunur. Kortikal kemik greftlerinin başlıca avantajları; mekanik olarak dayanıklı ve geniş kemik defektlerinin onarımında miktar olarak daha yeterli olmalarıdır (38). İntraoral olarak mandibular ramus kortikal otojen greft olarak sık olarak tercih edilen verici bir bölgedir.

b. Kansellöz Otojen Kemik Greftleri:

Medullar kemik ve kemik iliğini içerir, osteojenik hücre açısından zengindir. Partiküllü yapısı ve geniş yüzey alanı sayesinde revaskülarizasyon hızlı gerçekleşir, hücreler vitalitesini korur. Kortikal ve kortikokansellöz kemiklere göre daha hızlı revaskülarize olur fakat mekanik basınca daha dayanıksızdır. Endosteal osteoblastlar prolifer olduktan sonra kansellöz kemik trabeküller çevresinde osteoid oluştururlar. Bu formdaki greftler için en uygun verici bölge ekstraoral olarak iliak kemiktir. İntraoral olarak maksiller tüber bölge ideal bir verici bölgedir.

c. Kortikokansellöz Otojen Kemik Greftleri:

Kortikokansellöz greftler, kortikal kemik ile altında bulunan spongios kısmı birlikte içermektedir. Bu tip greftin avantajları, yaşayabilen osteoblastlar içermesi ve aynı zamanda yapısal bütünlüğü de sağlamasıdır (22,27). İntraoral olarak simfiz bölgesi uygun bir verici alandır.

Otojen kemik greftleri, elde edilmesi esnasında başka bir operasyon sahası gerekliliği, sınırlı miktarda temin edilebilmesi, manuplasyonunun zor olması ve hasta konforunun azalması gibi dezavantajlara sahiptir (4,33,34).

2.3.1.2. Allojenik Kemik Greftleri(Allogreftler)

Genetik olarak farklı bireyler arasında uygulanan greftler olan allogreftler günümüzde oral ve maksillofasiyal cerrahide rutin olarak kullanılmaktadır (39,40).

Allogreftler; poröz yapıları içinde progenitor hücrelerin ve endotelial hücrelerin bulunduğu birçok kimyasal alan içerirler. Aynı zamanda, osteoklastlar tarafından rezorbe edildiklerinde serbest kalan kemik matriks içinde büyüme faktörleri de içerirler (39,41). Modern allogreft kemik elde etme işlemleri esnasında uygulanan ileri yıkama basamakları ile greftin içinde kalan hücre sayısı azaltılır. Bu yıkama basamakları ile immunojenik antijenler ve virüs kaynaklı hastalık geçme riski de azaltılmış olur (4). Allogreftlerin yapım ve sterilizasyonu sırasında yapılan işlemler, kemiğin antijenitesini azaltırken, osteoindüktivite, osteokondüktivite ve diğer fiziksel özelliklerine de etkilidir. (4).

Allojenik greftlerin standart otogreftlere göre alıcı saha morbiditesinin olmaması, büyük boyutlu kemik defektleri için daha büyük miktarda ve değişik boyutlarda greft sağlanabilmesi, çeşitli formlarda(jel, toz, fiber ve macun) işlenebilmesi ve amaca yönelik kullanımın kolaylaşması gibi avantajları mevcuttur (4,39).

Hızlı rezorbe olmalarının yanı sıra, allogreftlerin üretiminde uygulanan metodların geliştirilmiş olmasına rağmen hastalık transferi ve antijenite riski bu greftlerin kullanımında çok düşük olsa da en büyük olumsuzlukları olarak gösterilmektedir (35).

2.3.1.3.Sentetik Greftler(Alloplastlar)

Otojen greftlerin elde edilmesi için ikinci bir cerrahi saha gerektirmesi, allogreftlerin ve ksenogreftlerin ise rezorpsiyon riskleri nedeniyle alternatif olarak üretilen, yapay olarak elde edilen greftlerdir. Kullanımları kolaydır ve istenildiği miktarda temin edilebilirler. Yapısal olarak kemiğin inorganik yapısına benzerler. Yalnızca osteokondüktif potansiyellerinin olması ve yabancı doku reaksiyonu meydana getirebilmesi sentetik greftlerin dezavantajlarıdır (42,43).

Pörözitelerine göre yoğun, makropöröz veya mikropöröz yapıdadırlar. Biyoaktif camlar, biyoseramikler ve polimerler olarak gruplandırılabilirler. Alloplastik greft materyalleri hidroksiapatit kristalleri, biyoaktif camlar, kalsiyum sülfat, beta trikalsiyum fosfat ve bifazik kalsiyum fosfat içerir. Hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat (TCP) gibi kalsiyum fosfat bileşikleri, polimetilmetakrilat (PMMA), ve PMMA ve hidroksietilmetakrilat (HEMA) polimerleri seramik matriksler olarak adlandırılırlar. Oral cerrahi pratiklerinde en sık kullanılan alloplastik greftler hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat formlarıdır (4). Kalsiyum fosfat ve hidroksiapatit (HA) gibi sentetik malzemeler, kimyasal bileşimdeki kemik mineral matrisine benzerlikleri, üstün biyouyumlulukları ve osteokondüktif özellikleri nedeniyle sıklıkla kullanılır (44,45).

2.3.1.4.Heterojen Kemik Greftleri (Zenogreftler)

Otojen kemik greftlerinin eksiklikleri ve riskleri; biyouyumluluk ve osteokondüksiyon gibi özellikleri birleştiren alternatif biyomateryal arayışını tetiklemiştir. Bu bağlamda, zenojenik kökenli materyaller 1960'lardan beri biyomateryal olarak araştırılmaktadır (46). Zenogreftler, alıcı canlıdan farklı türde bir canlıdan elde edilen greftlerdir. Genellikle sığır, doğal mercan, domuz ve at gibi canlılardan elde edilirler. Osteokondüktif olmakla birlikte herhangi bir osteojenik potansiyel sağlamamaktadırlar (47,48). Oral ve maksillofasiyal cerrahide en çok kullanılan zenogreft olan sığır kemiği, organik bileşenlerinden arındırılmak ve doğal kemik minerali elde etmek bir dizi işleminden geçirilir. Anorganik sığır kökenli kemik grefti, organik bileşenin düşük ısıda ve kimyasal olarak uzaklaştırılmasının ardından kalan süngerimsi ve kortikal kemiğin mikro gözenekli ve makro gözenekli yapısını tutan bir HA(hidroksiapatit) iskeletinden oluşur (49). Bu biyomateryaller, otojen kemiğe kıyasla, sınırsız miktarda kullanılabilirlik, düşük emilim oranı ve hastada daha az morbidite görülmesi gibi çeşitli avantajlara sahiptir (50).

Zenogreftlerin üretim aşamasında uygulanan yöntemler, osteokondüktivitenin yanı sıra rezorbsiyon özelliklerini de etkileyebilir. Ancak genel olarak üretim koşulu ortaya çıkan greftin anorganik olması gerekliliğidir. Donör hayvanın tüm kalıntıları, antijenik tepkileri en aza indirmek için çıkarılmalıdır. Bunun için donör hayvanlara ötenazi yapılır ve uzun kemikleri toplanır. Kemik küçük parçalara bölünür ve kurutulur. Kortikal ve spongioz kemik genellikle ayrılır. Kemik, üzerindeki lipitleri, proteinleri ve kollajeni gideren çözücüler içinde bol miktarda yıkanarak yağdan arındırılır. Ardından kemik bolca yıkanır ve son anorganik süreç olan ısıtılma işlemine geçilir (51).

Zenogreftler partikül, blok, jel ve putty gibi çeşitli formlarda üretilmektedir. Blok formdaki zenogreftler daha çok plastik ve rekonstrüktif cerrahi ile maksillofasiyal cerrahi alanında onlay greft olarak kullanılırken, partikül formları ise periodontal kaynaklı kemik defektlerinde, alveolar çekim kavitelerinde ve kist

boşluklarının tedavisinde kullanılmaktadır (4,52). Partiküllü formun gözenekli yapısı, malzemenin yüzey alanını büyük ölçüde artırır, böylece artan anjiyojenezis için bir substrat sağlar. Ayrıca yeni kemik oluşumu için bir iskele oluşturan zenogreft partiküllerinin kemik oluşumu ve yeniden şekillenme ile birleşebildiği prensibine dayalı histolojik bulgularla desteklenen çalışmalar mevcuttur (2, 37).

2.3.2. Kemik Greftlerinin Patofizyolojisi

Kemik grefti alıcı sahaya yerleştirildikten sonraki bir hafta içinde canlı kemik greft hücrelerinden erken kemik oluşumu gerçekleşir. Doğal kemik oluştukça, genellikle greft materyali ile tamamen yer değiştirir ve süreç bölgede yeni kemik oluşumu ile sonuçlanır (5,54).

Kemik greftlerinin biyolojisinin anlaşılması için belirli kavramların bilinmesi gerekir:

- ✓ **Osseointegrasyon:** Uygulanan kemik greft materyali ile rezidüel kemik arasında fibrotik herhangi bir tabaka oluşmadan mekanokimyasal bir bağın meydana gelmesidir.
- ✓ **Osseoindüksiyon:** Bu terim, ilkel, farklılaşmamış ve pluripotent hücrelerin bir şekilde kemik oluşturan hücre soyuna dönüşmek üzere uyarıldığı anlamına gelir. Uygulanan kemik greftindeki indükleyici proteinlerin veya kemik morfojenik proteinlerin etkisiyle mezenşimal hücrelerin osteoprogenitör hücrelere dönüşümü ile gerçekleşir
- ✓ **Osseokondüksiyon:** Kemiğin bir yüzeyde büyümesi demektir. Osteokondüktif yüzey, kemiğin yüzeyinde veya gözeneklere, kanallara veya borulara doğru büyümesine izin veren yüzeydir. Alıcının osteoblast hücrelerinden bir iskele boyunca yeni kemik oluşumudur. Defekt bölgesine yerleştirilen kemik greftinin bir çatı görevi görmesi ve zamanla rezorbe olup yeni oluşan kemik ile yer değiştirmesidir.

- ✓ **Osseogenenezis:** Kemik greftindeki hücrelerin alıcı sahada canlılığını koruyarak yeni kemik oluşturabilme potansiyelidir. Uygulandığı bölgede bu özelliği gösterebilen tek kemik grefti materyali otojen greftlerdir (4,22,26).

Günümüzde oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan greft materyalleri osteointegrasyon, osteogenenezis, osteokondüktif veya osteoindüktif özelliklerin birine veya birden fazlasına sahiptirler. Sadece otojen kemik grefti tüm bu gereksinimleri karşılamaktadır. Ksenogreftler osseokondüktif potansiyele sahiptir. Allogreftler, osseointegratif ve osseokondüktiftir, osseoindüktif potansiyel sergileyebilir, ancak canlı hücresel eleman içermemesi nedeniyle osseogenetik değildir. Sentetik kemik greftleri ise şu anda yalnızca osteointegratif ve osteokondüktif özelliklere sahiptir (4,35).

İnflamasyon, revaskülarizasyon ve osteoindüksiyon greftin uygulanmasından sonra erken dönemde başlayan dinamik bir süreç iken; yeniden şekillenme ve osseokondüksiyon aylar sürer. Kemik grefti iyileşmesinde 3 temel elemente ihtiyaç vardır:

- *Hücre komponenti:* Osteoblastlar ve osteoprogenitör hücrelerin bölgeye göçü ile yeniden damarlanma ve yenilenme başlar.
- *Büyüme ve farklılaşma faktörleri:* Polipeptit büyüme faktörleri (PGF, FGF, PDGF ve IGF)en önemlileridir. Farklılaşma faktörlerinden ise kemik morfogenezik proteini (BMP-2 ve 7) greft iyileşmesinde çok önemlidir.
- *Kemik iskele matriksi:* Osseoindüksiyon ve osseokondüksiyonun gerçekleştiği temel yapıdır (55).

2.3.3. Kemik Grefti Partikül Büyüklüğü

Kemik greftlerine üretim aşamasında uygulanan çeşitli yöntemlerle mekanik ve kimyasal özellikleri değiştirilebilmektedir. Greft materyallerine dışarıdan ilave edilen maddeler ile kemik onarımına katkı sağladığı kanıtlanmıştır. Özellikle sentetik kemik greft materyallerine ilave edilen silikat konsantrasyonlarının kemik yapımını anlamlı ölçüde artırdığı yönünde çalışmalar mevcuttur (56,57). Bu sayede greftlerin alıcı sahada daha etkin bir kemik yapım süreci oluşturduğu görülmüştür (40,41,42). Kemik grefti partikül boyutu da kemik oluşumu üzerinde önemli belirleyicilerdendir (59). Greft partikül boyutunun değişmesi, greftin kanlanması ve rezorbsiyonu gibi olaylarda kritik bir rol oynamaktadır. Dolayısıyla yeni kemik oluşumuna önemli etkisi olan bir faktördür (60,61).

Maksillofasiyal cerrahide kullanım alanlarına göre çeşitli partikül boyutlarında üretilen kemik greftleri tercih edilmektedir. Ayrıca otojen olarak elde edilen kemik veya dentin greftleri de çeşitli partikül boyutlarında öğütülerek kullanılabilir (60,62,63). Greft partikül boyutları genellikle küçük, orta ve büyük olarak üç boyuta ayrılmaktadır. Maksiller sinüs yükseltme operasyonu ve kret split cerrahisi gibi geniş ogmentasyon alanlarında çoğunlukla büyük partiküllü kemik grefti uygulaması tercih edilmektedir (64,65). Ancak bu tercihin sebepleri arasında defekt sahasının büyüklüğünden kaynaklı olarak kullanılan greft miktarını ve dolayısıyla maliyeti azaltmak çoğunlukla başta gelmektedir (66).

Farklı greft partikül büyüklüklerinin kıyaslandığı çeşitli klinik ve hayvan çalışmalarında belirli bir partikül boyutunun yeni kemik oluşumunda daha üstün olduğu sonucuna varılmamıştır. İki partikül boyutunun da kemik yapımına olumlu etkisinin bulunduğu çalışmalar mevcuttur (61,67). Greftin rezorbsiyon oranı, rezidüel greft oranı ve kanlanma gibi parametrelerin incelendiği çalışmalarda partikül büyüklüğü ve rezorbsiyon arasında korelasyon saptanmıştır. Küçük partiküllü kemik greftlerinin büyük partiküllü greftlere göre daha hızlı rezorbe olduğu ve kemik yapımını artırdığı; büyük partiküllü greftlerin ise uygulandığı bölgede daha çok fibröz bağ doku ve immatür kemik gözlendiği sonucuna varılmıştır (52,68). Başka bir

çalışmada, küçük ve büyük iki farklı partikül boyutu arasında yeni kemik oluşumu, vaskülarizasyon ve rezidüel greft miktarı açısından anlamlı fark bulunamadığı rapor edilmiştir (62).

Kret split ogmentasyonunda iki farklı partikül boyutlu greftin kıyaslandığı klinik bir çalışmada ise toplam kemik hacmine bakıldığında büyük partiküllü greftlerin yeni kemik oluşturmada daha başarılı olduğu ve rezorbsiyon oranının da küçük partiküllere kıyasla daha az olduğu bulunmuştur (64).

Bilateral olarak maksiller sinüs yükseltme yapılan ve iki farklı partikül boyutlu zenojenik greft kullanılarak yapılan klinik bir çalışmada ise büyük partiküllü (1,0- 2,0 mm) greftlerin histolojik olarak yeni kemik oluşum oranının yüksek olduğu sonucuna varılmıştır (67).

Bir diğer çalışmada, küçük ve büyük partiküllü dondurup kurutulmuş allogreftlerin osteogenesis üzerindeki etkisini araştırmak için maymun modeli kullanılmıştır. Sonuç olarak, daha küçük partiküllü kemik greftlerinin osteogenesisde daha etkili olduğunu belirtmişlerdir (59).

Bu nedenle, yayınlanan veriler, dental implantların yerleştirilmesi için optimal kret genişliğini elde etmek için kullanılması gereken greft materyali tipi ve partikül boyutu konusunda kesinlik belirtmemektedir.

2.4. Trombosit Konsantrasyonlarının Tarihsel Gelişimi

Fibrin yapıştırıcılar, ilk defa Matras (69) tarafından, ratlarda cilt iyileşmesi araştırması esnasında geliştirilmiştir ve 40 yıldan uzun süredir tıpta çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Fibrin yapıştırıcıları, fibrinojenin trombin ve kalsiyum ile polimerize edilmesiyle üretilmektedir. Ancak donör plazmasındaki düşük fibrinojen konsantrasyonu nedeniyle fibrin yapıştırıcının kalitesi ve stabilitesi, uygulama açısından ideal koşulları sağlamamaktadır (10).

İlk defa 1956 yılında Kingsley, trombositten zengin plazma (TZP) adıyla kan pıhtılaşması modeliyle bulduğu bir konsantrasyon tanımlamıştır (70). Bir TZP konsantrasyonu, %4 eritrosit, %95 platelet ve %1 beyaz kan hücresi içerir. Doğal bir

kan pıhtısı %95 eritrosit, %5 platelet, %1'den az beyaz kan hücresi ve çok sayıda fibrin ipliği içerir.

Plateletlerden salgılanan faktörler şunlardır: PDGF (platelet kaynaklı büyüme faktörü), VEGF (vasküler endotelyal kaynaklı büyüme faktörü), TGF (transformatör büyüme faktörü), EGF (epidermal büyüme faktörü). Bu faktörler pıhtılaşma sonrası 10. dakikada salgılanmaya başlar, önceden sentezlenmiş büyüme faktörlerinin %95' inden fazlası 1 saat içinde salgılanır (71). Kemik iyileşmesinde süreç kan pıhtılaşması (fibrin oluşumu) ile başlar. Bu nedenle, trombosit konsantrasyonları bu süreci güçlendirici ajan olarak tanıtılmıştır (70,72).

1986 yılında trombosit kaynaklı yara iyileşmesi faktörleri (PDWHF) tanımlanmıştır. Ancak bu ürünler, içeriklerine veya mimarilerine bakılmadan genel olarak TZP olarak adlandırılmış ve bu durum uzun yıllar devam etmiştir (73).

Choukroun ve ark (9) önceki preparasyonda bulunan güçlü fibrin jel polimerizasyonuna dayalı olarak trombosit zengin fibrin (TZF) olarak adlandırılan başka bir trombosit konsantrasyonu geliştirmiştir. Diğer TZP konsantrasyonlarından farklı yapıda olduğu için TZF, “ikinci nesil” trombosit konsantresi olarak tanımlanmıştır ve bu durum terminolojinin gelişmesinde önemli bir dönüm noktası olmuştur (9).

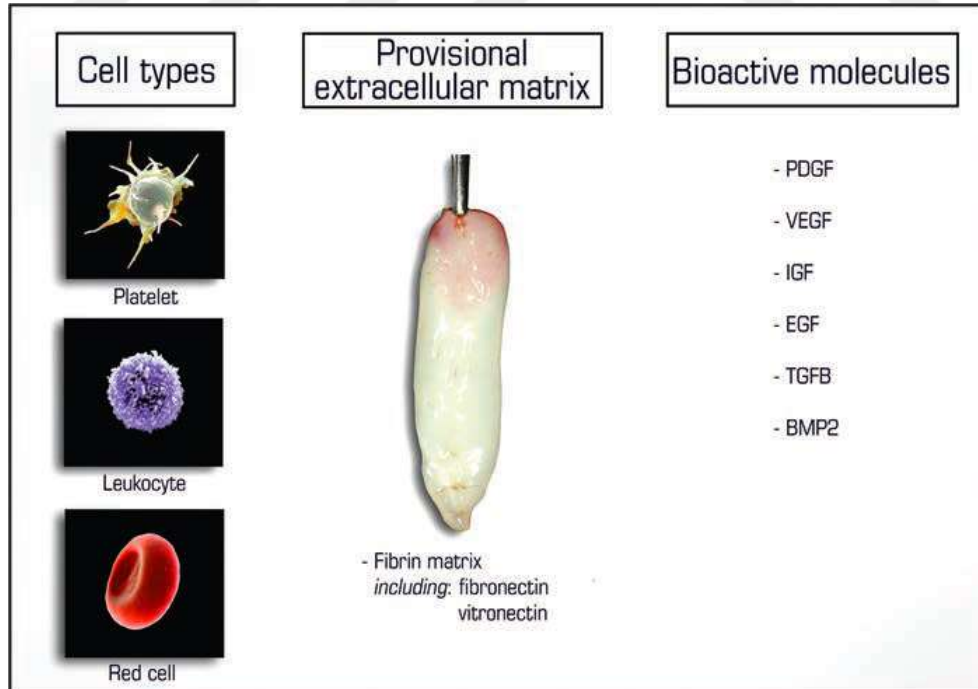
TZF'den sonra konsantre büyüme faktörleri (CGF) kavramı tanıtılmıştır. CGF'nin eldesinde özel bir santrifüj cihazı ve farklı bir santrifüj hızı kullanılmaktadır, bunun da büyüme faktörlerinden çok daha yoğun, daha büyük ve daha zengin bir fibrin matrisinin ayrılmasını sağladığı söylenmiştir (74).

Trombosit konsantreleri ile ilgili ilk sınıflandırma Dohan Ehrenfest ve ark(10) tarafından önerilmiştir. Bu sınıflandırma, hücreli içerik (öncelikle lökositler) ve fibrin mimarisini iki anahtar parametre kullanarak ürünleri 4 ana aile şeklinde ayırmıştır: (1) Saf plateletten zengin plazma (P-TZP) - veya lökositten fakir trombosit zengin plazma (LP-TZP); (2) Lökosit- trombosit zengin plazma (L-

TZF); (3) Saf TZF (P-TZF) - veya lökositten fakir TZF; ve (4) Lökosit ve trombosit açısından zengin fibrin (L-TZF) (10).

2.4.1. Trombositten Zengin Fibrin(TZF)

Tam kandan toplanan trombosit konsantreleri ilk olarak Choukron ve ark tarafından trombosit zengin fibrin (TZF) adıyla piyasaya sürülmüştür. Tıp alanında, iyileşmesi zor ülser ve yaraların tedavisinde başarılı sonuç elde etmesiyle TZF'nin popülaritesi giderek artmaktadır. Konsept, kan kaynağının doku yenilenmesi için çok gerekli olduğu fikrine dayanarak, damarlanma ve dokuda büyümeyi destekleyen büyüme faktörleri kaynağı olarak insan kan proteinlerini kullanmak amacıyla geliştirilmiştir. TZF, 2700 rpm'de (750 g) 12 dakikalık, sadece bir döngü gerektiren daha basit bir santrifüj protokolü kullanılarak geliştirilmiştir. Böylece üç boyutlu bir fibrin matris elde edilmiştir (9).



Şekil 8: TZF'nin üç ana bileşeni

*Miron R, Choukroun J. Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry. 2017. 268 p.

TZF; trombositler, lökositler, makrofajlar, granülositler ve nötrofiller dahil olmak üzere bir dizi hücre içerir. Santrifüjleme döngüsünün ardından, bu hücrelerin çoğu üç boyutlu fibrin matrisi içinde tutulur. İkinci jenerasyon trombosit konsantrasyonu olarak tanımlanan TZF, birinci nesil trombosit konsantreleri olan PRP ve PRGF ile karşılaştırıldığında daha fazla sayıda lökosit içermektedir. Bu nedenle, L-TZF (lökosit ve trombositten zengin fibrin) de denilmektedir (9,15).

TZF, pıhtılaşma sürecini önleyen ajanlar veya diğer doğal olmayan yan ürünler kullanılmadan üretilen ve bu nedenle %100 otolog olarak kabul edilen bir trombosit konsantrasyonudur. Doku ve yara iyileşmesi için gerekli olan konakçı hücreler, üç boyutlu bir fibrin matrisi ve büyüme faktörleri içeriği ile dış hekimliği alanında başta yumuşak dokuların iyileşmesi için otolog bir yardımcı ürün olarak kabul edilmiştir (9). TZF' nin dokudaki iyileşmeyi hızlandırması sebepleri; neovaskülarizasyon özelliği, hızlı sikatrisyel doku iyileşmesi ve uygulandığı alanda enfeksiyonun neredeyse hiç olmaması gibi faktörlerdir (75). Ayrıca, yapılan çalışmalarla TZF ürünlerinin kemik iyileşmesine de katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. TZF'nin tek başına veya kemik grefti ile birlikte kullanımında kemik iyileşmesine olumlu etkileri olduğu bulunmuştur (14,76,77).

Her cerrahi müdahaleden sonra yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonunda trombosit ve lökositler önemli rol oynamaktadır. Bu süreç, enflamasyon, üreme ve yeni doku oluşumu dahil olmak üzere birbirini takip eden üç aşamadan oluşur (78).

Enflamasyon ve yara iyileşmesi bir dizi büyüme faktörü tarafından düzenlenmektedir. Büyüme faktörleri, hücrel göçü, yapışmayı, çoğalmayı ve farklılaşmayı uyarabilir veya engelleyebilir. Rekombinant büyüme faktörlerinin aksine, trombosit konsantreleri aynı anda birçok otolog büyüme faktörünü salgılama özelliğine sahiptir. Trombositler ve makrofajlar, dönüştürücü büyüme faktörü beta-1 (TGF- β 1), PDGF, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), epidermal büyüme

faktörü (EGF) ve insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) dahil olmak üzere çok sayıda faktörü serbest bırakır (16).

TGF- β 1: Kemotaksis ve mitogeneze osteoblast öncülerine katkıda bulunan transformik büyüme faktörü kemik oluşumu sırasında önemli bir rol oynar ve kemik kollajen matrisi üzerinde mineralize dokunun osteoblast birikimini uyarır. Ayrıca TGF- β 1'in VEGF'yi regüle edebildiği ve böylece anjiyogenezi ve inflamatuvar hücrelerin toplanmasını desteklediği bildirilmiştir.

PDGF: Trombosit kaynaklı büyüme faktörleri, mezenkimal hücre soylarının göçü, çoğalması ve hayatta kalması için temel düzenleyicilerdir ve yara iyileşmesi sırasında ekstrasellüler matriksin yeniden şekillenmesi için kollajen üretimini teşvik eder. Temel olarak trombositlerden salınan PDGF, TZF matrisinde yüksek miktarlarda birikir ve zaman içinde TZF'den salınan önemli moleküllerden biri olarak kabul edilir. PDGF'nin son derece kısa bir yarı ömre sahip olması nedeniyle, TZF matrisi yavaş ve kademeli salınımı için destek görevi görmektedir.

VEGF: Vasküler endotel büyüme faktörü, aktive trombositler ve makrofajlar tarafından anjiyogenezi teşvik etmek için hasarlı bölgelere salgılanır. VEGF ailesi, PDGF ile ilişkilidir. Doku yeniden şekillenmesi üzerinde güçlü etkileri vardır ve çeşitli kemik biyomateriyallerine rekombinant insan VEGF'sinin dahil edilmesinin yeni kemik oluşumunu arttırdığı, böylece VEGF'nin hızlı ve güçlü etkilerine işaret ettiği gösterilmiştir (79).

EGF: Endotelyal büyüme faktörü, akut yaralanmadan sonra salınır ve yaraların gerilme mukavemetini önemli ölçüde artırır. EGF reseptörü, fibroblastlar, endotelyal hücreler ve keratinositler gibi yara onarımı sırasında kritik bir rol oynayanlar dahil olmak üzere çoğu insan hücre tipinde eksprese edilir (80).

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörleri, hücre koruyucu ajanlar olarak işlev gören çoğu hücre tipinin proliferasyon ve farklılaşmasının pozitif düzenleyicileridir. Bu

büyüme faktörü, aktivasyon ve degranülasyon sırasında trombositlerden salınır ve mezenkimal hücrelerin farklılaşmasını ve mitogenezi uyarır (11).

TZF sadece membran formunda bir fibrin değildir. Aynı zamanda optimal iyileşmeye izin veren tüm moleküler ve hücresel elementleri içeren bir matristir. Bu matris, bir kan örneğinde bulunan tüm uygun bileşenleri taşır. Dolayısıyla herhangi katkı maddesi olmadan veya manipülasyon yapılmadan elde edilen bu biyomateryal fizyolojik bir konsantre olarak kabul edilmektedir (81).

2.4.2. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrinin (İ-TZF) Gelişimi

TZF bazlı matriks preparatlarının tek başına ya da biomateryaller ile kombine olarak başarılı ile uygulandığı birçok çalışma yapılmıştır. Ancak, zaman içinde araştırmacılar sıvı formda bir konsantrasyonun eksikliğini duymuş ve buna yönelik araştırmalar yapmışlardır (82). TZF matrisinde bulunan hücreler histolojik olarak nicelleştirilirken elde edilen ilginç bulgulardan biri, lökositlerin çoğunluğunun fibrin pıhtısının dibine yakın bulunduğu gözlemlenirdi. Bu bulguya dayanarak, çok yüksek santrifüjleme hızlarının (g-kuvvetlerinin) lökositleri santrifüj tüplerinin dibine ve TZF matris pıhtısından uzağa ittiği açıkça ortaya çıkmış oldu. Bu nedenle araştırmacılar, lökositlerin matris boyunca dağılmasını sağlayabilecek düşük santrifüj hızlarını araştırmaya başlamışlardır (9). Sonuç olarak, katı TZF matrisine göre hücresel açıdan daha zengin ve daha yüksek rejeneratif kapasiteye sahip olan sıvı formda bir TZF formu geliştirmişlerdir (83).

Hastadan alınan kan, içinde herhangi bir antikoagülan ajan veya katkı maddesi bulunmayan plastik boş bir santrifüj tüpünde 700 rpm (60 g) gibi çok düşük bir hızda ve kısa bir santrifüj süresi (3 dakika) ile enjekte edilebilir trombositten zengin fibrin(i-TZF) formuna dönüşmektedir. Katı TZF matrisi eldesinde kullanılan cam tüplerin aksine plastik tüplerde kan pıhtılaşma süreci santrifüj boyunca aktive olmamaktadır (9,83).

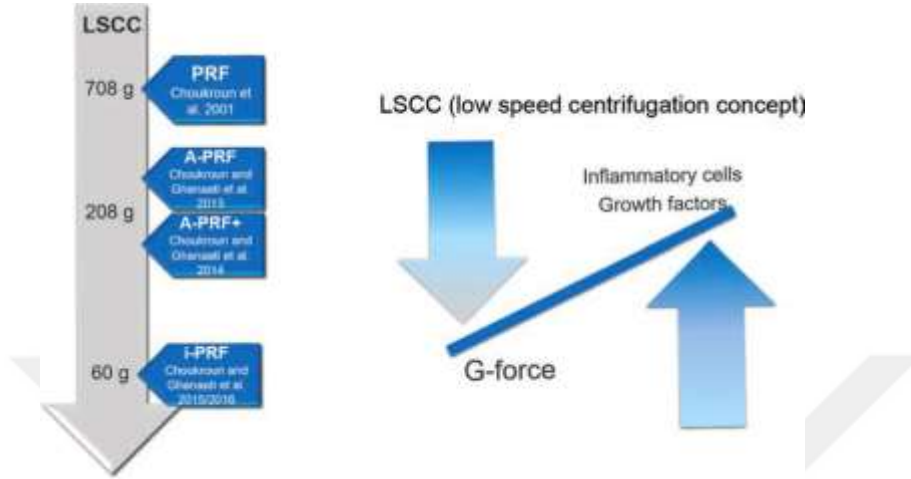
Platelet konsantrasyonlarından trombositten zengin plazma (TZP), doğası gereği sıvı formda olduğu için, başlangıçta TZP'nin çeşitli kemik biyomateryalleri ile

birlikte kullanımı önerilmiş olsa da uygulama sonrası büyüme faktörü salınımının çok erken gerçekleştiği ve bunun kemik iyileşmesine katkısının olmadığı ortaya çıkmıştır (9). Ayrıca, TZP hazırlama tekniği, pıhtılaşma faktörlerine ek olarak sıgır trombini veya CaCl_2 'nin ek kullanımını gerektirir, bu da iyileşme potansiyelinde bir azalmaya yol açar. Bazı durumlarda, TZP hazırlama protokolünün tamamı, 1 saatten fazla süren birkaç ayırma aşamasına ihtiyaç duyar ve bu durum rutin tıbbi endikasyonlar için verimsiz bir süredir. Bu nedenle alternatif olarak farklı bir santrifüj protokolü ile elde edilen enjekte edilebilir TZF (i-TZF) formülasyonu geliştirilmiştir. TZP ile i-TZF karşılaştırıldığında; büyüme faktörü salınımının erken dönemde i-TZF'de daha yüksek oranda olduğu bulunmuştur. Ayrıca, 7. günde önemli ölçüde en yüksek TGF- β mRNA seviyeleri, 3. günde PDGF ve hem 3 hem de 7 günde kollajen1 ekspresyonu göstermiştir (9,84,85).

Monositler ve makrofajlar, yumuşak doku iyileşmesinde olduğu kadar biyomateryal bazlı doku rejenerasyon sürecinde de birincil öneme sahiptir. Biyomateryal implantasyonundan sonra, oksijen ve besin sağlamak ve biyomateryal rejeneratif kapasitesini arttırmak için yeterli vaskülarizasyon gereklidir. Bir deri altı implantasyon modelinde yapılan in vivo çalışma, tek başına kemik greft implantasyonuna kıyasla, sentetik kemik grefti ile kombine edilmiş periferik kandan izole edilen monositlerin implantasyonunun, önemli ölçüde geliştirilmiş bir vaskülarizasyon modeline katkıda bulunduğunu göstermiştir. Bu bulgular, bu hücrelerin yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) alanlarındaki rolünü vurgulamaktadır (86). Bu nedenle, geliştirilmiş monosit konsantrasyonlarına sahip i-TZF matrisi, yönlendirilmiş kemik ve doku rejenerasyonunu desteklemek için otolog bir rejeneratif hücre kaynağı olarak kabul edilmektedir.

Enjekte edilebilir TZF, büyüme faktörünün fibrin içinde uzun süreli tutulmasına neden olan fibrinojenin yüksek afiniteli büyüme faktörü bağlama bölgesi olan heparin bağlama alanına potansiyel olarak daha fazla büyüme faktörü bağlanmasına izin verir. Bu yeni formülasyon maksillofasiyal cerrahide de fibrin kemik grefti oluşturmak üzere kemik greftleri ile karıştırmayı içeren çeşitli prosedürler için kullanılabilir. Daha düşük santrifüjleme hızları ve süresi nedeniyle yüksek oranda lökosit ve kan

plazma proteinleri içermektedir ve kemik yapımını uyarıcı mediyatörlerin salınımını artırmaktadır (9,87).



Şekil 9: Düşük santrifüj hızı konsepti ve platelet konsantrasyonları

* Miron R, Choukroun J. Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry. 2017. 268 p.

2.4.3. İ- TZF'nin Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Uygulama Alanları

Trombosit konsantreleri zaman içinde birçok değişime uğrayarak daha çok geliştirilmiştir. Başta sadece yara iyileşmesi gibi kullanım alanları mevcutken günümüzde kemik ve yumuşak doku iyileşmesinde pek çok olumlu etkisinin olduğu bilinmektedir. Dolayısıyla oral ve maksillofasiyal cerrahi alanında uygulama endikasyonları gün geçtikçe artmaktadır. Uygulaması kolay ve maliyeti düşük olan bu yöntem ile iyileşmeyi hızlandırıcı birçok faktör de ortama salınmaktadır.

Düşük santrifüj hızı konseptine bağlı olarak geliştirilen A-PRF ve i-TZF'nin daha zengin hücre içeriği ve büyüme faktörüne sahip olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla bu konsantrasyonların tek başına veya kemik greft materyalleriyle birlikte oral ve maksillofasiyal cerrahide pek çok uygulama alanı bulunmaktadır (16,85).

Dental implant uygulamalarında, ideal kemik kalitesine ulaşmak amacıyla kullanılan; çekim soketi koruma ve yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu gibi ogmentasyon yöntemlerinde i-TZF'nin kemik greft materyalleriyle birlikte kullanımının pek çok avantajı vardır. Çene kemiklerinin atrofisinin önlenmesinin yanı

sıra; kemik grefti materyali ile kombine uygulanmasıyla alıcı bölgenin rejenerasyon sürecini hızlandırmaktadır, böylelikle daha hızlı ve fazla miktarda kemik oluşumunu sağlamaktadır (11,88,89).

Maksillofasiyal cerrahide kritik öneme sahip bir diğer konu da temporomandibular eklem (TME) hastalıklarıdır. Eklem disfonksiyonu kronik ağrı ile karakterize bir durumdur. TME boşluğuna i-TZF enjeksiyonu sonrasında hastalardan görsel analog skala (VAS) ile ağrı değerlendirilmesi yapılan çalışmada ağrının azaldığı ve klinik semptomların gerilediği bulunmuştur. Bu nedenle, özellikle kronik ağrıya sahip hastalarda ağrıya neden olan alana i-TZF uygulanmasının ağrı kesici ihtiyacını ve bu ilaçların yan etkilerini azaltacağı belirtilmiştir (90).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul

Çalışma için gerekli etik kurul onayı, Ege Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 24.06.2020 tarihli ve 2020-076 sayılı kararı ile alındı.

3.2. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.2.1. Deney Hayvanları

Çalışmamızda Ege Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde üretilmiş olan dişi ve erkek eşit sayıda olmak üzere toplam 18 adet Yeni Zelanda türü tavşan kullanıldı.

3.2.2. İ-TZF'nin Eldesi

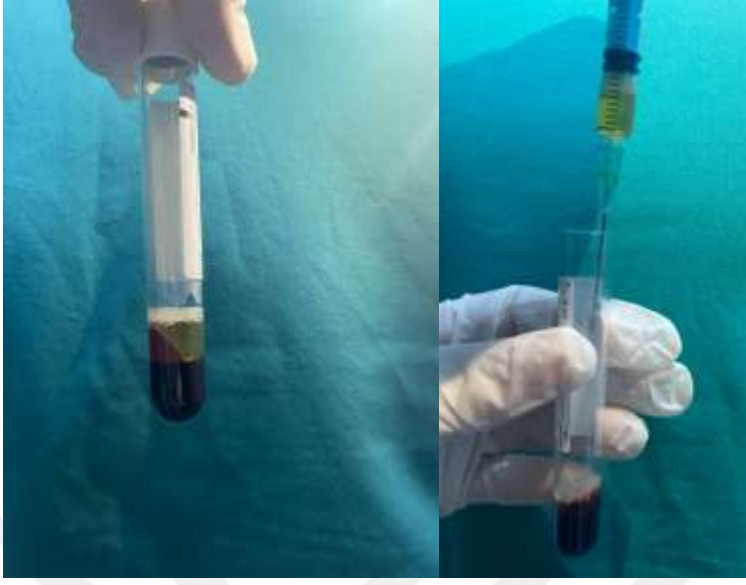
Tavşanların marjinal kulak veninden 26 Gauge luk bromülle alınan yaklaşık 3 mL kan vakumlu beyaz kapaklı içi boş plastik tüplere aktarıldı (Resim 1). Elde edilen kan örnekleri santrifüj cihazında (Hettich® EBA 20S, Germany) 700 rpm hızda 3 dakika boyunca santrifüj edildi. Tüpün en üst tabakasında yer alan sıvı formdaki TZF enjektör ile çekildi (Resim 2 ve 3).



Resim 1: Tavşanın kulak veninden kan alınması



Resim 2 Santrifüj cihazına tüplerin dengeli olacak şekilde yerleştirilmesi ve devirin 700 rpm/3 dk ayarlanması



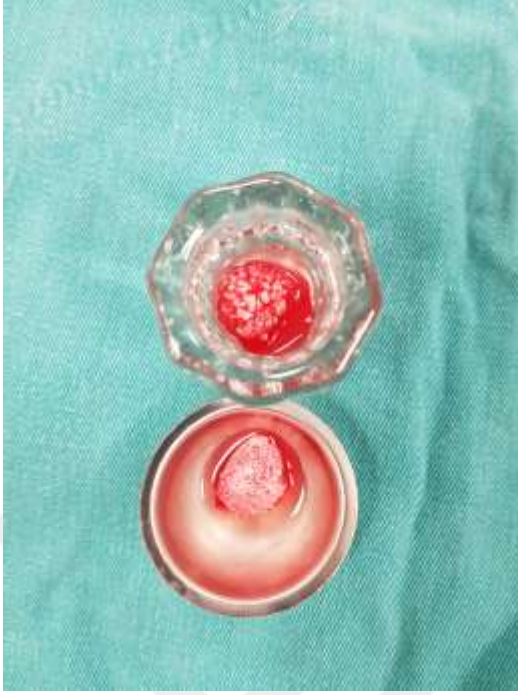
Resim 3: i-TZF'nin eldesi ve enjektöre çekilmesi

3.2.3. Sticky Bone Eldesi

Enjektöre çekilen i-TZF, küçük ve büyük partiküllü zenojenik greft materyalleri (Resim 4) ile ayrı godelerde karıştırıldı. Yaklaşık 5 dakikalık bir bekleme süresinin ardından *sticky bone* kıvamının elde edildiği gözlemlendi (Resim 5).



Resim 4: Küçük (0,25-1.0 mm) ve Büyük (1.0-2.0 mm) partiküllü sığır kaynaklı kemik grefti



Resim 5: Graftler ile i-TZF'nin godede karıştırılması ve Sticky Bone eldesi

3.3.Yöntemler

3.3.1. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Deney hayvanları Ege Üniversitesi Laboratuvar Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edildi ve bakımları aynı merkezde yapıldı. Çalışma, ağırlıkları ortalama 3-4 kilogram olan erkek ve dişi eşit sayıda olacak şekilde toplam 18 adet Yeni Zelanda türü tavşan üzerinde gerçekleştirildi. Tavşanların bakım koşulları ise su ve yeme rahat ulaşabilmeleri, yeterli hareket alanına sahip olmaları ve stressiz ortam sağlanması açısından her biri ayrı kafeslerde olacak şekilde $22\pm2^{\circ}\text{C}$ sıcaklıkta, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Standart laboratuvar yemi (kuru pellet) ve su verilerek beslendi.

3.3.2. Deney Hayvanlarının Gruplandırılması

Tavşanların tümünde her biri farklı bir grubu temsil edern 4 adet kraniyal kemik defekti oluşturuldu. Bu gruplar aşağıda belirtildiği gibi alt gruplara ayrıldı:

K+ i-TZF grubu: Birinci defekte küçük partiküllü sığır kaynaklı kemik grefti (0.25-1.0 mm) ve enjekte edilebilir trombositten zengin fibrin (i-TZF) karışımının uygulandığı grubu göstermektedir.

K grubu: İkinci defekte sadece küçük partiküllü greft uygulanan grubu göstermektedir.

B+i-TZF grubu: Üçüncü defekte büyük partiküllü greft ve i-TZF karışımının uygulandığı grubu göstermektedir.

B grubu: Dördüncü defekte sadece büyük partiküllü greft uygulanan grubu göstermektedir.

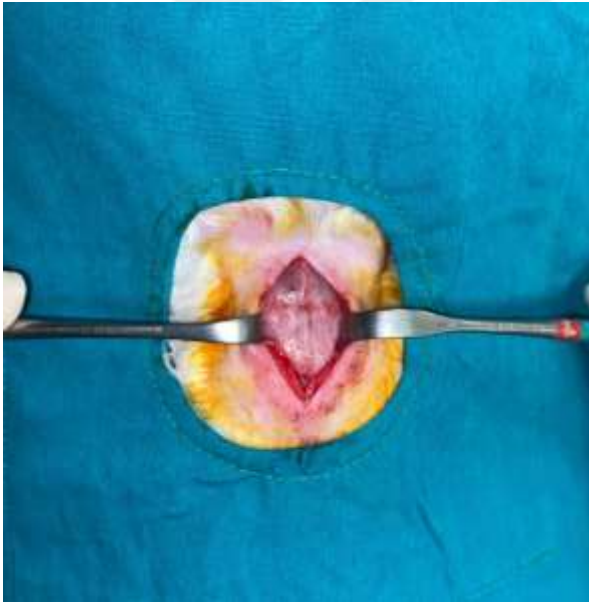
3.3.3. Cerrahi Yöntem

Cerrahi işlemlerden önce deney hayvanlarına ketamin hidroklorik asit (HCl) (50 mg/kg-Alfamine®, Alfasan International B.V., Kuipersweg 9 Woerden, Hollanda) ve ksilazin HCl (3 mg/kg-Rompun®, Bayer Health Care LLC, Animal Health Division shawnee Mission, Kansas, ABD) verilerek genel anestezi sağlandı. Sonrasında tavşanlar, her iki hemikraniyumu içine alacak şekilde kulaklara kadar traş edildi. Povidone iyodin ile cerrahi alan temizliği sonrasında uygun steril alan örtümü yapıldı (Resim 6). 15 numara bistüri ile kraniyal yumuşak doku orta hattı sagittal insizyon ile periost dahil olacak şekilde kesildi, yumuşak doku subperiostal plandan her iki yana açılacak ve her iki hemikraniyum tamamen görülecek şekilde ekartörler yerleştirilip, ameliyat sahası hazırlandı (Resim 7). Her iki paryetal kemikte 7 mm dış, 6 mm iç çaplı trefan frez ile 7 mm çapında orta hattın her iki yanında simetrik olacak şekilde, toplamda 4 adet dairesel kritik boyutta defekt hazırlandı (Resim 8). İşlem kemikte ısı artışını önlemek için serum fizyolojik soğutması altında yapıldı. Kraniyumda perforasyonu önlemek amacıyla trefan frez üzerindeki derinlik belirten çizgilerden yararlanıldı. Defektlere sırasıyla; enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (i-TZF) & küçük partiküllü sığır kaynaklı kemik grefti (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland- 0.25 – 1.0 mm), küçük partiküllü kemik grefti, i-TZF & büyük partiküllü sığır kaynaklı kemik grefti (Bio-Oss®, Geistlich Biomaterials, Wolhusen, Switzerland -1.0-2.0 mm), büyük partiküllü kemik grefti yerleştirildi (Resim 9).

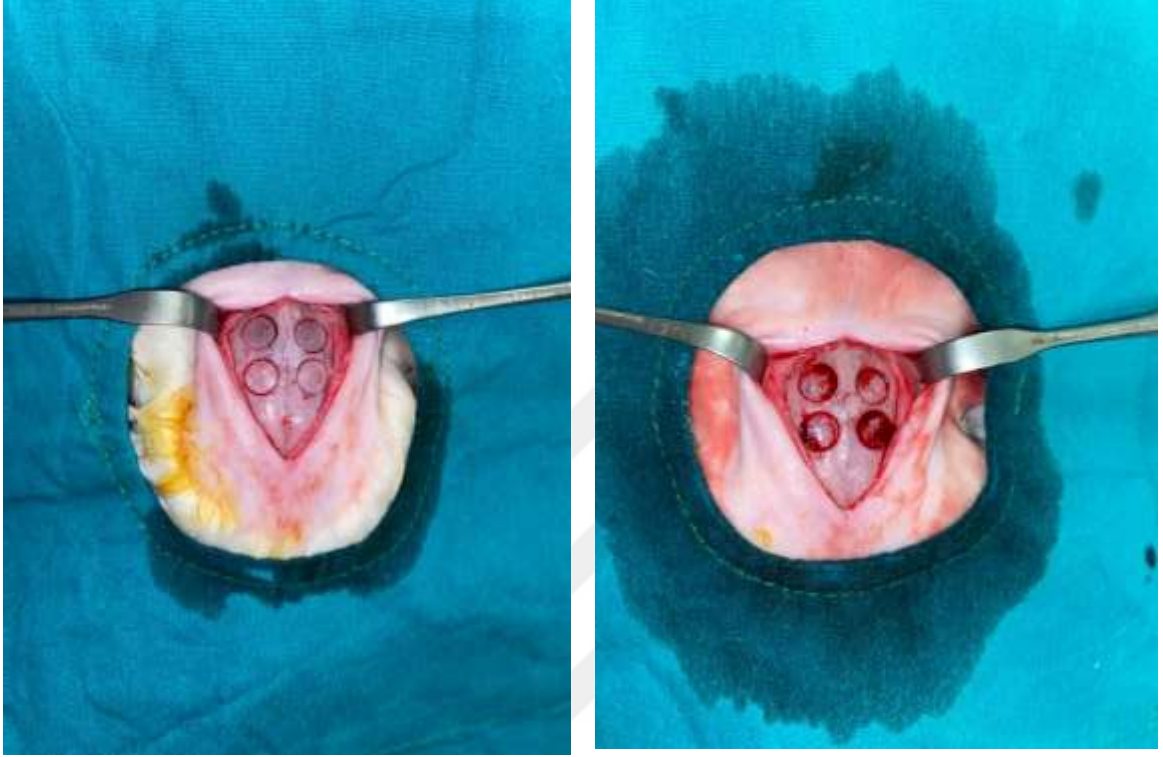
Cerrahi işlemler tamamlandıktan sonra 4/0 glikolid esaslı emilebilen süturla (Vicryl, Ethicon, Brüksel, Belçika) önce periosteum intakt bir şekilde basit sütur tekniğiyle dikildi. Ardından cilt dokusu suture edilerek alan kapatıldı (Resim 10). Cilt üzerine antiseptik ajan olarak Povidone iyodin uygulaması yapıldı. Cerrahi işlemin ardından enfeksiyon kontrolü için enrofloksasin içerikli bir antibiyotik (Baytril-K®, Bayer Health Care LLC, Animal Health Division shawnee Mission, Kansas, ABD) 2.5 mg/kg olacak şekilde; operasyon sonrası ağrının olmaması için meloksikam içerikli nonsteroid antiinflamatuvar bir ağrı kesici (Maxicam ®, Sanovel İlaç Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi, İstanbul, Türkiye) 1mg/kg olacak şekilde intramusküler enjeksiyon ile verildi.



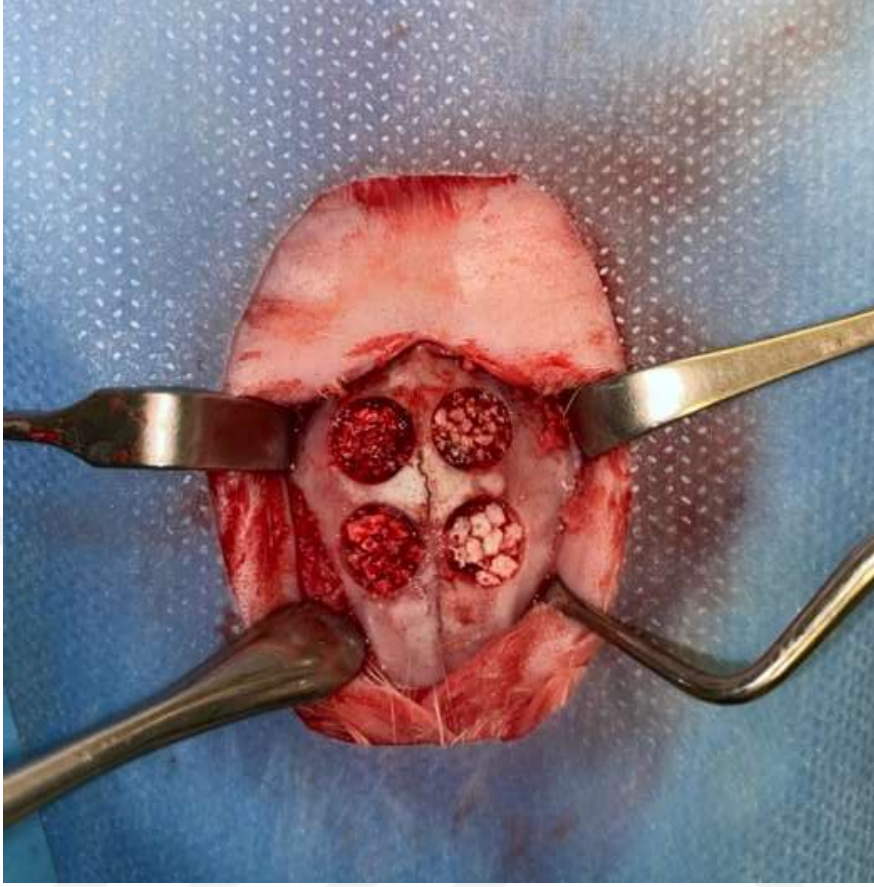
Resim 6: Kulaklarına kadar traş edilen tavşanlarda povidon iyodin ile cilt antisepsisi sağlanması



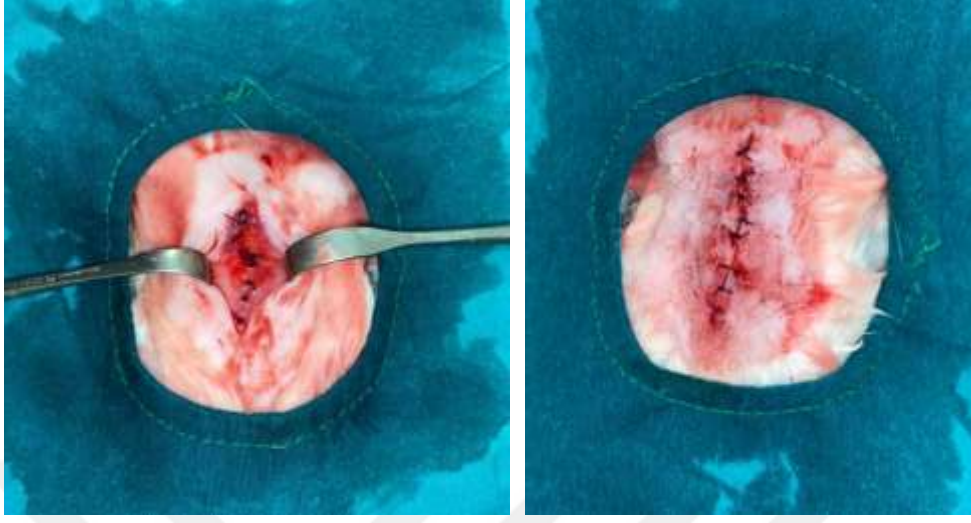
Resim 7: Strastyla cilt- periost insizyonu ve kalvaryanın açığa çıkarılması



Resim 8: Trefan frez ile kalvaryada defekt sınırlarının belirlenmesi ve disklerin tam kalınlıkta çıkarılması



Resim 9: Defektlerin greftle doldurulması (Sol üst: K+i-TZF; Sol alt: B+iTZF; Sağ üst: K; Sağ alt: B)



Resim 10: Sırayla periost ve cildin suture edilmesi

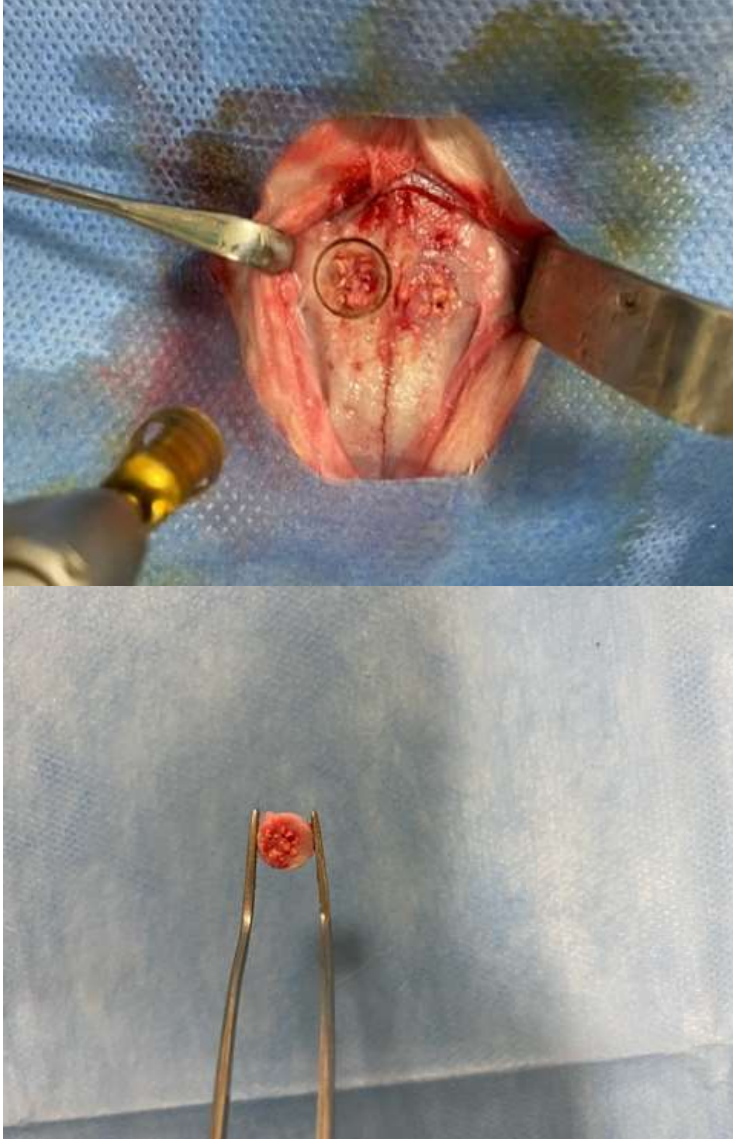
3.3.4. Operasyon Sonrası Bakım

Tavşanlara post operatif enfeksiyon ve ağrı kontrolü amacıyla 5 gün boyunca antibiyotik (Baytril-K®, Bayer Health Care LLC, Animal Health Division shawnee Mission, Kansas, ABD, 2.5 mg/kg IM) ve analjezik uygulaması (Maxicam®, Sanovel İlaç Sanayi ve Ticaret Anonim Şirketi, İstanbul, Türkiye, 1mg/kg IM) uygulaması yapıldı.

3.3.5. Hayvanların Sakrifiye Edilmesi ve Kemik Örneği Elde Edilmesi

Tavşanların yarısı 4. haftada, diğer yarısı 10. haftada olacak şekilde sakrifiye edildi ve kalvaryumdan örnek alındı. Tavşanlar, %2'lik Ksilazin hidroklorür (Rompun®, Bayer Health Care LLC, Animal Health Division shawnee Mission, Kansas, ABD) 30

mg/kg intramuskuler ve %10'luk Ketamin hidroklorid (Alfamine®, Alfasan International B.V., Kuipersweg 9 Woerden, Hollanda) 70 mg/kg intramuskuler enjekte edilerek sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen hayvanların kalvaryumundan trefan frezle (10 mm iç, 11 mm dış çaplı) her bir defekt bölgesinden ayrı ayrı olacak şekilde örnekler alındı (Resim 11).



Resim 11: Sakrifiye edilen tavşanın kalvaryumundan disk şeklinde kemik örneği alınması

3.4. Histopatolojik İnceleme

Tüm numuneler 24 saat boyunca %10 tamponlu formalin içinde sabitlendi, sonra 6 gün boyunca %10 formik asit içinde dekalsifiye edildi ve rutin protokol kullanılarak parafine gömülmek üzere işlendi. 5 µm kalınlığındaki bölümler bir döner mikrotom (Leica RM2125RT, Nussloch; Germany) üzerinde kesildi ve hematoksinin ve eozin (H&E, 01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) ile boyandı.

İmmunohistokimyasal boyama için kesitler, bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Dakopen (Invitrogen 008877, USA) ile sınırlandırılan %0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük hidrojen peroksit (H₂O₂) uygulandı. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu (PBS; Posphate buffer solution) ile yıkanan kesitlere bloklama amacıyla 1 saat bloklama solusyonu ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar OCN (sc-365797, Santa Cruz Biotechnology, Germany) ve VEGF (sc-7269, Santa Cruz Biotechnology, Germany) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (Invitrogen 859043, Histostain plus kit, USA) ile 30'ar dakika boyandı. Yine üç defa 5'er dakika tampon solusyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla Diaminobenzidin (DAB Invitrogen 00-2020, USA) ile 5 dk boyandı. Mayer's hematoksin (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile boyama sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyum (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatıldı (Tablo 1 ve Tablo 2).

OCN ve VEGF immün boyama yoęunluęu aęaęıdaki skora göre kategorize edildi:
0 (negatif boyama), 1 (hafif boyama), 2 (orta boyama), 3 (yoğun boyama) ve 4 ( ok
yoğun boyama)



Tablo 1: Hematoksilen-eozin boyama protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON		60°C ETÜVDE 1 GECE
	KSİLEN	30 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	HEMATOKSİLEN	5 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
DİFERANSİYASYON	ASİT-ALKOL	1-2 SANİYE
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
BOYAMA	EOZİN	3 DAKİKA
YIKAMA	AKAR SU	5 DAKİKA
	% 80 ALKOL	1 DAKİKA
	% 90 ALKOL	1 DAKİKA
	KSİLEN	1 SAAT
KAPATMA	ENTELLAN	

Tablo 2: İndirekt İmmünohistokimya Boyama Protokolü

İŞLEM	MADDE	SÜRE
DEPARAFİNİZASYON		60°C ETÜVDE 1 GECE
	KSİLEN	30 DAKİKA
	KSİLEN	30 DAKİKA
REHİDRATASYON	% 95 ALKOL	2 DAKİKA
	% 80 ALKOL	2 DAKİKA
	% 70 ALKOL	2 DAKİKA
	% 60 ALKOL	2 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
	PBS	10 DAKİKA
HAVUZ OLUŞTURMA	DAKO PEN	
	TRİPSİN	15 DAKİKA 37°C
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
PEROKSİDAZ İNHİBİSYONU	%3 HİDROJEN PEROKSİT	5 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
BLOKLAMA	NON-İMMUN BLOKLAMA SOLÜSYONU	1 SAAT
PRİMER ANTİKORLAR YIKAMA SEKONDER ANTİKOR YIKAMA	Anti-eNOS, PI3K, Akt, mTOR	18 SAAT +4°C NEMLİ ORTAM
	PBS	3×5 DAKİKA
	BİOTİN İLE İŞARETLİ	30 DAKİKA
	PBS	3×5 DAKİKA
	STREPTAVIDİN	30 DAKİKA
YIKAMA	PBS	3×5 DAKİKA
YIKAMA	DİSTİLE SU	3×5 DAKİKA
ARTALAN BOYAMA	MAYER'S HEMATOKSİLEN	3 DAKİKA

YIKAMA	DİSTİLE SU	10 DAKİKA
KAPAMA	ENTELLAN	
İNCELEME	IŞIK MİKROSKOBU	



3.5.İstatistiksel Analiz

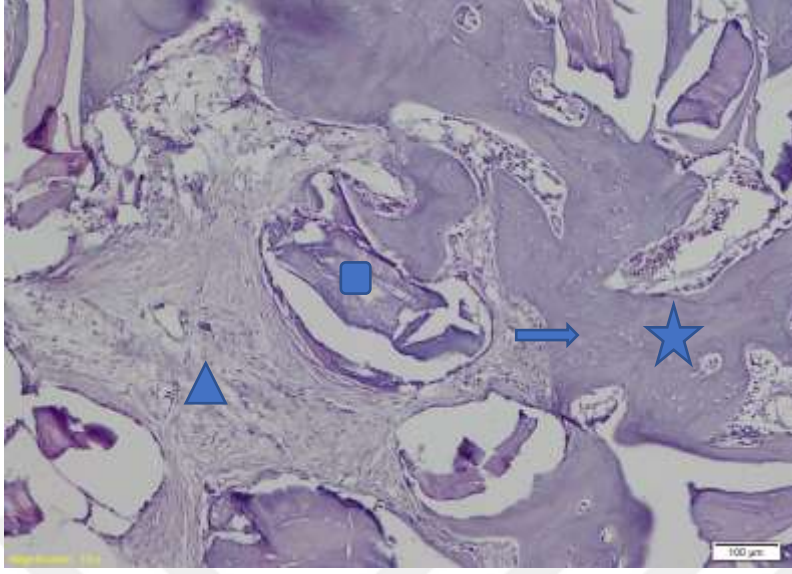
Histolojik verilerin çözümlenmesinin ardından ilk adım olarak normallik varsayımı Shapiro Wilk testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma sahip olan bağımsız üç ve daha fazla gruba sahip değişkenlerin ortalamaları arasındaki farkın incelenmesi için Anova testi yapıldı. Normal dağılıma sahip olmayan bağımsız üç ve daha fazla sahip değişkenlerin ortalamaları arasındaki farkın incelenmesi için Kruskal Wallis testi uygulandı. Farkı yaratan grup ya da grupların belirlenmesi için Post Hoc Bonferroni analizi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkinin incelenmesinde örneklem boyutu yetersizliği ($n < 5$) durumunda Fisher's Exact testi kullanıldı. Analizler IBM® (IBM Türk Limited Şirketi, İstanbul, Türkiye) SPSS Statistics 25 programında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

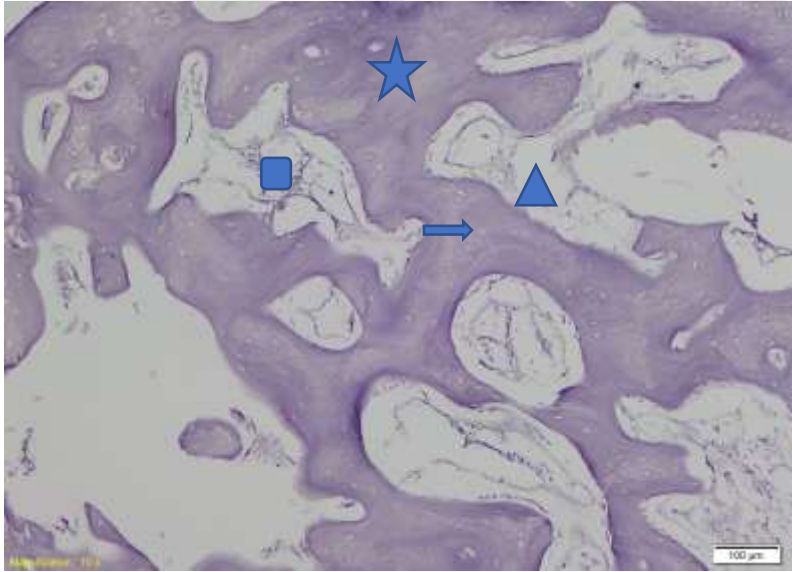
4.1. Histolojik Bulgular

4.1.1. Histomorfometrik Bulgular

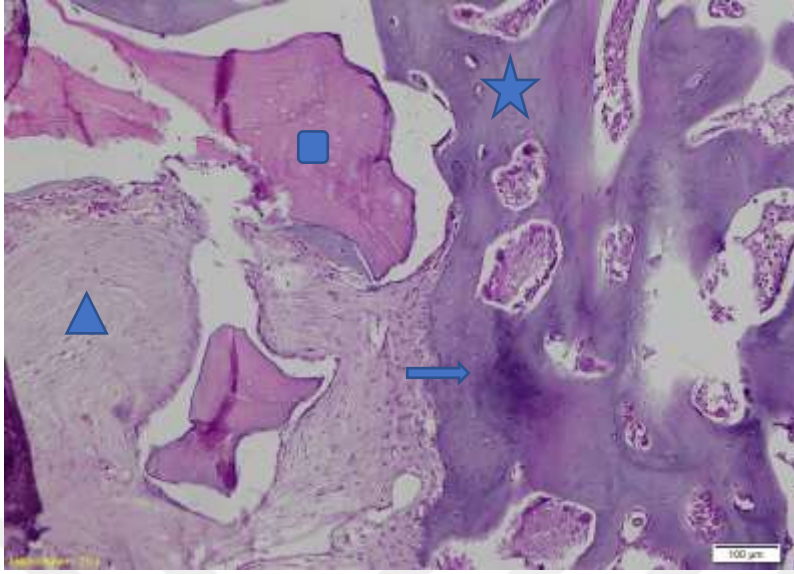
4 ve 10 haftalık iyileşme gruplarında hiçbir örnekte yabancı cisim reaksiyonu veya nekroz saptanmadı. Kesitlerde canlı osteosit içeren yeni oluşan kemiğin greft ile yakın temas gösterdiği görüldü. Osteoblastlar, greftin etrafında yeni oluşan kemik boyunca mevcuttu. Akut veya kronik inflamatuvar belirtisi gözlenmedi. Kesitlerde patolojik inflamasyon bulgularına rastlanmadı. Yeni oluşan kemiğin olduğu alanlarda sement çizgileri çok az bulunmaktaydı veya hiç yoktu, ayrıca daha eozinofilik bir boyanma göstermekteydi. Yeni kemik, rezidüel greft, bağ dokusu ve toplam alan μm^2 cinsinden ayrı ayrı ölçüldü. Ölçülen değerler oranlandı ve 100 ile çarpılarak % olarak hesaplandı. Çalışma gruplarına ait 4 ve 10. haftada elde edilmiş numunelerin H&E ile boyanmış görüntüleri Resim 12-19 arasında gösterilmektedir.



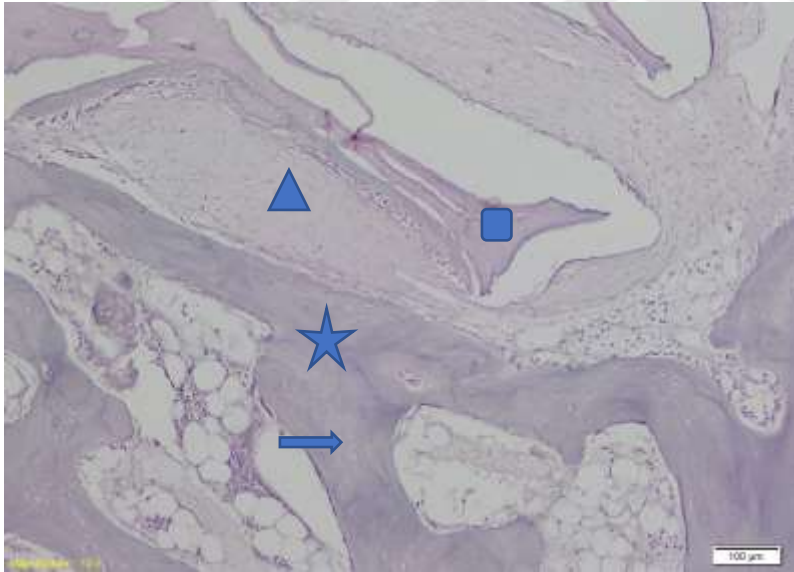
Resim 12: K+ i-TZF grubunun 4. Haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft parçacıkları Üçgen: bağ dokusu)



Resim 13: B+ i-TZF grubunun 4. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)



Resim 14: B grubunun 4. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)



Resim 15: K grubunun 4. haftada alınan örneğine ait grubunun Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)

Grupların yeni kemik ölçüm ortalamaları (%) arasında fark olup olmadığı hipotezini test edecek uygun analize karar vermek için varsayımlar kontrol edildi. Varsayım karşılandığı için Anova testi yapıldı. Erken dönem ve geç dönemde elde edilen veriler gruplar bazında ayrı olarak değerlendirildi. Analiz sonucunda çalışma grupları arasında erken ve geç dönemde yeni kemik ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulundu ($p<0,05$). K+i-TZF grubu ortalaması hem erken (%57,2) ($p=,012$) hem geç dönemde (%70,0) ($p=,018$) en yüksek ortalamaya sahip grup olarak bulundu. Geç dönemde K+i-TZF grubu ile B grubu arasında anlamlı bir fark saptandı ($p=,048$); K+i-TZF grubunun ortalamasının (%70) B grubundan (%51,66) yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı. Yeni kemik oluşum ortalamaları i-TZF ilavesi olan gruplarda daha yüksek olarak saptandı (Tablo 3 ve 4).

Tablo 3: Çalışma gruplarının erken dönemde yeni kemik ölçüm ortalamalarının (%) karşılaştırılması

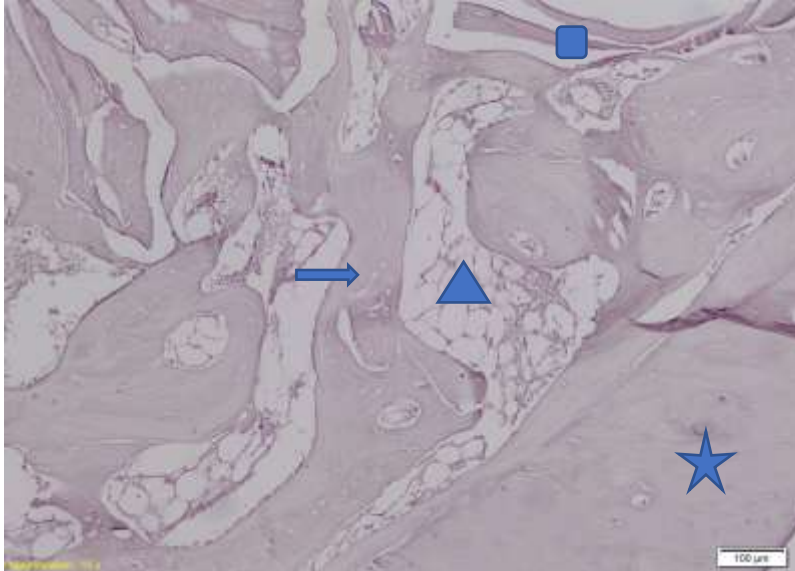
Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Test İstatistiği	p
K	9	51,1111	10,54093		
K +i-TZF	9	57,2222	10,24017	13,560	,012*
B +i-TZF	9	54,7778	18,34924		
B	9	46,6667	12,24745		

* $p<0,05$

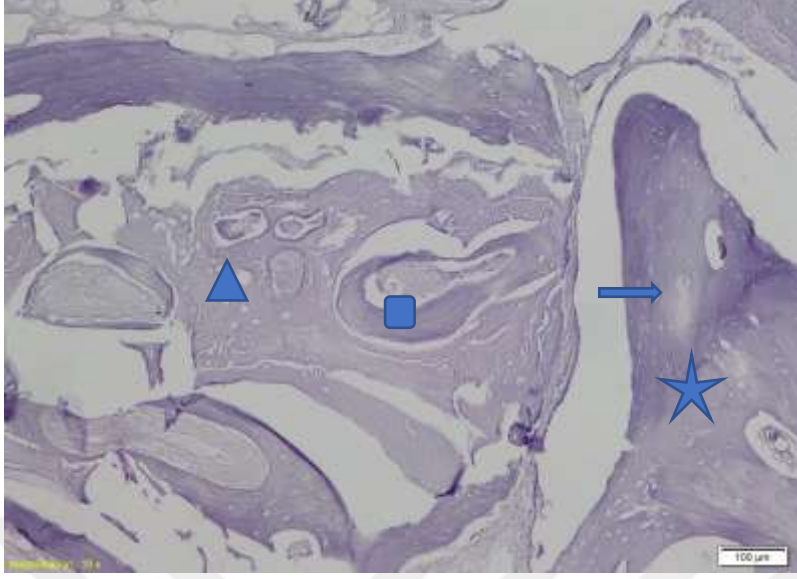
Tablo 4: Çalışma gruplarının geç dönemde yeni kemik ölçüm ortalamalarının (%) karşılaştırılması

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Test İstatistiği	p
K	9	53,3333	12,44432	15,770	,018*
K+i- TZF	9	70,0000	13,69306		
B+ i-TZF	9	61,1111	15,56795		
B	9	51,6667	9,35414		

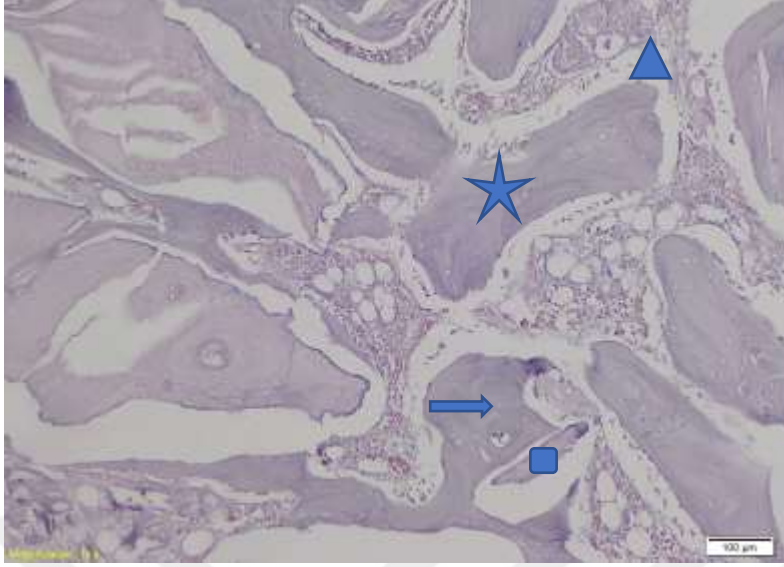
*p<0,05



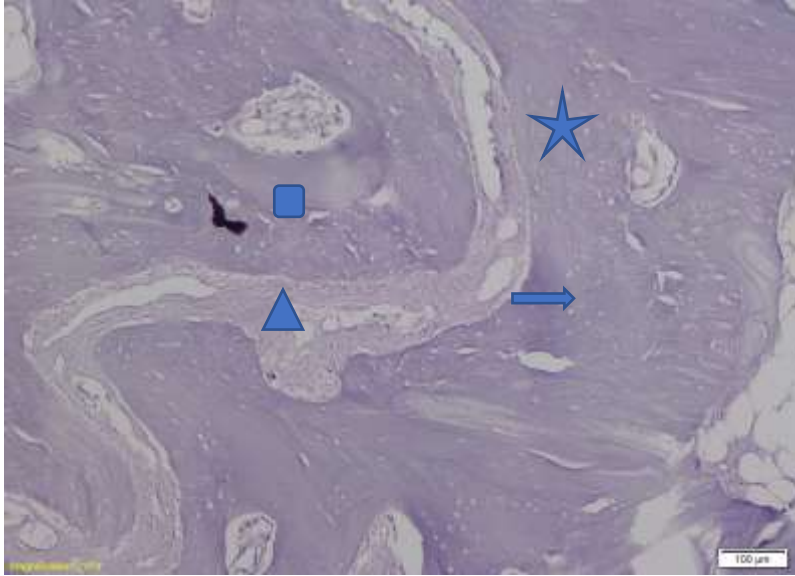
Resim 16: K+ i-TZF grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)



Resim 17: B+ i-TZF grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft, Üçgen: bağ dokusu)



Resim 18: K grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft, Üçgen:bağ dokusu)



Resim 19: B grubunun 10. haftada alınan örneğine ait Hematoksilen&Eozin ile boyanmış görünümü (Yıldız: vital yeni kemik, Ok: laküna içinde osteosit, Kare: rezidüel greft Üçgen: bağ dokusu)

Rezidüel greft ölçüm ortalamalarında hem erken hem de geç dönemde gruplar arası anlamlı bir fark bulundu ($p<0,05$). En yüksek rezidüel greft ortalaması hem erken (%25,67) hem geç (%23,94) dönemde B grubuna aitti. Yeni kemik oluşum oranlarıyla da paralel sonuçlar veren rezidüel greft ortalamalarında en düşük ortalamaya sahip grup geç dönemdeki K+iTZF (%8,50) grubuydu. Ayrıca i-TZF ilavesi olan grupların da rezidüel greft ortalamalarının daha düşük olduğu görüldü (Tablo 5 ve 6).

Tablo 5: Çalışma gruplarının erken dönemde rezidüel greft ortalamalarının (%) karşılaştırılması

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Sıra Ortalaması	Test İstatistiği	p
B+ i-TZF	9	12,4456	4,61278	19,72	14,232	,003*
B	9	25,6778	8,33333	44,28		
K	9	24,1122	9,71825	41,78		
K+i-TZF	9	11,7844	10,73675	46,17		

* $p<0,05$

Tablo 6: Çalışma gruplarının geç dönemde rezidüel greft ortalamalarının (%) karşılaştırılması

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Sıra Ortalaması	Test İstatistiği	p
K+ i-TZF	9	8,5067	4,44410	23,00	13,515	,004*
K	9	23,7244	10,73675	45,56		
B+ i-TZF	9	17,8356	6,82113	41,22		
B	9	23,9467	3,53553	30,28		

* $p<0,05$

Çalışma gruplarından elde edilen bağ doku (%) ölçüm ortalamaları arasında fark olup olmadığını hipotezini test edecek uygun analize karar vermek için varsayımlar kontrol edildi. Varsayım karşılandığı için Anova testi yapıldı. Analiz sonucunda gruplar için bağ doku ölçüm ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilemedi ($p>0,05$). Histolojik kesitlerin H&E boyama görüntülerinde özellikle erken iyileşme döneminde B ve B+i-TZF gruplarının greft partikülleri etrafında oluşan bağ dokunun daha fibrotik yapıda olduğu; buna karşın K ve K+i-TZF gruplarında kemik grefti etrafında oluşan bağ dokusunun damarlanma ve mezenşimal hücre barındıran yeni kemiğe dönüşme kapasitesi olan bir bağ doku izlendi (Resim 12-15). Bu durum greft partikülleri arasındaki boşluğun daha büyük olması nedeniyle bölgeye yumuşak doku göçünün artmış olabileceğini göstermektedir.

Tablo 7: Çalışma gruplarının erken dönemde bağ doku ortalamalarının (%) karşılaştırılması

Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Test İstatistiği	p
K+ i-TZF	9	24,4444	10,44164		
K	9	31,6667	11,18034		
B+ i-TZF	9	26,6667	16,39360	13,552	,167
B	9	35,5556	8,81917		

Tablo 8: Çalışma gruplarının geç dönemde bağ doku ortalamalarının (%) karşılaştırılması

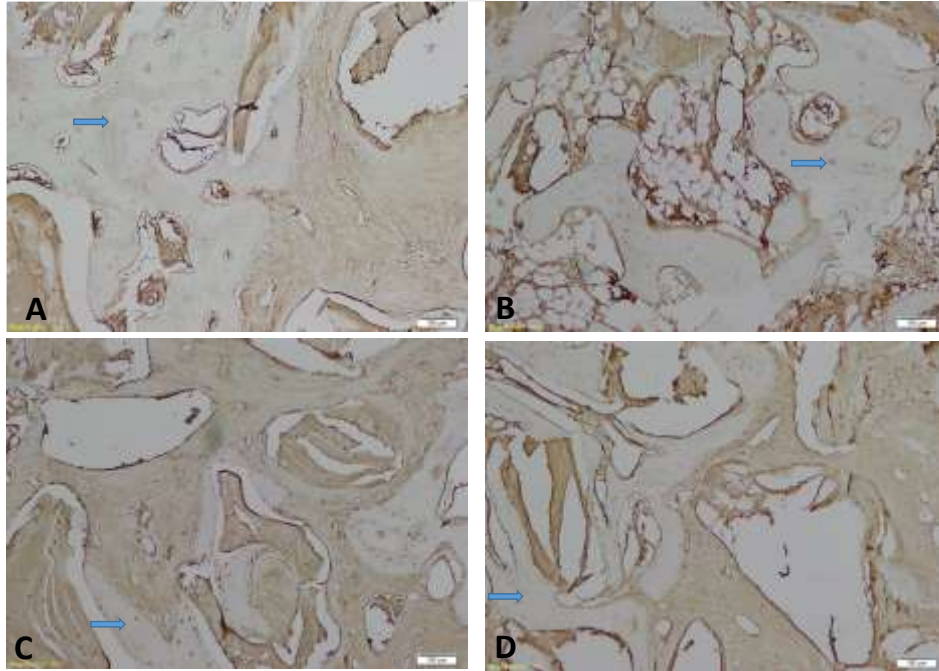
Gruplar	n	Ortalama	Standart Sapma	Test İstatistiği	p
K+i-TZF	9	20,3333	14,22146		
K	9	24,4444	12,10487		
B+ i-TZF	9	32,7778	7,94949	10,852	,145
B	9	26,1111	12,19062		

4.1.2. İmmunohistokimyasal Bulgular

4. ve 10. haftada alınan dokular rutin avidin-biyotin-peroksidaz yöntemine uygun olarak anti OCN ve anti VEGF primer antikorları kullanılarak indirek immunohistokimyasal yöntemle boyandı. İmmunorektivite şiddetleri hafif (1), orta (2), şiddetli (3) ve çok şiddetli (4) olarak skorlandı. Boyanma şiddetleri çalışma grupları arasında karşılaştırmalı olarak değerlendirildi.

4.1.2.1.Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

İmmünohistokimyasal incelemede VEGF primer antikoru kullanılarak yapılan boyamaların görüntüleri aşağıda gösterilmiştir (Resim 20 ve 21).



Resim 20: Gruplardan 4. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak VEGF primer antikoru ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D: K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite).

Erken ve geç iyileşme dönemi için çalışma grupları VEGF antikoru boyanma skorlarına bakılarak karşılaştırıldı. Çalışma grupları arasında normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma sahip olmayan bağımsız üç ve daha fazla sahip değişkenlerin ortalamaları arasındaki farkın incelenmesi için Kruskal Wallis testi uygulandı. Erken dönemde çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ($p>,005$) (Tablo 9). Geç iyileşme döneminde çalışma grupları arasında VEGF antikoru skorları karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Geç dönemde K+i-TZF grubu ($p=,003$) en yüksek ortalamaya sahip gruptu (Tablo 10).

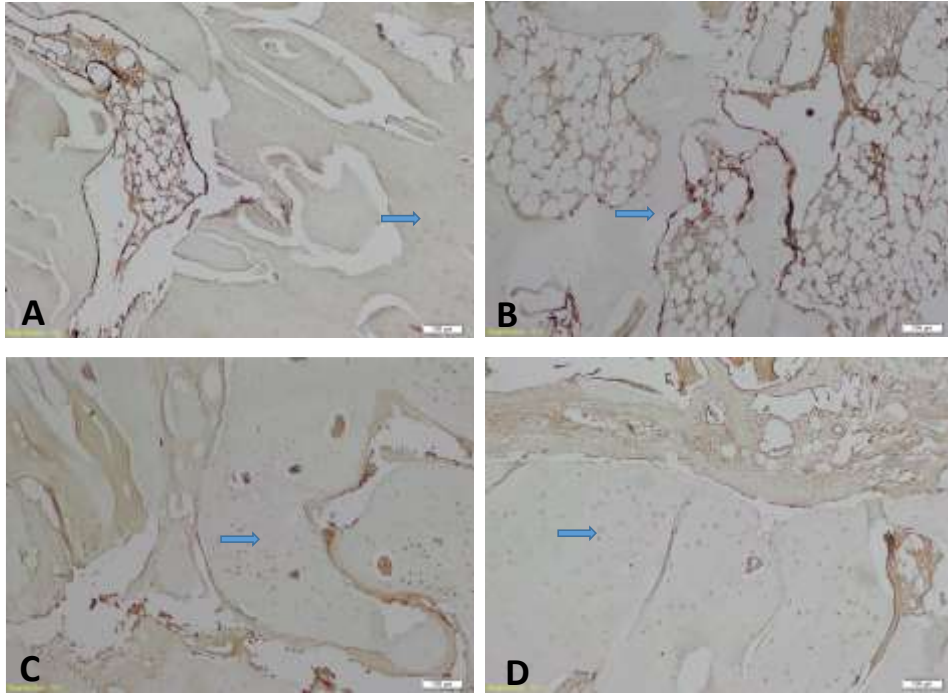
Tablo 9: Çalışma gruplarının erken dönem VEGF antikoru boyanma durumlarının karşılaştırılması

Gruplar	n	Sıra Ortalaması	Test İstatistiği	p
K+i-TZF	9	15,39		
K	9	14,11		
B+ i-TZF	9	19,44	7,332	,062
B	9	16,06		

Tablo 10: Çalışma gruplarının geç dönem VEGF antikoru boyanma durumlarının karşılaştırılması

Gruplar	n	Sıra Ortalaması	Test İstatistiği	p
K+i-TZF	9	28,50		
K	9	17,89		
B	9	12,44	14,305	,003*
B+i-TZF	9	15,17		

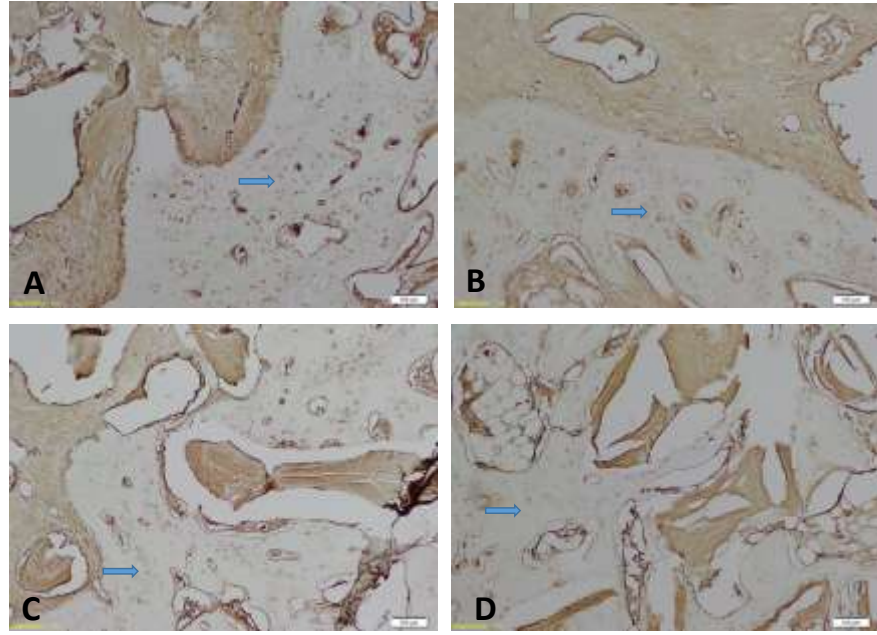
* $p<0,05$



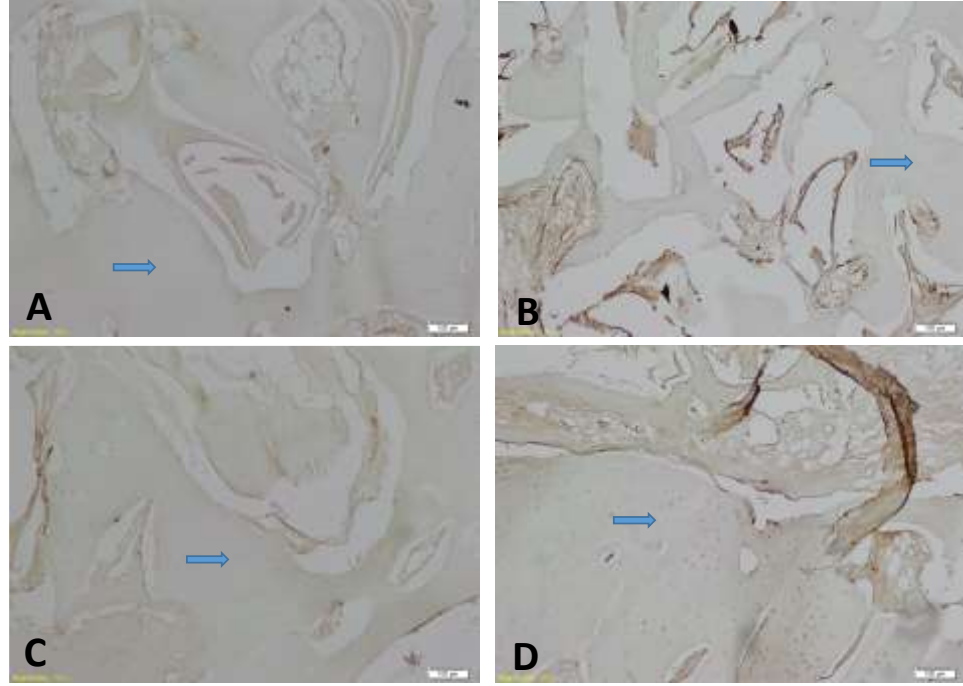
Resim 21: Gruplardan 10. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak VEGF primer antikoruna ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D: K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite).

4.1.2.2. Osteokalsin (OCN)

İmmünohistokimyasal incelemede OCN primer antikoru kullanılarak yapılan boyamaların görüntüleri gösterilmiştir (Resim 22 ve 23).



Resim 22: Gruplardan 4. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak OCN primer antikoru ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D: K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite).



Resim 23: Gruplardan 10. haftada alınan örneklerin indirekt immünohistokimyasal yöntem kullanılarak OCN primer antikoru ile boyanmış görünümü. A: B grubu; B: K grubu; C: B+ i-TZF grubu, D; K+ i-TZF grubu (Ok; pozitif immünoreaktivite).

Erken ve geç iyileşme dönemi için çalışma grupları OCN antikoru boyanma skorlarına bakılarak karşılaştırıldı. Çalışma grupları arasında normallik varsayımı Shapiro-Wilk testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma sahip olmayan bağımsız üç ve daha fazla sahip değişkenlerin ortalamaları arasındaki farkın incelenmesi için Kruskal Wallis testi uygulandı. Erken dönemde çalışma grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Tablo 11). Geç iyileşme döneminde çalışma grupları arasında OCN antikor skorları karşılaştırmalarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Geç dönemde K+i-TZF grubu ($p=,000$) en yüksek ortalamaya sahip gruptu (Tablo 12).

Tablo 11: Çalışma gruplarının erken dönem OCN antikor boyanma durumlarının karşılaştırılması

Gruplar	n	Sıra Ortalaması	Test İstatistiği	p
B+ i-TZF	9	20,11	5,997	,112
B	9	20,00		
K	9	18,67		
K+i-TZF	9	22,22		

Tablo 12: Çalışma gruplarının geç dönem OCN antikor boyanma durumlarının karşılaştırılması

Gruplar	n	Sıra Ortalaması	Test İstatistiği	p
B+ i-TZF	9	19,00	18,857	,000*
B	9	14,22		
K	9	13,00		
K+i-TZF	9	30,78		

*p<0,05

OCN antikor immünoreaktivitesi ile greftlere yapılan i-TZF ilavesi arasındaki ilişkiyi araştırarak olan hipotezin analizi için varsayımlar kontrol edildi. Varsayım karşılanmadığı için Fisher's Exact testi uygulandı ve i-TZF varlığı ile OCN antikor boyanması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edildi ($p=,006$). i-TZF ilavesi olan gruplarda OCN antikor boyanma ortalamaları, şiddetli (%63,2) ve çok şiddetli (%62,5) boyanma derecelerinde yüksek bulundu. İ-TZF ilavesi olmayan gruplarda ise hafif (%78,9) ve orta (%37,5) şiddetindeki boyanma derecelerinde OCN antikor boyanma ortalamaları yüksek olarak bulundu (Tablo 13).

Tablo 13: Greftlere yapılan i-TZF ilavesi ile OCN antikor boyanma derecesi arasındaki ilişki tablosu

		OCN Antikor Boyanma Derecesi				Test İstatistiği	p
		Hafif	Orta	Şiddetli	Çok Şiddetli		
i-TZF ilavesi var	n	0	4	12	20	11,302	,006*
	%	0	21,1	63,2	62,5		
i-TZF ilavesi yok	n	20	10	6	0		
	%	78,9	37,5	36,8	0		

* $p<0,05$

5. TARTIŞMA

Çene ve yüz bölgesinde konjenital, patoloji, travma veya dişsiz çenelerin atrofisi gibi nedenlerle kemik defektleri meydana gelebilmektedir. Kemik defektlerinin tedavisinde çeşitli ogmentasyon yöntemleri kullanılmaktadır. Maksillofasiyal cerrahi alanında, implant cerrahisi hazırlığında alveoler bölgedeki defektlerin onarımı ve kemiği yeterli kaliteye taşıyabilmek en sık araştırma yapılan konular arasına girmiştir. Bu amaçla her geçen gün sayısı artan birçok ogmentasyon yöntemi geliştirilmiştir. (1). Kemik kaybına profilaktik bir yaklaşım sunan alveoler soket koruma uygulamaları, krete horizontal olarak genişlik kazandırmayı amaçlayan kret split cerrahisi, vertikal yükseklik kazanmak için yapılan maksiller sinüs yükseltme operasyonu, bariyer membran ve vida kullanılarak yapılan tent pole uygulaması bu ogmentasyon yöntemleri arasında sayılabilir. Bölgede yeni kemik kazanımını amaçlayan bu yöntemlerde çoğunlukla biyomateriyal kullanılmaktadır ve bunlardan en sık kullanılanı kemik greftleridir (1,51,91,92). Kemik greftleri çeşitli formlarda üretilebilmektedir. Maksillofasiyal cerrahide kullanımı yaygın olan ve kemik oluşturmada etkinliği kanıtlanmış olan sığır kaynaklı kemik greftlerinin blok ve partikül olarak iki formu bulunmaktadır. Partikül formdaki kemik greftleri oral cerrahide en sık kullanım alanı olan greftlerdir. Partikül boyutunun değişikliği kemik greftinin mekanik özellikleri, kanlanması, rezorbsiyonu gibi pek çok durumu etkilemektedir. Partikül boyutundaki değişikliğin yeni kemik oluşumu ve greftin damarlanmasına etkisini araştırarak sınırlı sayıda çalışma vardır (66). Kemik grefti uygulanan bölgede yeni kemik oluşumu için hücre komponenti, büyüme faktörü salınımı ve damarlanma kritik öneme sahiptir. Bu amaçla araştırmacılar, çeşitli maddeler veya biyomateriyallerin kemik greftlerine ilavesiyle greftlerin mekanik ve biyolojik özelliklerinin geliştirilebildiğini göstermişlerdir (56,93). Choukroun ve ark. (11) tarafından trombositten zengin fibrin

(TZF) adıyla, pıhtılaşma sürecini önleyen ajanlar veya diğer doğal olmayan yan ürünler kullanılmadan üretilen bir trombosit konsantrasyonu geliştirilmiştir. Trombositten zengin fibrin konsantrasyonlarının kemik iyileşmesini hızlandırıcı ve olumlu etkileri birçok çalışma ile ortaya konmuştur (12,14). TZF'nin iyileşmedeki olumlu etkileri de göz önünde bulundurularak kemik greftine ilave edilmiş ve greftin etkinliğini artırarak optimal kalitede bir kemiğin daha kısa sürede elde edilebildiği görülmüştür (94). TZF formülasyonlarından henüz çok yeni geliştirilmiş olan enjekte edilebilir formu (i-TZF) ile ilgili çalışmalar mevcut olsa da klinik alanda yapılmış olan çalışmalar oldukça sınırlıdır (11,85,95). Osteokondüktif özellikteki zenogreftlerin osteojenik potansiyelini artırmak amacıyla otolog kan ürünlerinin greftlere ilavesi de ogmentasyon prosedürlerinin başarısını önemli ölçüde artıran bir yöntem olarak kanıtlanmıştır (13,17,88). Sıvı formdaki TZF'nin partiküllü kemik greftine ilavesiyle elde edilen sticky bone formunun mekanik avantajlarının yanı sıra kemik yapımını uyarıcı hücre ve faktörler bakımından zengin olması gibi pek çok avantajı vardır. Sticky bone greft formu ile ilgili klinik çalışmalar da sınırlı sayıda literatürde mevcuttur. Ancak, bu yeni geliştirilmiş yöntem üzerinde daha çok çalışma yapılmasına açıktır (87,96).

Kemik grefti uygulama ve iyileşme takibi için maksillofasiyal cerrahi alanında oldukça yaygın kullanılan tavşan kalvaryum modelini kullanarak, çalışmamızda, i-TZF'nin farklı partikül boyutlarındaki sığır kaynaklı kemik greftlerindeki etkinliğinin; yeni kemik oluşumu, yumuşak doku göçü ve damarlanma bakımından histolojik olarak incelenmesi amaçlanmıştır.

Kemik onarımında kullanılan biyomateryaller, maksillofasiyal cerrahinin en çok ilgilendiği araştırma konularından birisidir. İdeal kemik grefti uygulandığı bölgede osteointegrasyon, osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenesisi sağlayarak yeni kemik yapımını uyarmalıdır. Sayılan bu özelliklerin hepsini barındıran tek kemik grefti türü otojen greftlerdir (43,97). Ototogreftler, bu nedenle hala altın standart olarak kabul edilse de ikinci cerrahi operasyon sahası oluşması, morbidite oranının yüksek olması, greftin hızlı rezorbe olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Dolayısıyla, otogreftlere alternatif olarak geliştirilen allogreftler, ksenogreftler ve alloplastik greftler gibi greft materyallerinin kullanımı da yaygın hale gelmiştir. (98,99). Allogreftler, otojen kemik greftlerine bir alternatif olarak dentoalveolar cerrahide yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak bu greftlerin osteoindüktif etkileri tartışmalı olup elde edilme kaynakları da kısıtlıdır. İmmünolojik reaksiyon oluşturma, hastalık taşıma riski ve hızlı rezorbsiyon gibi dezavantajları vardır. Diğer bir alternatif ise oral cerrahide en sık uygulanan greft materyali zenogrefttir. Zenogreftler, osteokondüktif özellikte olmakla birlikte kısmi olarak osteoindüktiftir. Yapılan çalışmalarda zenogreftin hacmini koruması ve osteoprogenitör hücreler için çatı görevi görmesi gibi avantajlara sahip olduğu belirtilmiştir. Genellikle sığır, doğal mercan, domuz ve at gibi canlılardan elde edilirler. Osteokondüktif olmakla birlikte herhangi bir osteojenik potansiyel sağlamamaktadırlar, ancak zenogreftlere otolog kan ürünlerinin ilavesiyle osteojenik potansiyel kazandırılabilir (17,47,48). Oral ve maksillofasiyal cerrahide çok sık kullanılan sığır kaynaklı kemik grefti, organik bileşenlerinden arındırılmak ve doğal kemik minerali elde etmek bir dizi işleminden geçirilir. Anorganik sığır kökenli kemik grefti, organik bileşenin düşük ısıda ve kimyasal olarak uzaklaştırılmasının ardından kalan süngerimsi ve kortikal kemiğin mikro gözenekli ve makro gözenekli yapısını tutan bir hidroksiapatit (HA) iskeletinden oluşur (49).

Kemik greftlerinin en sık kullanılan iki formu blok ve partiküldür. Blok formundaki greftler, yapısal bütünlüklerinin iyi olması, daha stabil olmaları ve kortikal yapının alıcı sahada meydana gelebilecek olan rezorbsiyona karşı koyması gibi avantajları mevcuttur. Ancak, blok kemik greftlerinin içerisinde yeni kan damarı oluşum hızı partikül kemik greftlerine göre daha yavaştır. Ayrıca blok greftlerin uygulandığı bölgede sabitlenmesi ve alıcı bölge ile temasının ideal olması amacıyla

kullanılan fiksasyon vidalarının çıkarılması için ikinci bir cerrahiye ihtiyaç duyulması gibi dezavantajları vardır (1). Bu nedenle oral cerrahide ogmentasyon prosedürlerinde en sık tercih edilen kemik grefti formu partiküldür.

Yaptığımız çalışmada; oste kondüktif potansiyele sahip olması, blok veya partikül formlarında üretilmesi, fiziksel ve morfolojik özellikler de dahil olmak üzere insan süngerimsi kemiğine benzer özellikleri nedeniyle ogmentasyon için en çok kullanılan greft materyallerinden biri olan sığır kaynaklı anorganik kemik greftini tercih ettik. Literatürde, referans aldığımız pek çok makalede tavşan kalvaryumu modelinde defekt iyileşmesi için sığır kaynaklı greft materyali kullanıldığı ve başarılı sonuçlar elde edildiğini gördük (88,100). Partiküllü formda olan zenogreftin otojen greftlere göre morbidite oranının düşük olması, istenilen miktarda elde edilmesi ve yavaş rezorbe olarak defekt bölgesinde hacmini koruması gibi avantajları vardır. Çalışmamızda, bu avantajları nedeniyle partikül formda zenogreft materyali kullandık.

Greft partikül boyutundaki değişiklikler, greftin kanlanması ve rezorbsiyonu gibi olaylarda kritik rol oynamaktadır. Dolayısıyla greft partikül boyutu, yeni kemik oluşumuna etkisi büyük bir faktördür (60,61). Anorganik sığır kökenli kemik greftleri iki farklı partikül boyutunda üretilmektedir. Çalışmamızda, iki farklı partikül boyutundaki grefte i-TZF ilavesinin etkinliğini araştırmayı amaçladık. Referans aldığımız çalışmalarda, partikül boyutları kıyaslanan greft türlerinden en çok tercih edilen sığır kaynaklı zenogreftlerdi (7,66). Bu nedenle, biz de çalışmamızda küçük ve büyük olarak iki partikül boyutunda üretilen, yeni kemik oluşumu için çatı ve matris görevi gören, pek çok çalışmayla etkinliği kanıtlanmış olan sığır kaynaklı zenogreft kullanmayı tercih ettik.

Maksillofasiyal cerrahide kullanım alanlarına göre çeşitli partikül boyutlarında üretilen greftler tercih edilmektedir. Otojen olarak elde edilen kemik veya dentin greftleri de çeşitli partikül boyutlarında öğütülerek kullanılabilir (61,101). Sığır kaynaklı zenogreftler genellikle küçük ve büyük olarak iki partikül boyutunda üretilmektedir. Cerrahin seçimi ve ogmentasyon sahasının boyutuna göre değişiklik gösterse de maksiller sinüs yükseltme operasyonu ve kret split cerrahisi gibi büyük boyuttaki ogmentasyon alanlarında genellikle büyük partiküllü kemik greftinin tercih

edildiği görülmektedir. Literatürde farklı partikül boyutlarının yeni kemik oluşumu bakımından kıyaslandığı çalışmalarda, herhangi bir partikül boyutunun diğerine göre üstünlüğünü kanıtlayan kesin bir sonuca ulaşılmamasıyla birlikte yapılan araştırmalar da sınırlı sayıdadır. Partikül boyutu değişikliğinin kemik oluşumuna etkisini histolojik olarak inceleyen çalışmaların sayısı da azdır. Ayrıca kemik greftine i-TZF ilavesinin farklı partikül boyutundaki kemik greftine etkisini araştıran herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu nedenle, bizim çalışmamız literatürde bu konuyu ilk defa araştıran çalışmadır (102,103).

Testori ve ark. (67) klinik bir çalışmada, 13 hastada bilateral sinüs ogmentasyonu yapmış ve iki farklı partikül boyutundaki sığır greftleri (0.25-1 mm ve 1-2 mm) karşılaştırmıştır. 6-8 ay sonra ogmentasyon bölgesinden kemik örnekleri alınmıştır. Histoloji sonuçlarına bakıldığında yeni kemik oluşumu büyük partiküllü greftlerde daha yüksek oranda bulunmuştur. Büyük partiküllü greftlerin gösterdiği pöröz yapı haversian kanalların yapısına benzer olduğu, dolayısıyla bu pöröz yapının içinde yeni kemik oluşumunun daha iyi olduğu gözlenmiştir. Araştırmacılar, küçük partiküllü greftte bu por yapılar gözlenmediği için yeni kemiğin bağlantı köprüleri aracılığıyla oluştuğu ve bu köprülerin düzensiz bir trabeküler yapıya dönüştüğünü savunmuşlardır. Bu çalışma ile, sinüs ogmentasyonu işleminde büyük partiküllü kemik greftinin küçük partiküllü grefte göre yeni kemik oluşumunda belirgin artış sağladığı sonucuna varılmıştır (67).

Chackartchi ve ark. (66) bilateral sinüs lift uyguladıkları 10 hastada bir tarafa küçük partiküllü (0.25-1.0 mm) sığır kaynaklı greft kullanırken diğer tarafa büyük partiküllü (1.0-2.0 mm) sığır kaynaklı greft kullanmışlardır. 9 ay sonunda mikro CT ve histolojik gözlem için kemik örneği alınmıştır. Mikro CT ve histoloji sonuçlarında iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Her iki grubun da eşit derecede iyi performans göstererek kemiğe yüksek bir tork (>50 N) ile implant yerleştirilebildiği gözlenmiştir. Bu çalışma ile maksiller sinüs ogmentasyon ve implant prosedürleri için iki partikül boyutu arasında klinik veya histolojik bir fark yaratmadığı sonucuna ulaşılmıştır. Benzer olarak bilateral sinüs lift operasyon modelinde yapılan başka bir klinik çalışmada de Molon ve ark. (62) küçük ve büyük partiküllü greft grupları

arasında yeni kemik oluşumu bakımından fark bulamamıştır. Araştırmacılar, büyük partiküllü greft kullanılarak yapılan sinüs ogmentasyonu prosedüründe, kullanılan greft miktarının toplam greft hacminden ödün vermeden azaltılabileceğini savunmuşlardır. Bununla birlikte küçük veya büyük boyutlu partiküllerin seçiminin cerrahın tercihine, maksiller sinüsün boyutuna, rehabilitasyon için gerekli implant sayısına ve sinüs anatomisine bağlı olarak değişiklik gösterebileceğini belirtmişlerdir (62). Bu iki çalışmanın da benzer sonuçlar elde ettiği görülmektedir. Ancak bizim çalışmamızda küçük partiküllü greft kullanılan gruplarda yeni kemik oluşumu daha yoğun izlenirken büyük partiküllü greft kullanılan gruplarda kemikteki ara bağlantılar zayıf bulundu. Küçük partiküllü grefte i-TZF ilavesi yapılan gruplarda hem erken hem de geç dönemde yeni kemik oluşumu anlamlı olarak yüksek bulundu.

Kheur ve ark. 23 hastaya ridge split uygulamışlardır. Hastalar ridge split prosedüründen önce rastgele alloplast (n=11) veya allogreft (n=12) grubuna ayrılmış ve her grup içinde uygulanacak greft materyalleri küçük ve büyük olarak iki partikül şeklinde yine gruplara ayrılmıştır. Kret genişliği cerrahi uygulama öncesinde ve sonrasında ölçülerek kretteki kazanım karşılaştırılmıştır. İki greft tipi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunduğu ve ortalama kret genişliği kazancının alloplast grubunda allogreft grubundan önemli ölçüde daha fazla olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Araştırmacılar, her iki greft tipi için (alloplast ve allogreft), büyük partiküllü greftin, küçük partiküllü greftten daha çok kret genişliği kazandırığı sonucuna varmışlardır (64).

Jensen ve ark. (104) minipig deney modeli üzerinde bilateral maksiller sinüs lift uygulamışlardır. Bir tarafta küçük partiküllü deproteinize sığır kaynaklı kemik grefti (0.25-1.0 mm) kullanırken diğer tarafa büyük partiküllü deproteinize sığır kaynaklı kemik grefti (1.0-2.0 mm) kullanmışlardır. Kemiğe implant yerleştirip sonrasında kemik iyileşmesini histolojik olarak incelemişler ve implant stabilitesi ölçümü yapmışlardır. Greft partikül boyutunun, erken ve geç kemik iyileşmesi dönemleri için yeni oluşan kemik miktarı, greft rezorpsiyonu veya implant kemik bağlantısı değerleri üzerinde kalitatif veya kantitatif bir etkisinin olmadığı sonucuna varmışlardır. Küçük partiküllü kemik greftinin, erken dönemde büyük partiküllü greftten daha yüksek

osteokondüksiyon gösterdiğini ancak 12. haftada iki partikül boyutu arasında bir fark olmadığını bulmuşlardır. İmplant stabilitesi açısından da gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (104). Bizim çalışmamızda hem erken hem geç dönem K+i-TZF grubu ortalaması diğer gruplardan yüksek bulundu ve bu durum sonuçlara istatistiksel olarak anlamlı bir fark olarak yansıdı. İ-TZF ilavesi olmayan gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak, büyük partiküllü kemik grefti kullanılan grupların kemik oluşum oranının geç dönemde dahi diğer gruplara kıyasla düşük olduğu görüldü.

Xu ve ark. (105) maksiller sinüs lift uyguladıkları tavşanlarda iki farklı boyuttaki (300-500 ve 850-1000 mm) deproteinize kemik greftlerinin osteokondüktif kapasitesini histolojik değerlendirme ile karşılaştırmıştır. Küçük partiküllü greft grubunda, yeni oluşan kemik birçok ara bağlantı göstermiş ve implantasyondan 8 hafta sonra defektin birçok bölgesinde yeni kemik alanları gözlenmiştir. Büyük partiküllü greft grubunda, yeni kemik oluşum oranı çok düşük bulunmuş ve sinüs boşluğunun merkezi implantasyondan 8 hafta sonra kemikleşme kanıtı olmayan fibröz bağ dokusu içerdiği görülmüştür. Küçük partiküllü greftin parçacıklar arası boşluklardaki yeni kemik alanı oranı, implantasyondan 4 ve 8 hafta sonra büyük partiküllü greftten önemli ölçüde daha yüksek bulunmuştur. Greft partikül boyutunun ve partiküller arası boşluğun osteokondüksiyonun önemli belirleyicileri olduğu sonucuna varmışlardır (105). Çalışmamızda biz de benzer olarak K+i-TZF grubunun hem erken hem de geç dönem iyileşmede yeni kemik oluşumunda en yüksek ortalamaya sahip olduğunu bulduk. Küçük partiküllü grefte ilave edilen i-TZF'nin etkinliği diğer gruplara oranla daha yüksek bulundu. Bununla beraber, çalışmamızdaki makroskobik gözlemler de büyük partiküllü kemik grefti uygulanan gruplarda bölgeye daha çok yumuşak doku göçü olduğu yönündeydi. Histolojik bulgular sonucunda bağ doku ölçümlerinde farklı partikül boyutları arasında hem erken hem de geç dönemde anlamlı bir istatistiksel fark bulunamadı, ancak büyük partiküllü greft kullanılan gruplarda bağ doku ortalamaları (%35,55) ve rezidüel greft ortalamaları (%17,77) daha yüksek bulundu.

Zhou ve ark. (68) tavşan kalvaryumu üzerinde yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu modelini kullanarak iki farklı partikül boyutundaki anorganik sığır kemik greftlerini kıyaslamışlardır. Tavşanların kalvaryumu üzerinde 5mm yükseklik, 0.5 mm kalınlığında ve 10 mm çapında iki titanyum yarım küre kubbe yerleştirilmiş

ve iki adet mini vida ile kemik yüzeyine sabitlemişlerdir. Titanyum kubbeler yerleştirilmeden önce defektler küçük (300–500 µm) ve büyük partiküllü (850–1000 µm) olarak iki farklı greft ile doldurulmuştur. Tavşanlar histolojik inceleme için 4. ve 10. haftada sakrifiye edilmiştir. Araştırmacılar, küçük partiküllü greft grubunda hem erken hem de geç iyileşme döneminde yeni kemik oluşumunun, büyük partiküllü gruptan daha fazla ve yoğun olduğu sonucuna varmışlardır. Büyük partikül grubunda, yeni oluşan kemikte ara bağlantılar sınırlı bulunmuş ve fibrotik bir bağ dokuyla iyileşme gösterdiği görülmüştür. Çalışmada, küçük partiküllü greftlerin partikül arası boşluklarının daha fazla olması ve kemik ile greftin kontakt sahasının daha geniş olması nedeniyle osteokondüktif özelliğinin arttığı vurgulanmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edildi. K+i-TZF grubunun yeni kemik oluşum oranı daha yüksek bulunurken, B grubu hem erken hem geç dönemde en düşük yeni kemik ortalamasına sahip gruptu. Yine benzer olarak, büyük partikül grubunda greft ile kemik bağlantısının zayıf olduğu ve fibrotik bağ doku oranının fazla olduğu gözlemlendi. En yüksek rezidüel greft ortalaması hem erken (%25,67) hem geç (%23,94) dönemde B grubuna aitti. Bu sonuçlar doğrultusunda; i-TZF ilavesi ile osteokondüktif özelliği daha yüksek olan küçük partiküllü greftin osteojenik potansiyelinin arttığı söylenebilir. Ayrıca deneyler esnasında, makroskopik gözlemlerimiz de i-TZF'nin küçük partiküllü grefte ilavesi ile büyük partiküle kıyasla manipülasyonu daha kolay bir greft formu elde edildiği yönündeydi.

Kluppel ve ark. anorganik sıgır kaynaklı kemik greftinin farklı partikül boyutlarında kemik onarımındaki etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada tavşan kalvaryumunda oluşturulan defektlere küçük, orta ve büyük partiküllü anorganik sıgır kaynaklı kemik greftleri ve kontrol grubu olarak da partiküllü otojen kemik grefti yerleştirilmiştir. Kemik örnekleri önce radyografik olarak sonrasında da histolojik olarak incelenmiştir. Otojen greft uygulanan gruplarda zenogreft uygulanan gruplara kıyasla daha yoğun yeni kemik oluşumu izlenmiştir. Çalışmanın sonuçları orta ve büyük partiküllü greft ile karşılaştırıldığında, küçük partiküllü greft ile daha fazla ve daha iyi kalitede yeni kemik elde edildiğini kanıtlamıştır. Küçük boyutlu granüller, biyomateryal implantasyonundan sonraki 60 gün içinde neredeyse tamamen emilmiş; partikül boyutundaki artış, emilimini daha zor hale getirmiştir. Partikülün boyutu ile

emilimi arasında açık bir korelasyon görüldüğünü belirtmişlerdir. Araştırmacılar bu durumu, biyomateryal yüzeyi ile çevreleyen dokular arasında artan temasın daha fazla rezorpsiyon ve yeni oluşan kemiğin daha fazla birikimi ile sonuçlanmış olabileceği şeklinde yorumlamışlardır. Bizim sonuçlarımız da Klüppel ve ark. elde ettikleri sonuçlara benzerlik göstermektedir. Küçük partiküllü greft kullanılan gruplarda daha yüksek oranda yeni kemik oluşumu ve daha az oranda rezidüel greft olduğu sonucuna ulaştık.

Küçük ve büyük partiküllü dondurulup kurutulmuş allogreftlerin osteogenesis üzerindeki etkisini araştırmak için Shapoff ve ark. (59) yapmış oldukları çalışmada maymun modeli kullanmışlardır. Greftin yüzey alanındaki artışın gelişmiş osteojenik indüksiyonla sonuçlanabileceğini ve küçük kemik parçacıklarının hidrolitik enzimlere kolayca duyarlı olan geniş bir yüzey alanı sunduğunu ortaya koymuşlardır. Ayrıca artan gözenek sayısı ile küçük greft partiküllerinin osteogenesisi uyarabileceğini öne sürmüşlerdir. Küçük greft parçacıklarının, osteojenik maddelerin salınımı ile kemik iliği nekrozunu artırdığı ve nekroz olan kemik iliğinin osteojenik maddeleri serbest bırakarak greft bölgesi çevresindeki konakçı hücreleri osteoblast olmaları için uyardığını öne sürmüşlerdir. Sonuç olarak, araştırmacılar daha küçük partiküllü kemik greftlerinin osteogenesisinde daha etkili olduğunu savunmuşlardır (59). Osteokondüktif özellikteki sığır kaynaklı kemik grefti kullandığımız bu tez çalışmasında, K+i-TZF grubunun yeni kemik ortalaması (%70,0) anlamlı oranda yüksek bulunması; çalışmada da bahsedildiği gibi küçük partiküllü greftlerin yeni kemik oluşumunda daha başarılı olmasıyla paralel bir sonuçtur. Bunun yanında, i-TZF'nin içeriğindeki canlı hücreler ve büyüme faktörleri ile grefte osteogenetik bir potansiyel kazandırmış olması ile yeni kemik oluşumuna olumlu yönde katkı sağladığı sonuçlarımızla da desteklenmektedir.

Winter (106) laboratuvar hayvanlarının derisine implante edilen sentetik bir greft materyali olan polihidroksietilmetakrilatın (PHEMA) ossifikasyonunu araştırmıştır. Osteogenesisin, hücrelerin veya iskeletin önceden oluşturulmuş organik veya inorganik bileşenleri kaynaklı değil, gözeneklerin yarattığı fiziksel faktörler ile ilgili olduğunu öne sürmüştür. Haversian kanalları veya rezorpsiyon boşluklarını da osteoindüktif olgudan bağımsız bu fiziksel faktörler olarak tanımlamıştır (106).

Savunulan bu tezden küçük partiküllü greftlerde bu gözeneklerin sayısının artmış olması ile kemik oluşumunun daha çok uyarılmasına yol açacağı sonucu çıkarılabilir. Bizim çalışmamızda da makroskobik gözlemlerimiz, küçük partiküllü kemik greftlerinin uygulandığı bölgede daha yoğun kemik oluşumu ile paraleldir. Histolojik incelemelerden elde edilen sonuçlar da K+ i-TZF grubunun yeni kemik oluşum yüzdesini anlamlı olarak yüksek olduğunu gösterdi.

Günümüzde, maksillofasiyal cerrahi alanında, ogmentasyon prosedürlerinde kritik rol oynayan kemik grefti üzerinde en çok araştırma yapılan konulardandır. Bu bağlamda, kemik greftlerinin mekanik, kimyasal veya biyolojik özellikleri üzerinde değişiklikler yapılabilmektedir ve bu değişikliklerin yeni kemik oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmaktadır. Kemik grefti partikül boyutu da bu özelliklere bir örnektir. Graft partikül boyutundaki değişikliğin yeni kemik oluşumu, damarlanma ve yumuşak doku göçü üzerindeki etkilerini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak enjekte edilebilir trombosit zengin ilavesinin farklı partikül boyutlarındaki kemik greftlerine ilavesini karşılaştıran bir çalışma mevcut değildir. Bizim çalışmamız bu yönüyle literatürde ilk olacaktır.

Kemik grefti ile yapılan ogmentasyon uygulamalarında, yeni kemik oluşumu büyük ölçüde greftin vasküler olarak beslenmesine bağlıdır. Osteoblastların ve osteoklastların kemik yapım yıkım döngüsünü sürdürmesi uygun oksijen konsantrasyonu ile meydana gelir. Oksijenizasyon ise damarlanmaya ve bölgeye periferden gelen kan ile beslenmeye bağlıdır. Greftin hareketliliği veya greft üzerine gelen kuvvetler, greft bölgesindeki vasküler beslenmeyi kolayca tehlikeye atmaktadır. Kötü damarlanma da greftin uygulandığı bölgede kemik iyileşmesi sürecini olumsuz etkilemektedir. Bu amaçla kemik greftlerine ilave materyaller kullanılarak greftin vaskülarizasyonunu, dolayısıyla beslenmesini artırmak mümkün olmaktadır. Günümüzde, en sık kullanılan yardımcı biyomateryaller otolog kan ürünleridir. Elde etmesi kolay, maliyeti düşük ve zengin hücre içeriği ile kemik oluşumuna olumlu etkilerinin olduğu kanıtlanmış olan trombosit konsantrasyonları maksillofasiyal cerrahi alanında da yaygın kullanıma sahiptir. Zenograft gibi osteokondüktif özellikteki kemik greftlerinin alıcı sahada kanlanması ve yeni oluşan kemiğin kalitesini artırmak amacıyla grefte otolog kan ürünleri ilave edilmektedir (4,20).

Trombosit konsantrasyonlarının ilk olarak tıp alanında yara iyileşmesi alanında araştırma yapılırken geliştirilmesinin ardından, oral ve maksillofasiyal cerrahide de oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaya başlamıştır. Trombositten zengin plazma (TZP) içeriğindeki fazla sayıda büyüme faktörü nedeniyle bir dönem tıp alanında oldukça yaygın kullanıma sahip olmuştur. Ancak eldesinde kullanılan antikoagülan maddelerin yara iyileşmesini de geciktirdiği öne sürülmüştür (10,107). Buradan yola çıkarak araştırmacılar, elde etmenin kolay ve ucuz olduğu otolog kan ürünlerini araştırmaya yönelmişlerdir. Bu arayışın sonucunda Choukroun ve ark. (9) tarafından trombositten zengin fibrin (TZF) konsantrasyonu ortaya çıkmıştır. TZF, pıhtılaşma sürecini önleyen ajanlar veya diğer doğal olmayan yan ürünler kullanılmadan üretilen ve bu nedenle %100 otolog olarak kabul edilen bir trombosit konsantrasyonudur. Doku ve yara iyileşmesi için gerekli olan konakçı hücreler, üç boyutlu bir fibrin matrisi ve büyüme faktörleri içeriği ile maksillofasiyal cerrahide başta yumuşak dokuların iyileşmesi için otolog bir yardımcı ürün olarak kabul edilmiştir (9). Ayrıca, yapılan çalışmalarla TZF ürünlerinin kemik iyileşmesine de katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. TZF'nin tek başına veya kemik grefti ile birlikte kullanımında kemik iyileşmesine olumlu etkileri olduğu bulunmuştur (14,76,77).

TZF'nin doku iyileşmesini hızlandırmasında; etkili neovaskülarizasyon özelliği, hızlı sikatrisyel doku iyileşmesi ve enfeksiyöz olayların neredeyse hiç oluşmaması gibi faktörler etkilidir (75). Fibrin pıhtı oluşumunu ve yapısını etkileyen faktörler arasında genetik faktörler, edinilmiş faktörler (plazmadaki anormal trombin ve faktör XIII konsantrasyonu, kan akışı, trombosit aktivasyonu, oksidatif stres, hiperglisemi, hiperhomosisteinemi, ilaçlar ve sigara kullanımı gibi) ve diğer parametreler (mikro yerçekimi, pH, sıcaklık, indirgeyici ajanlar ve klorür ve kalsiyum iyonlarının konsantrasyonu gibi) bulunur (108).

Santrifüj işlemi, bir sıvının içindeki hücresel komponentleri ayırmak amacıyla bir cihaz aracılığıyla yüksek güçte kuvvet uygulanması ve bunun yarattığı merkezkaç kuvvetinin kullanılmasıdır. Santrifüj esnasında santrifüj kuvveti, yer çekimi kuvveti ve moleküllerin sürtünme kuvveti olmak üzere farklı kuvvetler etki göstermektedir. Bu esnada densitelerine ve kütlelerine bağlı olarak parçacıkların göçü görülür. Lökosit ve trombositlerin ayrıştırılmasında rölatif santrifüj kuvveti (RCF) denilen bu etkime kuvvetinden yararlanılmaktadır. RCF değeri, dakikadaki devir

sayısı (rpm) ve parçacıkların dönme merkezinden uzaklığına (r) bağlıdır. Hesaplama için $RCF = (RPM)^2 \times 1.118 \times 10^{-5} \times r$ formülü kullanılmaktadır. Araştırmacılar, farklı santrifüj protokolleri kullanarak elde edilen fibrin ağının yapısını geliştirmeyi amaçlamışlardır (109). Choukroun ve ark. (9) katı TZF matriksi eldesi için 2700 rpm/12 dakika protokolünü önermişlerdir. TZF matrisinde bulunan hücrelerin histolojik olarak sayımı yapıldığında elde edilen ilginç bulgulardan biri, lökositlerin çoğunluğunun fibrin pıhtısının dibine yakın bulunması olmuştur. Bu bulguya dayanarak, çok yüksek santrifüjleme hızlarının (g-kuvvetlerinin) lökositleri santrifüj tüplerinin dibine ve TZF matris pıhtısından uzağa ittiği açıkça ortaya çıkmıştır. Bu nedenle araştırmacılar, lökositlerin matris boyunca dağılmasını sağlayabilecek düşük santrifüj hızlarını araştırmaya başlamışlardır (9,16).

Ghanaati ve ark. (15) düşük santrifüj hızı konsepti kullanarak A-TZF(advanced plateletten zengin fibrin) adını verdikleri bir trombosit konsantrasyonu geliştirmişlerdir. Santrifüj protokolü 1500 rpm/14 dakika olarak belirlenmiştir. Standart TZF (L-TZF) ile kıyasladıklarında A-TZF’de trombositler ve nötrofilik granülosit sayısında artışla beraber büyüme faktörlerinin salınımının uzadığını gözlemlemişlerdir (109).

Düşük santrifüj hızı konseptini histolojik yönden inceleyen çalışmalardan biri de El Bagdadi ve Choukroun (110) tarafından yapılmıştır. TZF, A-TZF ve A-TZF+ formlarındaki büyüme faktör salınımı ve trombosit dağılımını incelemişlerdir. TZF elde etmek için 2400 rpm de 12 dk santrifüj uygulamışlar ve 708 g değerinde RCF etki etmiştir. A-TZF elde ederken 1300 rpm devirde 14 dk santrifüj ve 208 g değerinde RCF kullanmışlardır. A-TZF+ eldesi için 208g RCF değeriyle 1300rpm devirde 8 dk santrifüj edilmiştir. VEGF salınımında ilk 7 günde tüm gruplarda bir artış gözlenirken, 10 gün sonunda A-TZF+’ın anlamlı derecede yüksek değerler gösterdiği rapor edilmiştir. TGF- β 1 salınımında ise A-TZF ve A-TZF+ grubunda TZF membrana kıyasla 10 günün sonunda anlamlı şekilde yüksek değerler görüldüğü belirtilmiştir. İmmunohistokimyasal incelemede ise düşük RCF değeriyle elde edilen A-TZF ve A-TZF+’ ta fibrin içinde trombositlerin dağınık ve homojen yerleşim gösterdiği, yüksek RCF ile elde edilen TZF’ de ise trombositlerin fibrinin üst ve orta kısmında az miktarda bulunduğu, alt kısımda kümелendiği belirtilmiştir. Çalışmanın sonucunda

düşük RCF konsepti ile daha fazla vital hücre elde edilebileceği ve daha fazla büyüme faktörü salınımı gerçekleşeceği, dolayısıyla iyileşmenin hızlanacağı öne sürülmüştür. Biz de çalışmamızda elde edilen kan örneklerini, literatür rehberliğinde 700 rpm hızda 3 dakika boyunca santrifüje ettik. Düşük santrifüj devri ve süresi ile daha fazla miktarda büyüme faktörü ve vital hücre varlığının yeni kemik oluşum oranlarının artışında etkili olduğunu düşünmekteyiz. İmmunohistokimyasal değerlendirmelerde de i-TZF ilavesi olan grupların yeni kemik oluşum oranlarını anlamlı olarak yüksek bulduk.

Farklı santrifüj cihazlarını karşılaştırmak amacıyla Miron ve ark. (111) L-TZF ve A-TZF protokollerini kullanmışlardır. Santrifüj cihazının TZF eldesinde farklılık yaratan bir faktör olmadığını ancak kullanılan tüplerin kalitesinin önemli olduğunu ve mutlaka optimize edilmesi gerektiğini savunmuşlardır (111). Miron ve ark yaptıkları bir diğer çalışmada (112) ise horizontal santrifüj yöntemini ilk defa tanıtmışlar ve avantajlarını anlatmışlardır. Tüplerin tam yatay olarak yerleştirilip santrifüj edildiği bu yöntemde hücrelerdeki ayrılma daha net gözlenmiş, buna ek olarak sabit açılı santrifüj yöntemine göre daha yüksek konsantrasyonda trombosit ve lökosit saptanmıştır (112). Daha sonra Miron ve ark. (108) horizontal santrifüj yöntemi ile 6 farklı santrifüj hızı ve 4 farklı santrifüj süresini kullanarak 24 farklı protokol ile elde ettikleri TZF konsantrasyonlarını karşılaştırmışlardır. Sonuçlarında katı TZF matris için 400- 700 g aralığında RCF ve 8 dakika sürenin; sıvı TZF için ise 200- 400 g aralığında RCF ve 5 dakika sürenin ideal olduğunu bildirmişlerdir (108).

Enjekte edilebilir TZF, düşük santrifüj hızı konseptinin devamı niteliğinde henüz çok yeni geliştirilmiş bir yöntemdir. Zamanla sıvı bir TZF matrisinin kullanımına ihtiyaç duyulmuştur. Araştırmacılar, santrifüj hızının ve rölatif santrifüj kuvvetinin yanında santrifüj süresinin de azaltılması ile sıvı formda bir TZF konsantrasyonu elde etmişlerdir. (83). Hastadan alınan kan, içinde herhangi bir antikoagülan ajan veya katkı maddesi bulunmayan plastik boş bir santrifüj tüpünde 700 rpm (60 g) gibi çok düşük bir hızda, daha da kısa sürede (3 dakika) santrifüjlendiğinde enjekte edilebilir trombostten zengin fibrin (i-TZF) elde edilmektedir. Katı TZF matrisi eldesinde kullanılan cam tüplerin aksine plastik tüplerde kan pıhtılaşma süreci santrifüj boyunca

aktive olmamaktadır (9,83). i-TZF yaklaşık 15 dakika boyunca sıvı formda kalır. Uygulamadan sonra, 10-14 gün boyunca sürekli olarak salınan trombosit kaynaklı büyüme faktörleri açısından zengin bir TZF pıhtısına dönüşür (83).

i-TZF hazırlamak için kullanılan fraksiyonasyon protokolleri değişkenlik gösterebilmektedir ve farklı fraksiyonasyon protokollerinin etkilerini araştıran çalışmalar literatürde mevcuttur (113,114). Bir çalışmada, i-TZF fraksiyonlamanın preparasyonundaki varyasyonlardan türetilen fiziksel ve biyolojik özellikler üzerindeki etkisi viskoelastisite ve büyüme faktörleri salınımı açısından değerlendirilmiştir. Santrifüj işleminden sonra tam kan, katmanlara göre üç ana kısma ayrılır: Sarı üst kısım, orta kısım (buffy coat) ve kırmızı kan hücresi içeren alt kısım. Santrifüjlemeden sonra i-TZF'nin elde yöntemi, sadece orta kısmın üzerindeki tüm üst tabakanın enjektöre çekilmesi olarak tanımlanmıştır, ancak bu üst tabakanın miktarı bireyler arasında değişebilir ve aspirasyon esnasında iğne uçlarının konumu da farklı klinik uygulamalarda değişkenlik gösterebilmektedir (115). Kırmızı ve sarı olarak iki tip i-TZF tanımlanmıştır. Yapılan çalışmanın sonucunda kırmızı i-TZF'nin büyüme faktörü salınımının daha yüksek olduğu; sarı i-TZF'nin ise mekanik olarak daha avantajlı bir formda olduğu sonucuna varılmıştır (114).

Çalışmamızda enjektöre çekilen i-TZF çoğunlukla kırmızı tipteydi. Bununla birlikte, i-TZF'yi enjektöre çekme aşamasında sarı i-TZF eldesinin daha zor olduğunu ve kırmızı i-TZF'nin de kemik greftini sticky bone formuna getirebildiğini gözlemledik.

Belirlenmiş olan santrifüj protokolüne rağmen, sıvı formda TZF eldesi için araştırmacılar çeşitli santrifüj değerleri kullanmışlardır. Mandibuler 20 yaş diş çekimi sonrası sokete sticky bone grefti uygulayan Rupawala ve ark. (116) hastalardan aldıkları venöz kanı 2400-2700 rpm arasında değişen hızlarla 2 dakika boyunca santrifüj ederek i-TZF elde etmişlerdir. Aydınıurt ve ark. (117) ratlarda deneysel periodontitis modeli tedavisinde i-TZF'nin etkinliğini araştırmayı hedeflemişlerdir. Bu amaçla i-TZF eldesi için 3300 rpm/2 dakika şeklinde bir santrifüj protokolü uygulamışlardır.

Literatürdeki benzer çalışmaların da rehberliğinde, çalışmamızda 700 rpm/ 3 dk santrifüj protokolünü uygulayarak sıvı formda bir TZF konsantrasyonu elde ettik. Burada amaç; hem i-TZF'nin zengin büyüme faktörü içeriğinin farklı partikül boyutundaki kemik greftleri üzerindeki etkinliğini değerlendirmek hem de grefte pek çok avantajı olan sticky bone formunu kazandırmaktı. Deneyler esnasında da sticky bone formuna gelen greftin kolay uygulandığını ve defekte ölü alan bırakmadığını gözlemledik. Küçük partiküllü grefte ilave edilen i-TZF, grefti uygulaması daha kolay bir form haline getirdi. Histolojik değerlendirmelerin sonucu da de bu gözlemlerimizi destekledi. Enjekte edilebilir TZF'nin küçük partiküllü kemik greftine ilavesinin yeni kemik oluşumu ve damarlanma açısından daha yüksek etkinlik gösterdiği sonucuna ulaştık.

Yapılan çalışmalarla TZF ürünlerinin kemik iyileşmesine de katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır. TZF'nin tek başına veya kemik grefti ile birlikte kullanımında kemik iyileşmesine olumlu etkileri olduğu bulunmuştur (14,76,77).

Oliveira ve ark. (17) TZF'nin sığır kaynaklı kemik greftine ilavesinin ratlarda kraniyumda oluşturulan defektlere uygulamışlardır. Erken ve geç dönem kemik iyileşmesinin histolojik olarak incelendiği çalışmada defektler; yalnızca TZF, greft+TZF, yalnızca greft ve kontrol (pıhtı) şeklinde ayrılmıştır. Greft+TZF grubunun yeni kemik oluşum oranı diğer gruplara kıyasla daha yüksek bulunmuştur. Araştırmacılar, TZF'nin içeriğindeki büyüme faktörlerinin kemik oluşumuna olumlu katkı sağlayarak oluşan yeni kemiğin kalitesini artırdığı sonucuna varmışlardır. Bizim çalışmamızda da bu çalışmanın sonuçlarıyla paralellik göstermektedir. Kemik greftine i-TZF ilave edilen gruplarda yeni kemik oranı diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur.

İlk olarak 2010 yılında Sohn ve ark. (118) tarafından “sticky bone” konsepti adını verdikleri yöntem geliştirilmiştir. Maksiller sinüs ve kret augmentasyonunda kullanımını öne sürdükleri yöntemde otojen fibrin yapıştırıcısı ile kemik greftini karıştırarak uygulamışlardır. Elde edilen bu greft formunun manipülasyon kolaylığı, uygulandığı bölgeye iyi adaptasyon, greftin uygulandığı bölgede stabilitesini artırması, büyüme faktörleri salınımı için lökosit ve trombositleri fibrin ağı içinde barındırması gibi pek çok avantajı mevcuttur. Araştırmacılar bu yöntemin otojen blok greft ve titanyum membran uygulamalarına alternatif olabileceğini öne sürmüşlerdir. Literatürde sticky bone formunun uygulandığı çeşitli klinik vaka raporları mevcut olsa da yeni kemik oluşumunu histolojik olarak inceleyen ayrıntılı bir çalışma mevcut değildir (87,96). Bizim çalışmamız da farklı partikül boyutlarına ilave edilen i-TZF'nin etkinliğini histolojik olarak araştıran ilk çalışmadır.

Sohn ve ark. (87) diğerk bir klinik vaka serisinde ise implant cerrahisi öncesi CGF (konsantre büyüme faktörü) ile allogrefti karıştırarak elde ettikleri sticky bone greft formu ile kemik ogmentasyonu gerçekleştirmişlerdir. Grefti A-PRF ile karıştırdıklarında elde ettikleri forma ise sticky gel adını vermişlerdir. 6. Ayın sonunda bölgeden kemik örneği alıp H&E boyamayla incelemişlerdir. Araştırmacılar, klinik ve histolojik açıdan yeni kemik oluşumu bakımından tatmin edici sonuçlar olduğunu belirtmişlerdir. Sonuç olarak sticky bone formunun kolay şekillenme, iyileşme süreci boyunca uygulandığı bölgede hareketsiz kalarak greftin hacmini koruyabilme, içeriğindeki büyüme faktörleri sayesinde kemik ve yumuşak doku iyileşmesini hızlandırması gibi birçok avantajı olduğunu belirtmişlerdir (87). Çalışmamızdaki gözlemlerimiz de sticky bone formunun birçok faydasını ortaya koydu. Bunlar, greftin bölgeye daha kolay taşınması ve yerleştirilmesi, i-TZF'nin içeriğindeki zengin hücre ve büyüme faktörlerinin kemik oluşumuna olumlu etkisi olarak sayılabilir.

Mourão ve ark. (18) yaptıkları çalışmada i-TZF'nin diğerk trombosit konsantrelerine bir alternatif olabileceğini ve i-TZF'nin partiküllü kemik greftine ilavesiyle elde edilen sticky bone formunun avantajlarını göstermeyi amaçlamışlardır. İ-TZF eldesinde, 9ml'lik boş plastik tüp kullanarak horizontal santrifüj yöntemiyle 3300 rpm/2 dk protokolünü uygulamışlardır. Elde edilen i-TZF'yi sentetik özellikteki partiküllü kemik greftine uygulamışlar, ardından yaklaşık 5 dakika sonra greftin yapışkan bir form aldığını gözlemlemişlerdir. Bu yöntemin klinikte kolay uygulanabildiğini ve daha çok çalışma ile geliştirilmesi gerektiğini vurgulamışlardır (18).

Chenchev ve ark. (119) yayınladıkları vaka raporunda travma sonucu kısmi alveoler fraktür ile birlikte kaybedilen 11 no'lu diş bölgesinin ogmentasyonunda i-TZF ile zenogreft kombinasyonu kullanmışlar ve bölgenin üzerini A-TZF membran ile örtmüşlerdir. i-TZF elde etmek amacıyla Choukroun' un tarif ettiği 700 rpm/3 dk, A-TZF için ise 1300 rpm/8 dk santrifüj protokollerini uygulamışlardır. 4 aylık iyileşme süresinin ardından başarılı şekilde implant yerleştirmişlerdir. Araştırmacılar, TZF kullanımının sert ve yumuşak dokuların iyileşmesini hızlandırdığı ve başka bir bariyer

membran kullanılmadan, TZF membran kullanılmasının işlemin maliyetini düşürdüğü sonucuna varmışlardır (119).

Melek ve ark. (120) maksiller alveolar defektlerin rekonstrüksiyonu için dentin grefti ile i-TZF kombinasyonunu kullanmışlardır. Çalışmaya maksiller anterior ve premolar diş çekim endikasyonu bulunan ve implant yapılması planlanan hastalar dahil edilmiştir. Çekilen dişlerden dentin grefti elde edilmiş ve partikülize greft defekt alanına uygulanarak kret formu oluşturulmuştur. Daha sonra hastalardan alınan venöz kandan elde edilen i-TZF bölgeye enjekte edilmiştir. Bölge kollajen membran ile örtülmüştür. Hastalar operasyon sonrası 7. gün, 45. gün ve 3. ayda klinik olarak takip edilmiştir. Preoperatif olarak ve postoperatif 3.ayda da hastalardan CBCT görüntüsü alınmıştır. 3.ayda ogmentasyon yapılan bölgelere implant uygulaması yapılmış ve implantın stabilitesi rezonans frekans cihazıyla ölçülmüştür. Greftlenen bölge, ameliyat öncesi temel ölçümlere kıyasla ameliyattan üç ay sonra ortalama hacimde %23,47 artış gösterdiği belirtilmiştir. Ogmentasyonu takiben 3.aydaki radyografik değerlendirmede alveolar kret genişliğinde ve yüksekliğinde önemli bir artış gözlenmiştir. Başarısı birçok çalışmayla kanıtlanmış, otojen kemik materyali olan dentin greftine büyüme faktörleri ve hücrel bakımından zengin olan, grefti şekillendirme olanağı sunan i-TZF ilavesinin avantajları bu klinik çalışmayla da gösterilmiştir (120).

Rupawala ve ark. (116) gerçekleştirdikleri klinik bir çalışmada, profilaktik olarak yapılan mandibuler yirmi yaş diş çekimi sonrası sokete sticky bone uygulaması yapmışlardır. Hastalardan alınan kanın, 2400-2700 rpm arasında değişen hızlarla 2 ila 4 dakika boyunca santrifüjü ile elde edilen i-TZF'yi alloplastik bir greft materyali ile karıştırarak sticky bone oluşturmuşlardır. İşlem sonrası hastalara 3 aylık takip uygulamışlar; ağrı, şişlik, ağız açıklığı ve dişeti iyileşmesi 3, 7 ve 14. günlerde sayısal derecelendirme ölçeği, anatomik işaretler, çelik metrik cetvel kullanılarak önceden belirlenmiş kriterler doğrultusunda ölçülmüştür. Radyolojik değerlendirme, işlemden hemen sonra sırasıyla 1. hafta, 1. ay ve 3. ayda soket yüksekliği ölçümüyle yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, sticky bone kullanılan hastalarda ağrı ve şişliğin belirgin ölçüde daha az olduğu; kontrollerde dişeti iyileşmesinin daha iyi olduğu ve kemiğin trabeküler yapısında daha hızlı bir artış olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak çalışma, i-

TZF'nin güçlü fibrin ara bağlantısı ile elde edilen sticky bone formunun sokette uzun süre formunu koruyarak kalmasının yumuşak doku ve kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkilerini vurgulamıştır (116).

In vitro olarak yapılan bir çalışmada, enjekte edilebilir TZF'nin allogreft ve zeenogreft ilavesinin insan osteoblastları üzerindeki etkisi karşılaştırılmıştır. Kontrol gruplarında greftlere i-TZF ilavesi yapılmamıştır. Osteoblastların canlılığı, göçü, proliferasyon ve farklılaşması 3., 7. ve 10. günde alkalen fosfataz (AP), kemik morfogenetik proteini (BMP-2) ve osteokalsin (OCN) antikor ölçümleri yapılarak kıyaslanmıştır. Osteoblast canlılığının ve çoğalmasının i-TZF ilavesi ile önemli ölçüde yükseldiği; bununla birlikte allogreftte i-TZF ilave edilen grupta, diğer gruplara kıyasla anlamlı ölçüde osteoblastlarda daha yüksek oranda proliferasyon ve farklılaşma görüldüğü sonucuna varılmıştır (89).

Periodontal cerrahide de i-TZF kullanımı her geçen gün daha sıklıkla tercih edilmektedir. Kapa ve ark. (121) maksiller estetik bölgedeki Miller Sınıf I ve II dişeti çekilmelerini tedavi etmişler, sonuçları klinik ve radyografik olarak değerlendirmişlerdir. Koronale flep kaydırma yöntemi uygulanan vaka serisinde açık kök bölgelerine dondurulup kurutulmuş allogreftte i-TZF ilavesiyle elde edilen sticky bone uygulamış ve greft bölgesinin üzeri, i-TZF kaplı kollajen membran ile örtmüşlerdir. 6. Ayda yapılan klinik ve radyografik değerlendirmelerde vakaların çoğunda kök yüzeylerinde tam kapanma, bukkal ve palatinal diş eti kalınlığında belirgin artış saptamışlardır. Bu vaka serisine göre, sticky bone ve i-TZF ile ıslatılmış kollajen membranın birleşik etkisinin rejeneratif sonuçları en üst düzeye çıkardığı söylenebilir. Çalışmanın sonucunda, i-TZF'nin kemik ve yumuşak doku iyileşmesine önemli ölçüde katkı sağladığı ortaya çıkmıştır.

Enjekte edilebilir TZF'nin kullanımı ogmentasyon prosedürlerinde her geçen gün yaygınlaşmaktadır. Sadece kemik greftine değil başka biyomateryallere de ilavesiyle iyileşmeyi hızlandırıcı özelliğinden yararlanılmaktadır.

Gülşen ve ark. (95) enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (i-TZF) için taşıyıcı olarak kullanılan kollajen tıkaçlarla maksiller sinüs tabanı ogmentasyonu sonrası yeni kemik oluşumunu değerlendirmeyi amaçlamışlardır. 12 hasta üzerinde yapılan bu çalışmada, operasyondan hemen sonra ve 6. ayda panoramik görüntülerde

mezial ve distal bölgelerden kemik ölçümleri yapmışlardır. Kemik grefti kullanmadan kollajen tıkaç ve i-TZF kullanarak maksiller sinüs ogmentasyonu ve ardından implant uygulaması yaptıkları bu tekniğin yeni kemik oluşumunda başarılı sonuç verdiği; ayrıca 6 aylık takiplerde implant sağ kalım oranını %100 olarak rapor etmişlerdir.

Yuan ve ark. (122) köpeklerde diş çekimi yapmışlar, sığır derisinden elde edilen jelatin nanoparçacıkları (GNP) ve i-TZF karışımını kullanarak soket koruma işlemi uygulamışlardır. GNP'lerin ve i-TZF'nin kombinasyonunun, dış kuvvetlere dayanıklı uygun mekanik özelliklere sahip olduğu; aynı zamanda kanın pıhtılaşma süresini önemli ölçüde hızlandığını rapor etmişlerdir.

In vitro bir çalışmada ise Scarano ve ark. (96) sığır kaynaklı partiküllü kemik greftine; sıvı formda TZF, kan veya serum fizyolojik ekleyerek üç farklı kombinasyonunun üç boyutlu mimarisini ve biyomekanik özelliklerini değerlendirmişlerdir. Enjekte edilebilir TZF ilave edilmiş greftin, sadece kan veya serum fizyolojik ile karıştırılmış greft partikülleri ile karşılaştırıldığında mekanik direnci arttırdığı ve yapışkan bir blok oluşumuna neden olduğu sonucuna varmışlardır.

Çalışmamızda klinik olarak uygulanabilirliği de literatürde gösterilmiş olan i-TZF ve zenogreft karışımından elde edilen greft formunu kullanarak bu yöntemin farklı partiküllü kemik greftleri ile uygulamada nasıl sonuçlar vereceğini araştırdık. Literatürde Wang ve ark. (11), El Bagdadi ve ark. (110), Choukroun ve ark. (9), Miron ve ark. (85) ve Varela ve ark. (82) yaptıkları çalışmalarda düşük santrifüj hızı konsepti ile elde edilen, iyileşmeyi hızlandırıcı etkisi kanıtlanmış olan TZF formlarından i-TZF modelini kullandık. Bu amaçla kemik iyileşmesini erken ve geç dönemde histolojik olarak inceledik. Ancak erken dönemde i-TZF ilavesi olan gruplarda yeni kemik oluşum yüzdelerinde anlamlı bir fark bulunamadı. Bununla birlikte, enjekte edilebilir TZF'nin küçük partiküllü kemik greftine ilavesinin, geç dönem iyileşmede yeni kemik oluşumu ve vaskülarizasyon bakımından daha yüksek bir etkinlik gösterdiği sonucuna ulaştık.

Kemikte meydana gelen bir defektin kendiliğinden iyileşme potansiyeli o defektin boyutlarına bağlıdır. Kemik defektlerinin boyutu değişiklik göstermektedir; bununla birlikte hayvan deney modelleri veya insanlar açısından farklılık gösterebilir (29,34,48).

Kritik boyutta defekt, kemik oluşumuna yardımcı herhangi bir materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyuttaki kemik boşluğu olarak tanımlanmaktadır (30,34). Bu amaçla araştırmacılar farklı hayvan türleri için yaş, anatomi ve defekt bölgesine göre kritik boyutta defekt tanımlaması yapmıştır (123). Sohn ve ark. (33) tavşan kalvaryası modelinde 6, 8, 11 ve 15 mm'lik defektler oluşturarak spontan iyileşmeyi histolojik ve radyografik olarak incelemişlerdir. İdeal kritik boyutlu defektin 11 mm olduğunu ancak 4 grup oluşturulacaksa 6 ila 8 mm'lik defektlerin kullanılmasını önermişlerdir. Malzemelerin stabilitesi veya alıcı reaksiyonları gibi iyileşme yanıtının erken fazını değerlendirmek için 2-4 haftalık bir iyileşme süresi önerilebilirken, kemik iyileşmesi gibi geç iyileşmeyi değerlendirmek için en az 8 haftalık bir sürenin uygun olacağını belirtmişlerdir (33).

Çalışmamızda tavşan seçilmesinin nedenleri, kemik yapım-yıkım döngüsünün hızlı olması, maliyetinin düşük olması, kalvaryumunun grup sayısını karşılayabilecek boyutta olması ve i-TZF eldesi için venöz kan alımında kullanılabilecek ideal bir model olmasıdır. Deney hayvanlarındaki kranial defektlerin rejeneratif kapasitelerinin insandaki kemik iyileşme sürecinden daha iyi olduğu bilinmektedir. Tavşan kalvaryumu, morfolojik ve embriyolojik açıdan intramembranöz bir gelişim gösterir ve bu nedenle maksillofasiyal bölgedeki membranöz yolla gelişmiş diğer kemiklere benzerlik gösterir (34). Bu nedenlerle, maksillofasiyal cerrahi alanında biyomateryal uygulamaları ve kemik iyileşmesi takibi için sıklıkla tercih edilen deney hayvan modeli tavşan kalvaryumudur.

Çalışmamızın dört adet deney grubu içerecek şekilde planlanması nedeniyle literatürdeki benzer çalışmalara da bakılarak tavşan kalvaryumunda 7 mm çapında, dört adet kritik boyutlu kemik defekti oluşturulması uygun görülmüştür. Kemik

iyileşmesi takibi için yine literatürde tavşan kalvaryumunda yapılmış olan çalışmalar baz alınarak erken dönem için 4. hafta, geç dönem için ise 10. haftada histolojik inceleme amacıyla deney hayvanlarından kemik örneği elde edilmiştir.

Vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF); trombositlerden salınan, vasküler gelişim ve anjiyogenezin düzenlenmesi için en önemli büyüme faktörlerinden biridir. Kemik, yüksek oranda vaskülarize bir organ olduğu ve anjiyogenezis kemik oluşumunda önemli bir rol oynadığı için VEGF, ayrıca iskelet gelişimini ve doğum sonrası kemik onarımını da etkiler. Birçok hastada bozulmuş kemik onarımı ve rejenerasyonu, bozulmuş kan akışına bağlanabilir; bu nedenle, kemiklerdeki VEGF seviyelerinin modülasyonu, bozulmuş kemik onarımını tedavi etmek ve kemik rejenerasyonunu iyileştirmek için önem teşkil etmektedir. Kemik grefti uygulamalarında da defekt alanında anti-VEGF antikoru ile kemikteki damarlanma ve dolayısıyla yeni kemik oluşum alanları izlenebilmektedir. Damarlanmanın yoğun olduğu bölgeler beslenmekte olan kemik grefti alanlarına ve yeni kemik oluşumuna işaret etmektedir (21). VEGF, endotel hücrelerini tetikleyerek anjiyogenezi destekler. Hücre kültürü çalışmalarında, VEGF'nin, yeni oluşan damarlar aracılığıyla mezenkimal hücreleri mineralize alana taşıyarak kemik oluşumunda iyileşme, osteoblast ve osteoklast farklılaşması gibi birçok başka işlev sunduğunu göstermiştir (124).

Farklı partikül boyutlarında kemik greftlerinin damarlanması ve dolayısıyla yeni kemik oluşumunu meydana getirmesi farklılık göstermektedir. Ayrıca çalışmamızda i-TZF ilave edilen gruplarda trombosit konsantrasyonundan salınan büyüme faktörlerinden olan VEGF yoğunluğunu araştırmayı da amaçladık. Bu nedenle, immünohistokimyasal belirteç olarak primer antikor olan anti-VEGF kullandık. Yeni damarlanmanın olduğu alanlarda yoğun immünoreaktivite izlenmiştir, bu durum bize yeni kemik hücrelerinin de ortama geleceğini gösterdi. Çalışmamızın sonuçlarında K+i-TZF grubunun geç dönemde VEGF immünoreaktivitesi yüksek bulundu.

De Molon ve ark. (62) yaptıkları klinik çalışmada küçük (0.25-1.00 mm) ve büyük (1.0-2.0 mm) iki farklı partikül boyutundaki sığır kaynaklı deproteinize kemik grefti kullanarak hastalara bilateral olarak sinüs lift uygulaması yapmışlardır. 8 ay sonunda implant yuvası hazırlama esnasında operasyon bölgesinden histolojik inceleme için kemik örneği alınmıştır. İmmünohistokimyasal inceleme ile VEGF ve OCN'nin protein ekspresyonu da histolojik kesitlerde değerlendirilmiştir. Sonuç olarak iki partikül boyutundaki greft için de immünohistokimyasal değerlendirmede istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bunun sebebinin iyileşme süresinin 8 ay gibi uzun bir süre olarak belirlenmesi olabileceğini belirtmişlerdir (62). Bizim çalışmamızda, erken dönemde gruplar arasında VEGF antikor boyanmasında anlamlı bir fark bulunamazken geç iyileşme döneminde K+i-TZF grubu VEGF antikoruna karşı immünoreaktivitesi en yüksek grup olarak bulundu ($p=0,003$). Küçük partiküllü grefte ilave edilen i-TZF'nin, bölgede damarlanmayı, dolayısıyla yeni kemik oluşumunu artırma potansiyeline sahip olduğu sonucuna ulaştık. OCN antikor değerlendirmelerinde ise geç dönem K+ i-TZF grubunda yüksek immünoreaktivite gözlenirken sonuçlar istatistiksel olarak da anlamlı bulundu ($p=0,000$). Yeni kemik oluşumu için belirteç olan bu sonuçlar bize, i-TZF'nin zengin hücre ve büyüme faktörü içeriğinin kemik iyileşmesine katkı sağladığını göstermektedir.

Osteokalsin (OCN); osteoblastlar tarafından üretilir ve yine osteoblastlardan salınan fosfatazlarla birlikte kemik matriksinin mineralizasyonunun ayarlanmasından sorumludur. Kemik glikoproteini olarak da bilinen osteokalsin asidik karakterlidir ve K vitaminine bağımlı olarak sentezlenmektedir. D vitamini osteokalsin sentezini uyarırken parathormon osteokalsin sentezini inhibe eder. OCN, kemik olgunlaşmasında önemli bir rol oynar; osteoblast hücrelerinin farklılaşmış ve olgun aşamasını temsil eder (3,20). Çalışmamızda yeni kemik oluşum alanlarını saptamak amacıyla immünohistokimyasal belirteç olarak primer antikor olan anti-OCN kullanılmıştır. Osteoblastların çekirdeklerinin daha yoğun boyandığı alanlar yeni kemik oluşum alanlarını temsil etmektedir.

Wang ve ark. (11) hücre kültüründe yaptıkları çalışmada, i-TZF'nin osteoblast aktivitesi ve kemik dokusu formasyonundaki etkilerini TZP ile karşılaştırmışlardır.

Çalışmanın sonuçlarına göre TZP'nin osteoblast migrasyonunda kontrol grubuna göre değerlerinin 2 kat yüksek olduğu, i-TZF'nin ise 3 kat fazla değerlere sahip olduğu belirtilmiştir. Hücre ataşmanında farklılık gözlenmemesine rağmen 3. ve 5. gün sonunda i-TZF'nin hücre proliferasyonunda yüksek değerler gösterdiği rapor edilmiştir. ALP, Runx2 ve OCN 'deki mRNA seviyelerinde i-TZF grubunda anlamlı şekilde artış gözlenmiştir. Araştırmacılar, osteoblastik potansiyel ve kemik formasyonu kapasitesi açısından i-TZF'nin; kontrol grubu ve TZP'ye kıyasla daha başarılı olduğunu belirtmişlerdir (11). Bizim çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edildi. i-TZF ilavesi olan gruplarda diğer gruplara göre daha yüksek oranda yeni kemik oluşumu ve anlamlı derecede yüksek OCN immünoaktivitesi tespit edildi. Kemik greftine i-TZF ilavesinin kemik oluşumuna olumlu etkileri olan bir yöntem olduğu bizim sonuçlarımıza da yansımaktadır.

Miron ve ark. (85) i-TZF'nin hücre migrasyon, proliferasyon ve büyüme faktörü salınımı üzerine etkilerini araştırmıştır. Bu amaçla i-TZF ile TZP'nin büyüme faktörü salınımını karşılaştırmışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre TZP erken dönemde büyüme faktörü salınımında anlamlı şekilde yüksek değerler gösterirken, i-TZF'nin uzun dönemde daha fazla büyüme faktörü (PDGF, EGF ve IGF-1) salınımı gerçekleştirdiği belirtilmiştir. Ayrıca i-TZF uygulanan grupta TGF-B ve PDGF 'ün mRNA seviyelerinde anlamlı şekilde yüksek değerler bildirilmiştir. Araştırmacılar çeşitli büyüme faktörlerinin salınımında ve collagen1 gibi genlerin ekspresyonunda yüksek değerler gösteren i-TZF'nin biyoaktif potansiyele sahip olduğu ve doku rejenerasyonunu hızlandığını belirtmişlerdir (85).

Zhang ve ark. (125) bağışıklık yanıtı ile ilgili hücreler, özellikle makrofajlar ve dendritik hücreler üzerine i-TZF'nin etkisini incelemişlerdir. i-TZF'nin, makrofajların proinflatuar M1 fenotipini azalttığını ve bakteri süspansiyonu enjekte edilen kas defekti çevresindeki dendritik hücreleri aktive ettiğini bulmuşlardır. Ayrıca, in vitro deneyler de benzer olarak i-TZF'nin lipopolisakkaritin neden olduğu inflammatuar yanıtı bir noktaya kadar durdurduğu sonucunu göstermiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, doku iyileşmesi ve rejenerasyon bölgelerinde tam kan ile kıyaslandığında, i-TZF'nin daha güçlü bir antiinflammatuar etki gösterdiğini vurgulamışlardır. Zengin büyüme faktörü ve hücre içeriği olan i-TZF'nin, bunlara ek olarak antiinflammatuar etkisi de bu çalışmayla ortaya konmuştur.

Varela ve ark. (82) kan hücresi içeriğini, morfolojik yönleri, tip I kollajenin gen ekspresyonunu ve enjekte edilebilir trombositler zengin fibrin üzerindeki büyüme faktörlerinin salınımını değerlendirmişlerdir. 15 gönüllüden i- TZF eldesi için kan alımı yapmışlar ve kontrol grubunda periferik kan kullanmışlardır. i-TZF ve kan pıhtısı örnekleri, histolojik ve immünohistokimyasal IL-10, osteokalsin (OCN), VEGF ve TGF- β kullanılarak analiz edilmiştir. İmmünohistokimyasal analizi ile ilgili olarak, i-TZF grubu için kan pıhtısı ile karşılaştırıldığında daha yüksek bir TGF- β , osteokalsin ve tip I kollajen gen ekspresyonu tespit edilmiştir. 24 saat sonunda, VEGF salınımı, kan pıhtısında i-TZF için kaydedilen değerden daha yüksek bulunmuştur. Kan pıhtısı, 3 ve 10. günde VEGF'yi daha yüksek oranlarda salmaya devam ederken; i-TZF, üçüncü günden sonra VEGF salınımında bir azalma göstermiştir. İ-TZF grubunda OCN antikor ekspresyonu kan pıhtısına göre daha yüksek bulunmuştur. Çalışmanın sonucunda histolojik ve morfolojik analizler, i-TZF'nin trombositler, lökositler, tip I kollajen, osteokalsin ve büyüme faktörlerini içeren üç boyutlu bir fibrin ağı sağladığı ortaya konmuştur (82). Bizim çalışmamızda da i-TZF ilavesi olan gruplar, OCN antikor incelemelerinde i-TZF ilavesi olmayan gruplara göre istatistiksel olarak daha yüksek immunoreaktivite göstermiştir.

Çalışmamızda sticky bone formunun manipülasyonu kolaylaştırdığı, greftin stabilizasyonunu artırdığı ve ölü alan bırakılmadan homojen olarak bölgeye uygulama imkanını sağladığı görüldü. Çalışmamızın klinik, histolojik, histomorfometrik ve immünohistokimyasal bulgularına bakıldığında i-TZF ilavesinin olduğu gruplarda anlamlı şekilde yeni kemik oluşum oranı yüksek bulundu. Çalışma grupları arasında, geç dönemde K+i-TZF grubu yeni kemik oluşum ortalaması olarak en yüksek ortalamaya sahip gruptu (%70,0). Partikül boyutu baz alındığında çalışma grupları arasında anlamlı bir fark bulunamadığı halde; i-TZF ilavesi olan küçük partiküllü greft kullanılan grupların histomorfometrik ve immünohistokimyasal ölçümlerinde yeni kemik oluşumu ortalamaları anlamlı derecede yüksek bulundu. OCN antikor boyamalarında i-TZF ilavesi olan gruplar anlamlı derecede yüksek boyanma gösterdi.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda enjekte edilebilir trombosit zengin fibrinin (i-TZF) farklı partikül boyutundaki sığır kaynaklı kemik greftlerine ilavesi ile sticky bone greft formu elde edilmiştir. Deneyler esnasında sticky bone formunun alıcı bölgeye kolayca taşındığı ve defekte homojen olarak yerleştirilebildiği görüldü.

Çalışmamızda, i-TZF'nin kemik oluşumunu hızlandığı bilgisine dayanarak kemik iyileşmesini erken ve geç dönem olacak şekilde inceledik. Erken dönemde i-TZF ilave edilen küçük partiküllü grubun yeni kemik oranını anlamlı olarak yüksek bulduk. Ancak, partikül boyutundan bağımsız i-TZF ilavesi olan ve olmayan gruplar kıyaslandığında erken dönemde i-TZF ilavesi olan gruplarda yeni kemik oluşumu açısından anlamlı bir fark bulunamadı.

İmmunohistokimyasal inceleme amacıyla VEGF ve OCN antikor skorlarına bakılan çalışmamızda erken dönem iyileşmeye bakıldığında, gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ancak geç dönemde hem VEGF hem de OCN grubunda K+i-TZF grubu yüksek ortalamaya sahipti. İ-TZF ilave edilen gruplarda, literatürdeki çalışmalara benzer olarak OCN skorları daha yüksek olarak bulundu.

Enjekte edilebilir TZF'nin küçük partiküllü kemik greftinde daha etkili sonuçlar verdiği sonucuna ulaştık. Küçük partiküllü greft kullanılan gruplarda yeni kemik ortalamaları büyük partiküllü greft kullanılan gruplara göre daha yüksek olsa da literatürdeki birçok çalışmaya da benzer olarak çalışmamızda, yeni kemik oluşumu ve damarlanma bakımından iki partikül boyutu arasında istatistiksel olarak belirgin üstünlüğü olan bir grup saptamadık. Ancak farklı defekt alanları ve boyutlarıyla birlikte ogmentasyon yöntemine göre bu sonuçların değişiklik gösterebileceğini düşünmekteyiz. Bu noktada partikül boyutu seçiminin; rehabilitasyon gerektiren defekt alanına, büyüklüğüne ve cerrahın tercihine bağlı olarak yapılabileceği sonucuna ulaştık. Bununla birlikte, literatürde farklı partikül boyutlarının kıyaslandığı ve

anlamli olarak farklılık bulunmuş olan çalışmalar göz önünde bulundurulduğunda bu konuda daha çok klinik çalışma yapılması gerektiğı sonucuna varmaktayız.

Çalışmamızda i-TZF ilavesinin farklı partikül boyutlarındaki kemik greft materyallerinde etkinliğini araştırmayı amaçladık. Histolojik ve immunohistokimyasal sonuçlarımız, literatürdeki çalışmalara benzer olarak i-TZF ilavesinin kemik iyileşmesine olumlu etkisi olduğunu gösterdi. Küçük partiküllü grefte ilave edilen i-TZF'nin daha etkin olduğu sonucuna ulaştık.

Hastalardan otolog olarak basit bir teknik ve düşük maliyet ile elde edilebilen, hücre ve büyüme faktörü zenginliği bakımından kemik iyileşmesine olumlu etkileri kanıtlanmış olan i-TZF'nin klinik uygulamalarda daha yaygın kullanılır hale gelmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Klinik olarak da ogmentasyon uygulamalarında, farklı kemik greft materyalleriyle ve çalışma modelleriyle geliştirilebilecek olan bu yöntemin daha çok araştırılmasına ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. McAllister BS, Haghighat K. Bone Augmentation Techniques. J Periodontol. 2007;78(3):377–96.
2. Teitelbaum SL, Tondravi MM, Ross FP. Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption. Vol. 61, Journal of Leukocyte Biology. 1997. p. 381–8.
3. LC J, J C, Kelly R. Temel Histoloji. Aytekin Y, editor. İstanbul: Barış Kitabevi; 1998. 132–146 p.
4. Aykın Ş, Çakmak G, Cila E. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. Türk Ortop ve Travmatoloji Birliği Derneği Derg. 2004;(3):11–24.
5. Tuskan C, Yaltırık M. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateriyaller. İÜ Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul. 2002;19–26.
6. Traini T, Degidi M, Sammons R, Stanley P, Piattelli A. Histologic and Elemental Microanalytical Study of Anorganic Bovine Bone Substitution Following Sinus Floor Augmentation in Humans. J Periodontol. 2008;79(7):1232–40.
7. Simon S, Jensen, Aaboe M, Janner SFM, Saulacic N, Bornstein MM, Bosshardt DD, et al. Influence of particle size of deproteinized bovine bone mineral on new bone formation and implant stability after simultaneous sinus floor elevation: A histomorphometric study in minipigsJense. Clin Implant Dent Relat Res. 2015;17(2):274–85.

8. Leiblein M, Koch E, Winkenbach A, Schaible A, Nau C, Büchner H, et al. Size matters: Effect of granule size of the bone graft substitute (Herafill®) on bone healing using Masquelet's induced membrane in a critical size defect model in the rat's femur. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2020;108(4):1469–82.
9. Miron R, Choukroun J. Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry. 2017. 268 p.
10. Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol*. 2009;27(3):158–67.
11. Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets [Internet]*. 2018;29(1):48–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09537104.2017.1293807>
12. Öncü E, Alaaddinoğlu E. Effect of platelet-rich fibrin on osseointegration. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2013;42(10):1265–6.
13. Ozdemir H, Ezirganli S, Isa Kara M, Mihmanli A, Baris E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Arch Oral Biol [Internet]*. 2013;58(5):537–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.09.018>
14. Ondur E, Balcioglu NB, Tekkesin MS, Guzel O, Ersanli S. Effects of platelet-rich fibrin on hard tissue healing: A histomorphometric crossover trial in sheep. *Materials (Basel)*. 2020;13(7):1–13.
15. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell- Based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679–89.
16. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol*. 2017;88(1):112–21.
17. Oliveira MR, Silva A de C, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Mariano RC.

- Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2015;44(5):649–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2014.12.005>
18. Mourão CF de AB, Valiense H, Melo ER, Mourão NBMF, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: technical note. *Rev Col Bras Cir*. 2015;42(6):421–3.
 19. Gallagher JA, Bowler WB. *Epidermis*. Vol. 1, Expert Opinion on Therapeutic Targets. 1997. 267–269 p.
 20. Fatih H, Md Ç, Sezer N. Kemik Yapısı Ve Kemik Döngüsü Üzerine Bir Derleme A Review Over Bone Structure And Turnover. *Fiz Tıp*. 2002;5(3):177–84.
 21. Kyle H. Vining and David J. Mooney. . and Regeneration. *System* [Internet]. 2017;18(12):30–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41582-019-0280-3>
 22. Decker BC. Peterson ' s principles of oral and maxillofacial surgery , 2 nd edition by Michael. 2016. 2004–2006 p.
 23. Tanrıkulu S, Gönen E. Kırık iyileşmesi. *TOTBID Derg*. 2017;16(6):455–75.
 24. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):4–7.
 25. do Lago ES, Ferreira S, Garcia IR, Okamoto R, Mariano RC. Improvement of bone repair with l-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig*. 2020;24(5):1637–50.
 26. Albrektsson T, Johansson C. and Osseointegration. *J Eur Spine*. 2001;10:96–101.
 27. Torul D. Trombositten zengin fibrin (prf) ve büyüme faktörlerinden zengin plazma (prgf) ' n in hasarlı periferik sinir üzerine etkilerinin deneysel olarak incelenmesi. Doktora Tezi, Dokuz Mayıs Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü, Samsun. 2018;
 28. Simonpieri A, Del Corso M, Vervelle A, Jimbo R, Inchingolo F, Sammartino G, et al. Current Knowledge and Perspectives for the Use of Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF) in Oral and Maxillofacial Surgery Part 2: Bone Graft, Implant and Reconstructive Surgery. *Curr Pharm*

- Biotechnol. 2012;13(7):1231–56.
29. Keating JF, Simpson AHRW, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Jt Surg - Ser B*. 2005;87(2):142–50.
 30. Bosch C. Importance of the Critical-Size Bone Defect in Testing Bone Regenerating Materials. 1998. p. 310–6.
 31. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Evaluation of platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone in the rabbit cranium: A pilot study. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(2):250–7.
 32. Coathup MJ, Cai Q, Champion C, Buckland T, Blunn GW. The effect of particle size on the osteointegration of injectable silicate-substituted calcium phosphate bone substitute materials. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2013;101 B(6):902–10.
 33. Sohn JY, Park JC, Um YJ, Jung UW, Kim CS, Cho KS, et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *J Periodontal Implant Sci*. 2010;40(4):180–7.
 34. Develioğlu H. Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler. *Cumhur Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Derg*. 2003;6(1):60–4.
 35. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 2001;71(6):354–61.
 36. Temmerman A, Cortellini S, Van Dessel J, De Greef A, Jacobs R, Dhondt R, et al. Bovine-derived xenograft in combination with autogenous bone chips versus xenograft alone for the augmentation of bony dehiscences around oral implants: A randomized, controlled, split-mouth clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2020;47(1):110–9.
 37. Ersu B. İmplant Diş Hekimliğinde Kullanılan Ağız İçi Otojen Kemik Greftleri. *Cumhur Üniversitesi Diş Hekim Fakültesi Derg*. 2007;135–40.
 38. Laurencin CT, Jiang T. Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering, 2nd Edition. Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering, 2nd Edition. 2014.
 39. Kaya Y, Doç Y, ŞahİN S. Demineralize Dondurulmuş Kurutulmuş Kemik Allogreftlerinin Periodontal Kemik Defektlerinde Uygulanımı ve Son Gelişmeler Utilization of Demineralized Freezed Dried Bone Allografts in

- Periodontal Bone Defects and Recent Developments. *Rev Lit Arts Am.* 2010;37–45.
40. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(SUPPL.1):125–8.
 41. Alkanan A, Greenwell H, Patel A, Hill M, Shumway B, Lowy J. Ridge Preservation Comparing the Clinical and Histologic Healing of Membrane vs No-Membrane Approach to Buccal Overlay Grafting. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2019;39(5):643–50.
 42. Ghanaati S, Barbeck M, Detsch R, Deisinger U, Hilbig U, Rausch V, et al. The chemical composition of synthetic bone substitutes influences tissue reactions in vivo: Histological and histomorphometrical analysis of the cellular inflammatory response to hydroxyapatite, beta-tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate cer. *Biomed Mater.* 2012;7(1).
 43. Zizzari VL, Zara S, Tetè G, Vinci R, Gherlone E, Cataldi A. Biologic and clinical aspects of integration of different bone substitutes in oral surgery: a literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Internet]. 2016;122(4):392–402. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2016.04.010>
 44. Lim H-C, Zhang M-L, Lee J-S, Jung U-W, Choi S-H. Effect of Different Hydroxyapatite:β-Tricalcium Phosphate Ratios on the Osteoconductivity of Biphasic Calcium Phosphate in the Rabbit Sinus Model. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(1):65–72.
 45. Fairbairn P, Leventis M, Mangham C, Horowitz R. Alveolar ridge preservation using a novel synthetic grafting material: A case with two-year follow-up. *Case Rep Dent.* 2018;2018.
 46. Melcher AH. The use of heterogeneous anorganic bone as an implant material in oral procedures. Melcher AH, Dent HD use Heterog Anorg bone as an Implant Mater oral Proced Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1962;15996-1000. 1962;15:996–1000.
 47. Fernández RF, Bucchi C, Navarro P, Beltrán V, Borie E. Bone grafts utilized in dentistry: an analysis of patients' preferences. *BMC Med Ethics* [Internet]. 2015;16(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12910-015-0044-6>

48. Develioglu H, Unver Saraydin S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J*. 2009;28(4):396–400.
49. Sheikh Z, Sima C, Glogauer M. Bone replacement materials and techniques used for achieving vertical alveolar bone augmentation. *Materials (Basel)*. 2015;8(6):2953–93.
50. Pichotano EC, de Molon RS, de Souza RV, Austin RS, Marcantonio E, Zandim-Barcelos DL. Evaluation of L-PRF combined with deproteinized bovine bone mineral for early implant placement after maxillary sinus augmentation: A randomized clinical trial. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2019;21(2):253–62.
51. Block MS. The Processing of Xenografts Will Result in Different Clinical Responses. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2019;77(4):690–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.joms.2018.10.004>
52. Klüppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R. Bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: A histologic and radiographic study in vivo. *J Craniofac Surg*. 2013;24(4):1074–7.
53. Schwartz Z, Doukarsky-Marx T, Nasatzky E, Goultschin J, Ranly DM, Greenspan DC, et al. Differential effects of bone graft substitutes on regeneration of bone marrow. *Clin Oral Implants Res*. 2008;19(12):1233–45.
54. Solmaz MC, Danışman Tekin U. Tavşanlarda Oluşturulan Kemik Defektlerinde Trombositten Zengin Fibrin Kullanımının Kemik İyileşmesi Üzerine Olan Etkisinin Histopatolojik ve Histomorfometrik Olarak İncelenmesi: Deneysel Çalışma. Doktora Tezi, Ege Üniversitesi Sağlık Bilim Enstitüsü [Internet]. 2014; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2015.03.025><http://dx.doi.org/10.1038/nature10402><http://dx.doi.org/10.1038/nature21059><http://journal.stainkudus.ac.id/index.php/equilibrium/article/view/1268/1127><http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2577>
55. Kekilli E, Yağmur C, Ertem K, Türk B B. Bone Grafts and Nuclear Medicine: Review. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*. 2005;25:261–79.
56. De Godoy RF, Hutchens S, Champion C, Blunn G. Silicate-substituted calcium

- phosphate with enhanced strut porosity stimulates osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med*. 2015;26(1).
57. Bohner M. Silicon-substituted calcium phosphates - A critical view. *Biomaterials* [Internet]. 2009;30(32):6403–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.08.007>
 58. Reffitt DM, Ogston N, Jugdaohsingh R, Cheung HFJ, Evans BAJ, Thompson RPH, et al. Orthosilicic acid stimulates collagen type 1 synthesis and osteoblastic differentiation in human osteoblast-like cells in vitro. 2003;32:127–35.
 59. Shapoff CA, Bowers GM, Levy B, Mellonig JT, Yukna RA. The Effect of Particle Size on the Osteogenic Activity of Composite Grafts of Allogeneic Freeze-Dried Bone and Autogenous Marrow. *J Periodontol*. 1980;51(11):625–30.
 60. Nam J-W, Kim M-Y, Han S-J. Cranial bone regeneration according to different particle sizes and densities of demineralized dentin matrix in the rabbit model. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2016;38(1):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40902-016-0073-1>
 61. Fucini SE, Quintero G, Gher ME, Black BS, Richardson AC. Small Versus Large Particles of Demineralized Freeze-Dried Bone Allografts in Human Intrabony Periodontal Defects. *J Periodontol*. 1993;64(9):844–7.
 62. de Molon RS, Magalhaes-Tunes FS, Semedo C V., Furlan RG, de Souza LGL, de Souza Faloni AP, et al. A randomized clinical trial evaluating maxillary sinus augmentation with different particle sizes of demineralized bovine bone mineral: histological and immunohistochemical analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2019;48(6):810–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2018.09.003>
 63. Kon K, Shiota M, Ozeki M, Yamashita Y, Kasugai S. Bone augmentation ability of autogenous bone graft particles with different sizes: A histological and micro-computed tomography study. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(11):1240–6.
 64. Kheur MG, Kheur S, Lakha T, Jambhekar S, Le B, Jain V. Does Graft Particle Type and Size Affect Ridge Dimensional Changes After Alveolar Ridge Split

- Procedure? *J Oral Maxillofac Surg.* 2018;76(4):761–9.
65. Min S, Liu Y, Tang J, Xie Y, Xiong J, You HK, et al. Alveolar ridge dimensional changes following ridge preservation procedure with novel devices: Part 1 - CBCT linear analysis in non-human primate model. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(1):97–105.
 66. Chackartchi T, Iezzi G, Goldstein M, Klinger A, Soskolne A, Piattelli A, et al. Sinus floor augmentation using large (1-2mm) or small (0.25-1mm) bovine bone mineral particles: A prospective, intra-individual controlled clinical, micro-computerized tomography and histomorphometric study. *Clin Oral Implants Res.* 2011;22(5):473–80.
 67. Testori T, Wallace SS, Trisi P, Capelli M, Zuffetti F, Del Fabbro M. Effect of Xenograft (ABBM) Particle Size on Vital Bone Formation Following Maxillary Sinus Augmentation: A Multicenter, Randomized, Controlled, Clinical Histomorphometric Trial. *Int J Periodontics Restor Dent.* 2013;33(4):467–75.
 68. Zhou X, Zhang Z, Li S, Bai Y, Xu H. Osteoconduction of different sizes of anorganic bone particles in a model of guided bone regeneration. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2011;49(1):37–41.
 69. Matras H. [Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]. *Osterr Z Stomatol.* 1970 Sep;67(9):338–59.
 70. Kingsley CS. Blood coagulation: Evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature.* 1954;173(4407):723–4.
 71. Agrawal AA. Evolution, current status and advances in application of platelet concentrate in periodontics and implantology. *World J Clin Cases.* 2017;5(5):159.
 72. Yoon JS, Lee SH, Yoon HJ. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects. *J Cranio-Maxillofacial Surg [Internet].* 2014;42(7):1071–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2014.01.034>
 73. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral*

- Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(6):638–46.
74. Bernardi S, Mummolo S, Tecco S, Continenza MA, Marzo G. Histological Characterization of Sacco's Concentrated Growth Factors Membrane. *Int J Morphol* [Internet]. 2017 Mar;35(1):114–9. Available from: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-95022017000100019&lng=en&nrm=iso&tlng=en
 75. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Inchingolo F, Charrier JB. Selecting a relevant in vitro cell model for testing and comparing the effects of a Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) membrane and a platelet-rich plasma (PRP) gel: Tricks and traps. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 2010;110(4):409–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.05.056>
 76. Öncü E, Bayram B, Kantarcı A, Gülsever S, Alaaddinoğlu EE. Positive effect of platelet rich fibrin on osseointegration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016;21(5):e601–7.
 77. Panda S, Doraiswamy J, Malaiappan S, Varghese SS, Del Fabbro M. Additive effect of autologous platelet concentrates in treatment of intrabony defects: a systematic review and meta-analysis. *J Investig Clin Dent*. 2016;7(1):13–26.
 78. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thromb Haemost*. 2011;105(SUPPL. 1):13–33.
 79. Shamloo A, Xu H, Heilshorn S. Mechanisms of vascular endothelial growth factor-induced pathfinding by endothelial sprouts in biomaterials. *Tissue Eng - Part A*. 2012;18(3–4):320–30.
 80. Serafini G, Lopreiato M, Lollobrigida M, Lamazza L, Mazzucchi G, Fortunato L, et al. Platelet Rich Fibrin (PRF) and Its Related Products: Biomolecular Characterization of the Liquid Fibrinogen. *J Clin Med*. 2020;9(4):1099.
 81. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: Clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;101(3):56–60.
 82. Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Araújo RF, Vasconcelos RC, Cavalcante RS, et al. Injectable platelet rich fibrin: cell content,

- morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig*. 2019;23(3):1309–18.
83. Choukroun J, Ghanaati S. Reduction of relative centrifugation force within injectable platelet-rich-fibrin (PRF) concentrates advances patients' own inflammatory cells, platelets and growth factors: the first introduction to the low speed centrifugation concept. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2018;44(1):87–95.
 84. Alves R, Grimalt R. A Review of Platelet-Rich Plasma: History, Biology, Mechanism of Action, and Classification. *Ski Appendage Disord*. 2018;4(1):18–24.
 85. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig*. 2017;21(8):2619–27.
 86. Barbeck M, Unger RE, Booms P, Dohle E, Sader R, Kirkpatrick CJ, et al. Monocyte preseeding leads to an increased implant bed vascularization of biphasic calcium phosphate bone substitutes via vessel maturation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2016;(2).
 87. Sohn, Dong Seok, Huang, Bingzhen, Kim, Jin. " Sticky Bone " Use in Implant Dentistry Zirconia Full Arch. *J Implant Clinical Denstistry*. 2015;7(10):10–30.
 88. Min S, Liu Y, Tang J, Xie Y, Xiong J, You HK, et al. Alveolar ridge dimensional changes following ridge preservation procedure with novel devices: Part 1 - CBCT linear analysis in non-human primate model. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2015;26(8):274–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1401058>
 89. Kyryak S, Blatt S, Pabst A, Thiem D, Al-Nawas B, Kämmerer PW. Combination of an allogenic and a xenogenic bone substitute material with injectable platelet-rich fibrin – A comparative in vitro study. *J Biomater Appl*. 2020;35(1):83–96.
 90. Albilal MSc JDMD, Herrera-Vizcaíno CDDS, Weisleder HBs, Choukroun JMD, Ghanaati DMD, PhD SMD. Liquid platelet-rich fibrin injections as a treatment adjunct for painful temporomandibular joints: preliminary results. *Cranio*. 2020 Sep;38(5):292–304.

91. Brkovic BMB, Prasad HS, Rohrer MD, Konandreas G, Agrogiannis G, Antunovic D, et al. Beta-tricalcium phosphate/type I collagen cones with or without a barrier membrane in human extraction socket healing: Clinical, histologic, histomorphometric, and immunohistochemical evaluation. *Clin Oral Investig*. 2012;16(2):581–90.
92. Deeb GR, Tran D, Carrico CK, Block E, Laskin DM, Deeb JG. How Effective Is the Tent Screw Pole Technique Compared to Other Forms of Horizontal Ridge Augmentation? *J oral Maxillofac Surg Off J Am Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2017 Oct;75(10):2093–8.
93. Yang C, Unursaikhan O, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Choi SH. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater*. 2014;102(1):80–8.
94. Joshi CP, D’Lima CB, Karde PA, Mamajiwala. Ridge augmentation using sticky bone: A combination of human tooth allograft and autologous fibrin glue. 2018;(May):113–8.
95. Gülşen U, Dereci Ö. Evaluation of New Bone Formation in Sinus Floor Augmentation with Injectable Platelet-Rich Fibrin-Soaked Collagen Plug: A Pilot Study. *Implant Dent*. 2019;28(3):220–5.
96. Scarano A, Inchingolo F, Murmura G, Traini T, Piattelli A, Lorusso F. Three-dimensional architecture and mechanical properties of bovine bone mixed with autologous platelet liquid, blood, or physiological water: An in vitro study. *Int J Mol Sci*. 2018;19(4).
97. Hatano N, Shimizu Y, Ooya K. A clinical long-term radiographic evaluation of graft height changes after maxillary sinus floor augmentation with a 2:1 autogenous bone/xenograft mixture and simultaneous placement of dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(3):339–45.
98. Fee L. Socket preservation. *Br Dent J [Internet]*. 2017;222(8):579–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.355>
99. Figueiredo A, Coimbra P, Cabrita A, Guerra F, Figueiredo M. Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response. *Mater*

- Sci Eng C [Internet]. 2013;33(6):3506–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2013.04.047>
100. Paknejad M, Rokn AR, Yaghobee S, Moradinejad P, Heidari M, Mehrfard A. Effects of two types of anorganic bovine bone on bone regeneration: a histological and histomorphometric study of rabbit calvaria. *J Dent Tehran Univ Med Sci*. 2014;11(6):687–95.
 101. Kon K, Shiota M, Ozeki M, Kasugai S. The Effect of Graft Bone Particle Size on Bone Augmentation in a Rabbit Cranial Vertical Augmentation Model: A Microcomputed Tomography Study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2014;29(2):402–6.
 102. dos Anjos TLMR, de Molon RS, Paim PRF, Marcantonio E, Marcantonio E, Faeda RS. Implant stability after sinus floor augmentation with deproteinized bovine bone mineral particles of different sizes: a prospective, randomized and controlled split-mouth clinical trial. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2016;45(12):1556–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijom.2016.09.004>
 103. Iida T, Baba S, Botticelli D, Masuda K, Xavier SP. Comparison of histomorphometry and microCT after sinus augmentation using xenografts of different particle sizes in rabbits. *Oral Maxillofac Surg*. 2020;24(1):57–64.
 104. Starch-Jensen T, Jensen JD. Maxillary Sinus Floor Augmentation: a Review of Selected Treatment Modalities. *J Oral Maxillofac Res*. 2017;8(3):1–13.
 105. Xu H, Shimizu Y, Asai S, Ooya K. Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(5):548–55.
 106. Winter GD. Calcification and ossification induced experimentally. *Proc R Soc Med*. 1971 Jun;64(6):645.
 107. Fernández-Medina T, Vaquette C, Ivanovski S. Systematic comparison of the effect of four clinical-grade platelet rich hemoderivatives on osteoblast behaviour. *Int J Mol Sci*. 2019;20(24).
 108. Miron RJ, Chai J, Fujioka-Kobayashi M, Sculean A, Zhang Y. Evaluation of 24 protocols for the production of platelet-rich fibrin. *BMC Oral Health* [Internet]. 2020;20(1):1–13. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12903->

109. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso M Del, Kang BS, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets* [Internet]. 2018;29(2):171–84. Available from: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812>
110. El Bagdadi K, Kubesch A, Yu X, Al-Maawi S, Orlowska A, Dias A, et al. Reduction of relative centrifugal forces increases growth factor release within solid platelet-rich-fibrin (PRF)-based matrices: a proof of concept of LSCC (low speed centrifugation concept). *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2019;45(3):467–79.
111. Miron RJ, Xu H, Chai J, Wang J, Zheng S, Feng M, et al. Comparison of platelet-rich fibrin (PRF) produced using 3 commercially available centrifuges at both high (~ 700 g) and low (~ 200 g) relative centrifugation forces. *Clin Oral Investig*. 2020;24(3):1171–82.
112. Miron RJ, Chai J, Zheng S, Feng M, Sculean A, Zhang Y. A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2019;107(10):2257–71.
113. Thanasrisuebwong P, Kiattavorncharoen S, Surarit R, Phruksaniyom C, Ruangsawasdi N. Red and yellow injectable platelet-rich fibrin demonstrated differential effects on periodontal ligament stem cell proliferation, migration, and osteogenic differentiation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(14):1–12.
114. Thanasrisuebwong P, Surarit R, Bencharit S, Ruangsawasdi N. Influence of fractionation methods on physical and biological properties of injectable platelet-rich fibrin: An exploratory study. *Int J Mol Sci*. 2019;20(7).
115. Abd El Raouf M, Wang X, Miusi S, Chai J, Mohamed AbdEl-Aal AB, Nefissa Helmy MM, et al. Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. *Platelets* [Internet]. 2019;30(2):213–21. Available from: <https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1401058>

116. Taher Abbas Rupawala, Shital Mayank Patel, Naiya Hitesh Shah, Kunj Bhupeshchandra Sanghvi¹, Sanjay Vinubhai Makwana KKB, Yura Y. Efficacy of Sticky Bone as a Novel Autologous Graft for Mandibular Third Molar Extraction Socket Healing - An Evaluative Study. *Ann Maxillofac Surg.* 2020;10(2):335–43.
117. Aydinyurt HS, Sancak T, Taskin C, Basbugan Y, Akinci L. Effects of injectable platelet-rich fibrin in experimental periodontitis in rats. *Odontology* [Internet]. 2021;109(2):422–32. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10266-020-00557-1>
118. Sohn DS. Lecture titled with sinus and ridge augmentation with CGF and AFG,.
119. Chenchov IL, Ivanova V V., Neychev DZ, Cholakova RB. Application of Platelet-Rich Fibrin and Injectable Platelet-Rich Fibrin in Combination of Bone Substitute Material for Alveolar Ridge Augmentation - a Case Report. *Folia Med (Plovdiv).* 2017;59(3):362–6.
120. Melek LN, El Said MM. Evaluation of “Autogenous Bioengineered Injectable PRF – Tooth graft” combination (ABIT) in reconstruction of maxillary alveolar ridge defects: CBCT volumetric analysis. *Saudi J Dent Res* [Internet]. 2017;8(1–2):86–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjdr.2016.10.005>
121. Kapa BP, N.K. S, G.V. G, Mehta DS. Coronally advanced flap combined with sticky bone and i- PRF- coated collagen membrane to treat single maxillary gingival recessions: Case series. *Clin Adv Periodontics.* 2021;1–5.
122. Yuan S, Li Q, Chen K, Mu Z, Chen T, Wang H, et al. Ridge preservation applying a novel hydrogel for early angiogenesis and osteogenesis evaluation: an experimental study in canine. *J Biol Eng.* 2021;15(1):1–11.
123. Delgado-Ruiz RA, Calvo-Guirado JL, Romanos GE. Critical size defects for bone regeneration experiments in rabbit calvariae: Systematic review and quality evaluation using ARRIVE guidelines. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(8):915–30.
124. Deckers MML, Karperien M, Van Der Bent C, Yamashita T, Papapoulos SE, Löwik CWGM. Expression of vascular endothelial growth factors and their

- receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology*. 2000;141(5):1667–74.
125. Zhang J, Yin C, Zhao Q, Zhao Z, Wang J, Miron RJ, et al. Anti-inflammation effects of injectable platelet-rich fibrin via macrophages and dendritic cells. *J Biomed Mater Res - Part A*. 2020;108(1):61–8.

