

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KEMİK DEFİKTLERİNDE LOKAL OLARAK UYGULANAN
GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ-3 İNHİBİTÖRÜ TİDEGLUSİB ile
E-TZF’NİN ETKİNLİKLERİNİN DENEYSEL OLARAK
KARŞILAŞTIRILMASI**

Mehmet Onur MEREY

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Göksele ŞİMŞEK KAYA

2023 – ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**KEMİK DEFİKTLERİNDE LOKAL OLARAK UYGULANAN
GLİKOJEN SENTAZ KİNAZ-3 İNHİBİTÖRÜ TİDEGLUSİB ile
E-TZF’NİN ETKİNLİKLERİNİN DENEYSEL OLARAK
KARŞILAŞTIRILMASI**

Mehmet Onur MEREY

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Göksel ŞİMŞEK KAYA

2023 – ANTALYA
ONAY SAYFASI

Mehmet Onur MEREY tarafından sunulan bu çalışma jürimiz tarafından **oy birliği**
/ **oy çokluğu** ile Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalında Uzmanlık Tezi olarak kabul
edilmiştir./...../.....

İmza

Üye : Prof. Dr. Göksel ŞİMŞEK KAYA
(Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi)

Üye : Doç. Dr. Alper SİNDEL
(Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi)

Üye : Doç. Dr. Cennet Neslihan EROĞLU
(Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi)

Bu tez/...../..... tarih ve/..... sayılı Akademik Kurul kararıyla belirlenen ve yukarıda imzaları
bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Diş Hekimliği Fakóltesi

Kurum Yöneticisi

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Mehmet Onur MEREY

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Göksel ŞİMŞEK KAYA

İmza

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca her alanda desteğini hep yanımda hissettiğim, tecrübelerini ve bilgilerini benden hiçbir zaman esirgemeyen hocam, saygıdeğer Prof. Dr. Göksel Şimşek Kaya başta olmak üzere, çalışma ve öğrenme motivasyonumu sağlamada bana bir eğitmenden çok abi gibi yaklaşan ve emeklerine minnet duyduğum Doç. Dr. Alper Sindel'e, yine eğitimim boyunca desteklerini benden esirgemeyen Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç. Dr. Mehmet Ali Altay ve Doç. Dr. Cennet Neslihan Eroğlu'na, emeklerini asla unutmayacağım çok değerli Öğr. Gör. Uzm. Dt. Öznur Özalp'e, bu tez çalışmasının ilerleyişinde idealist ve öğretici kişiliğiyle çok büyük emekleri olan Doç. Dr. Mahir Kaya'ya, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Havva Serap Toru'ya, birlikte severek görev yaptığım çalışma arkadaşlarıma ve hayatım boyunca beni her yönden destekleyen, başta biricik eşim, meslektaşım olan Araş. Gör. Selen Elif Merey olmak üzere tüm aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Tideglusib, Alzheimer hastalığının tedavisinde kullanılan, kemik iyileşmesini arttırmaya yönelik etkiler gösteren bir glikojen sentaz kinaz 3 (GSK-3) inhibitörüdür. E-TZF ise yüksek miktarda büyüme faktörü içeren yeni nesil bir trombosit ürünüdür. Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak oluşturulan kranial kemik defektlerinin iyilemesinde ksenogreft ile birlikte Tideglusib ve E-TZF'nin etkilerini değerlendirmektir.

Yöntem: Çalışmamızda 40 adet 3 aylık, erişkin dişi Wistar rat kullanıldı. Ratlar randomize olarak her biri 8 adet rat içeren 5 gruba ayrıldı. Ratların kalvaryumunda kritik boyutta (5 mm'lik) kemik defektleri oluşturuldu. Daha sonra defektlere materyaller Grup-1'de Jelatin sünger, Grup-2'de Jelatin sünger+Tideglusib, Grup-3'de Jelatin sünger +Tideglusib+Ksenogreft, Grup-4'de Jelatin sünger+E-TZF+Ksenogreft, Grup-5'de ise Jelatin sünger+E-TZF+Ksenogreft+Tideglusib olacak şekilde uygulandı. Çalışma sonucunda tüm deneklere yüksek doz tiyopental sodyum anestezisi altında ötenazi uygulandı. Kalvaryumdan elde edilen kemik örnekleri kemik iyileşmesinin değerlendirilmesi için histomorfometrik ve radyolojik olarak analiz edildi.

Bulgular: Histomorfometrik incelemelerin istatistiksel analizi sonucunda Grup-1 ile Grup-2 hariç diğer tüm gruplar arasında anlamlı bir fark vardı. ($p<0.05$) Grup-5 ile diğer tüm gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı bir bulunmaktaydı. ($p<0.05$) Radyolojik incelemelerin analizi de histomorfometrik bulguları doğrulamaktaydı.

Sonuç: Bu çalışmadan elde edilen bilgiye dayanarak; kalvarial kemik defektlerinin iyileşmesinde Tideglusib'in tek başına kemik iyileşmesine katkısının olmadığı ancak tideglusible birlikte ksenogreft ve E-TZF kullanımının veya E-TZF ve ksenogreftin birlikte kullanımının kemik iyileşmesi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olabileceği söylenilebilir. Ancak sonuçların doğrulanabilmesi ve klinik uygulamaya aktarılabilmesi için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Anahtar Kelimeler: deneysel kalvaryal defekt modeli, E-TZF, ksenogreft, tideglusib,

ABSTRACT

Objective: Tideglusib is a glycogen synthase kinase kinase 3 (GSK-3) inhibitor used in the treatment of Alzheimer's disease, showing effects to increase bone healing. E-TZF is a new generation platelet product containing high amounts of growth factors. The aim of this study was to evaluate the effects of Tideglusib and E-TZF in combination with xenograft in the healing of experimentally induced cranial bone defects.

Method: In our study, 40 3-month-old adult female Wistar rats were used. Rats were randomly divided into 5 groups, each containing 8 rats. Bone defects of critical size (5 mm) were created in the calvarium of the rats. Then, the materials for the defects were Gelatin sponge in Group-1, Gelatin sponge+Tideglusib in Group-2, Gelatin sponge +Tideglusib+Xenograft in Group-3, Gelatin sponge+E-PRF+Xenograft in Group-4, Group- In 5, Gelatin sponge+E-PRF+Xenograft+Tideglusib was applied. As a result of the study, all subjects were euthanized under high-dose thiopental sodium anesthesia. Bone samples obtained from the calvarium were analyzed histomorphometrically and radiologically to evaluate bone healing.

Results: As a result of statistical analysis of histomorphometric examinations, there was a significant difference between Group-1 and all other groups except Group-2.($p<0.05$) There was also a statistically significant difference between Group-5 and all other groups.($p<0.05$) Analysis of radiological examinations also confirmed the histomorphometric findings.

Conclusion: Based on the information obtained from this study; It can be said that tideglusib alone does not contribute to bone healing in the healing of calvarial bone defects, but the use of xenograft and E-PRF together with tideglusible or the combined use of E-PRF and xenograft may have a positive effect on bone healing. However, further studies are needed to confirm the results and transfer them to clinical practice.

Key words: E-PRF, experimental calvarial defect model, tideglusib, xenograft

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR	v
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	ix
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kemik Doku	4
2.1.1 Kemik Hücreleri	4
2.1.2 Kemikğin Makroskopik Yapısı	10
2.1.3 Kemikğin Mikroskopik Yapısı	11
2.1.4 İntramembranöz ve Endokondral Kemikleşme	12
2.1.5 Kemik İyileşmesi	15
2.1.6 Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler	18
2.2 Trombositten Zengin Ürünler	21
2.2.1 Trombositten Zengin Plazma	22
2.2.2 Trombositten Zengin Fibrin	23
2.2.3 Enjekte Edilebilen Trombositten Zengin Fibrin (E-TZF)	26
2.3. Kemik Greftleri	27
2.3.1. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması	28
2.3.2 Otogreftler	28
2.3.3 Allogreftler	28
2.3.4. Ksenogreftler	29
2.3.5. Alloplastlar	29

2.4. Wnt/β- catenin Sinyal yolağı	29
2.4.1 Glikojen Sentaz Kinaz-3 (GSK-3)	31
2.4.2 Tideglusib	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	34
3.1. Deney Hayvanları	34
3.1.2 Çalışma Grupları	34
3.2. İlacın Hazırlanması ve Uygulanması	34
3.2.1 Tideglusib	34
3.2.2 Jelatin Sünger	35
3.2.2. E-TZF'nin Hazırlanması ve Uygulanması	36
3.2.3. Kemik Grefti	37
3.2.4. Anestezik İlaçların Hazırlanması	38
3.3. Kemik Defektinin Oluşturulması	38
3.4. Operasyon Sonrası Bakım	42
3.5. Radyografik Analiz	42
3.6. Histopatolojik Preparatların Hazırlanması ve Analizi	43
3.7. Histomorfometrik İnceleme	44
3.8. İstatistiksel Analiz	44
4.BULGULAR	45
4.1. Histopatolojik ve Histomorfometrik Bulgular	45
4.2. Radyografik Tarama ve Morfometrik Bulgular	52
5.TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	69
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ	88

SİMGELER ve KISALTMALAR

E-TZF: Enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin

VEGF: Vasküler endotelial büyüme faktörü

TGF- β : Dönüştürücü büyüme faktörü

PDGF: Trombosit zengin büyüme faktörü

TZF: Trombosit zengin fibrin

GSK-3: Glikojen sentaz kinaz

Mm: Mikrometre

IHH: Indian Hedgehog

RUNX2: Runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2

BMP: Kemik morfogenetik protein

PTH: Paratiroid hormonu

Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂: Hidroksiapatit

FGF: Fibroblast büyüme faktörü

TNF- α : Tümör nekroz faktör

IGF: İnsülin benzeri büyüme faktörü

NSAİ: Nonsteroid antienflamatuar ilaç

TZP: Trombosit zengin plazma

CaCl₂: Kalsiyum klorit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

CA: Sitrik asit

RCF: Göreceli santrifüj kuvveti

RPM: Dakikadaki dönme sayısı

L-TZF: Lökositlen zengin trombositlen zengin fibrin

T-TZF: Titanyum trombositlen zengin fibrin

G-TZF: Geliştirilmiş trombositlen zengin fibrin

CACO3: Kalsiyum karbonat

TCP: Trikalsiyum fosfat

LEF-1: Lenfoid bağlayıcı faktör

H&E: Hematoksilen eozin

DBBM: Deproteinize sığır minerali kemiğı

ICC: Sınıf içi korelasyon katsayısı

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Mezenkim Hücresi	5
Şekil 2.2. Osteosit Şeması	11
Şekil 2.3. Epifiz Kemikleşmesi	14
Şekil 2.4. Kemik İyileşmesi	15
Şekil 2.5. Wnt sinyal yolağı osteoblast/osteoklast aktivitesi	31
Şekil 3.1. Tideglusib.....	35
Şekil 3.2. Surgispon(Türkiye) emilebilir hemostatik sünger	36
Şekil 3.3. Santrifüj cihazı(Hettich Eba) ve uygulama protokolü (rpm x süre).....	36
Şekil 3.4. Katkısız plastik tüp.....	37
Şekil 3.5. Ksenogreft.....	37
Şekil 3.6. Cerrahi öncesi çalışma sahasının tıraşlanması	38
Şekil 3.7. Cerrahi öncesi hazırlık ve asepsi.....	39
Şekil 3.8. Asepsi altında insizyon bölgesi ve subperiostal flap kaldırılması	39
Şekil 3.9. Defekt sınırlarının oluşturulması.....	40
Şekil 3.10. 5mm çapta kemik eksizyonu sonrası defekt sahası.....	40
Şekil 3.11. Defekt sahasına Tideglusib eklenmiş ratta(Grup 2) intraoperatif görünüm.....	41
Şekil 3.12. Defekt sahasına E-TZF,Ksenogreft ve Tideglusib eklenmiş rat, İntraoperatif görünüm	41
Şekil 3.13. Postoperatif suture edilmiş rat kalvaryası	42
Şekil 3.14. Radyolusens kemik sahasının sınırları ve bu sahanın alan ölçümü	43
Şekil 4.1. Grup 1 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40).....	45
Şekil 4.2. Grup 2 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40).....	46
Şekil 4.3. Grup 3 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40).....	46
Şekil 4.4. Grup 4 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40).....	47
Şekil 4.5. Grup 5 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40).....	47
Şekil 4.6. Grup 2 yeni kemik yapım alanları mavi, matür kemik alanları sarı ile morfometrik olarak işaretlenmiştir. (H&E , X40)	48

Şekil 4.7. Grup 5 yeni kemik yapım alanları mavi, matür kemik alanları sarı ile morfometrik olarak işaretlenmiştir. (H&E , X40)	48
Şekil 4.8. Pozitif alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları	50
Şekil 4. 9. Negatif alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları	51
Şekil 4. 10. Toplam alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları.....	51
Şekil 4.11. Grup 1 postoperatif radyografik görünüm	52
Şekil 4.12. Grup 2 postoperatif radyografik görünüm	53
Şekil 4.13. Grup 3 postoperatif radyografik görünüm	53
Şekil 4.14. Grup 4 postoperatif radyografik görünüm	54
Şekil 4.15. Grup 5 postoperatif radyografik görünüm	54
Şekil 4. 16. Radyografi ölçümü periferi değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları	56
Şekil 4. 17. Radyografi ölçümü alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları	57

TABLÖLAR

Tablo 3.1. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri ve katsayıları (133).....	44
Tablo 4. 1. Deney ve kontrol gruplarının pozitif ve negatif alan değerleri ile fark analizi sonuçları	49
Tablo 4. 2. Deney ve kontrol gruplarının pozitif ve negatif alan değerlerinin arasındaki farkın ikili gruplar arasında kıyaslanması için yapılan Post Hoc test sonuçları (p değerleri).....	49
Tablo 4. 3. Kemikleşme radyolojik değerlendirme ve olgu grupları arasındaki fark analizi sonuçları	55
Tablo 4. 4. Deney ve kontrol gruplarının kemik ölçüm parametrelerinin arasındaki farkın ikili gruplar arasında kıyaslanması için yapılan Post Hoc test sonuçları (p değerleri)	55



1.GİRİŞ

Kemik, sinerjistik bir şekilde hareket etmesi ve birçok fonksiyona hizmet etmesiyle bilinen, karmaşık yapıya sahip canlı bir dokudur. Bu doku, gelen yüke karşı direnç gösterilmesi, kan hücrelerini oluşturan kemik iliğini barındırması ve vücudun sistemik homeostazisine katkıda bulunması gibi birçok farklı işleve sahiptir. Önemli bir diğer görevi de mineral deposu olmasıdır. Bu özelliği sayesinde iskelete mekanik ve metabolik işlevler kazandırır.(1) Kemik dokusu içinde birçok hücresel bileşen bulundurmaktadır. Bunlar, osteojenik öncü hücreleri, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve kemik iliği hematopoetik elementler başta olmak üzere farklı hücre popülasyonlarına aittir. Çeşitli görevlere sahip olan bu hücreler yıkım ve yapım olaylarını gerçekleştirerek kemik remodellinginin sağlanmasında rol oynarlar.(2, 3)

Fibrin iskelesi, enflamatuvar hücrelerin salınımı ve göç etmesi için bir ortam sağlarken, lökositler çeşitli doku türlerinde rejenerasyonda rol alan faktörlerdir. Bu hücrelerin toplanmasına, yara iyileşmesi için büyük önem taşıyan artmış anjiyogenez ve lenfanjiyogenez eşlik etmektedir.(4) E-TZF'de yer alan lökositlerin antienfeksiyöz etkisi vardır. Lökositler antienfeksiyöz etkilerinin yanı sıra, anahtar immun sitokinlerin salınımı vasıtasıyla immun regülasyonu sağlamaktadır ve bu sayede yara iyileşmesine önemli katkıda bulunmaktadır.(5-7) Ayrıca lökositler kemik rejenerasyonu sırasında birkaç hücre arasındaki hücresel çapraz bağlantıda da yer almaktadır.(8) Trombositten zengin fibrin (TZF), diş çekiminden sonra alveoler kemik atrofisini önleyerek ve yara iyileşmesini destekleyerek soketin korunması amacıyla profilaktik olarak kullanılmaktadır.(9) TZF soket ve defekt bölgelerinde rejenerasyon sürecini geliştirmek ve matur kemik oluşumu sağlamak için kemik greft materyalleri ile birlikte yaygın olarak kullanılmaktadır.(10) Kişiden kişiye değişebilen sistemik sağlık koşulları nedeniyle TZF eldesinde standardizasyon hala sağlanabilmiş değildir. Radyoterapi, kemoterapi, trombositopeni ve anemi gibi kan hastalığı olan bireylerde TZF eldesinde hala güçlükler yaşanmaktadır. Bazı yazarlar TZF membranının bileşiminin yalnızca santrifüjleme yöntemine, hızına bağlı olmadığına, aynı zamanda donör kan bileşimi ile de önemli ölçüde ilişkili olduğuna işaret etmektedir. Yapılan son çalışmalarda, kandaki yüksek şilomikron seviyesinin de TZF eldesini güçleştirildiği görülmüştür.(11) Protokolün her hastada aynı ölçüde sonuç

verememesi bu sistemin en büyük dezavantajlarından. Son yıllarda, düşük hızlı santrifüj yöntemiyle daha az dönme kuvvetine maruz bırakılarak elde edilen fibrinlerin içeriğinin daha rejeneratif olması sağlandı ve bu metotla enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin sistemleri geliştirildi.(12)

Enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (E-TZF), düşük hızda santrifüj prensibi ile çalışmaktadır.(13) Tüplerin daha az santrifüj kuvvetine maruz kalması ile daha fazla lökosit, trombosit ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β) gibi büyüme faktörleri salınımı gerçekleşmektedir.(14) Her cerrahi müdahaleden sonra yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonunda trombosit ve lökositlerin önemli rolü vardır. Bu süreç enflamasyon, proliferasyon ve yeni doku oluşumu dahil olmak üzere birbiriyle örtüşen üç aşamadan oluşmaktadır.(13) Trombositler, yaralanmadan hemen sonra başlangıçta hemostaz için bir tıkaç oluşturmakta ve bu daha sonra bir fibrin pıhtısı ile değiştirilmektedir. Aktive edildikten sonra bu hücreler rejenerasyon sürecinden, vasküler endotelial büyüme faktöründen (VEGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF- β)'den sorumlu olan trombositten türetilen büyüme faktörleri (PDGF'ler) gibi çeşitli sinyal molekülleri salgılamaktadır.(15)

Wnt/ β -katenin yolağı hücre proliferasyonu, sağ kalım, rejenerasyon ve farklılaşma gibi pek çok hücresel süreçte önemli rol oynamaktadır. Bu yolak hücre ölümü, polaritesi, farklılaşması, migrasyonu, çoğalması ve fonksiyonları gibi organ ve dokulardaki büyüme ve gelişmenin çok sayıda aşamasında yer almaktadır. Wnt/ β katenin yolağı embriyolojik gelişim sırasında vücut aksının oluşumunda, doku ve organ gelişiminde rol almaktadır. Bu yolak sadece büyüme ve gelişim aşamasında değil aynı zamanda matur iskeletin sürdürülmesinde de kritik bir role sahiptir. β -katenin proteini ise bu yolağın ana komponentidir.(16-18) β -Katenin bağımlı kanonik Wnt sinyali, kemik yapımında görev alan osteoblastların ve kemik yıkımında görev alan osteoklastların farklılaşmasını kontrol ederek kemik metabolizmasında önemli bir rol oynamaktadır.(16, 19) β katenin osteoblastlar üzerindeki mezenkimal prekürsör hücrelerin farklılaşması(20) ve osteoblastların yaşamını sürdürebilmesi için gereklidir.(21) β katenin osteosit canlılığını koruyarak kemik homeostasi ve mekanotransdüksiyonunda etkili olan bir ana

moleküldür.(19) Bir çalışmada Li ve arkadaşları, Wnt sinyalinin osteotomi bölgesinde kemik iyileşmesi, kemik kalitesi ve implant osseointegrasyonu üzerinde olumlu etkiye sahip olduğunu rapor etmiştir.(22) Chen ve arkadaşları, lityumun β katenini aktive ederek kemik oluşumunu arttırdığını ve bu yüzden kırık iyileşmesinde faydalı olabileceğini öne sürmüşlerdir.(23)

Glikojen sentaz kinaz-3 (GSK-3), doku iyileşmesi yolağında önemli bir role sahiptir. Tideglusib, Wnt/ β katenin yolağında kritik regülatör olan GSK-3 aktivitesini baskılamaktadır.(22, 24) Tideglusib, Alzheimer hastalığında ve progresif supranükleer palsinin tedavisinde kullanılmak için geliştirilmiş bir ilaçtır.(25) Tideglusib'inin diş hekimliği alanında kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalar kısa süre önce başlamış olmasına rağmen, büyük bir ilgi görmüştür.(26-29) Neves ve ark.(28), yaptıkları bir *in vivo* çalışmada, Tideglusib'in yaralanmış pulpa dokusunda tersiyer dentin oluşumuna katkı sağlayacağını öne sürmüşlerdir. Neves ve arkadaşları(28), Tideglusib'in bu etkisini çeşitli mekanizmalarla önlediğini göstermiş ve Wnt/ β katenin yolağının bu mekanizmalardan bir tanesi olduğunu öne sürmüşlerdir. Alaohali ve ark.(27), yaptıkları bir *in vitro* çalışmada hidrojel formunda uygulanan GSK-3 inhibitörünün dentinogenezisi indüklediğini öne sürmüşlerdir. Alpan ve ark. (29), deneysel olarak oluşturdukları kemik defektinde lokal olarak uygulanan Tideglusib'in kemik rejenerasyonu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir.

Bildiğimiz kadarıyla, literatürde Tideglusib'in kemik doku rejenerasyonu üzerindeki etkilerini değerlendiren oldukça sınırlı sayıda çalışma mevcuttur.(27-29) Diğer yandan, E-TZF ve Tideglusib'in kemik rejenerasyonu üzerindeki etkilerini karşılaştıran, birlikte kullanıldıkları zaman oluşan etkiyi değerlendiren herhangi bir çalışma yoktur. Ayrıca, hem E-TZF hem de Tideglusib'in tek başına veya greftle birlikte kemik iyileşmesi üzerindeki etkileri halen daha tam olarak bilinmemektedir. Bu yüzden bu çalışmanın amacı E-TZF ile Tideglusib'in tek başına veya greftle birlikte kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Doku

Kemik, çok sayıda fonksiyona hizmet etmesiyle bilinen ve sinerjistik bir şekilde hareket eden, karmaşık yapıya sahip canlı bir dokudur. Bu doku, gelen yüklere karşı direnç gösterilmesi, kraniyal ve torasik kavitelerdeki hayati organların kuvvetlere karşı korunması, kan hücrelerini oluşturan kemik iliğini muhafaza etmesi ve vücudun sistemik homeostazisine katkı sağlaması gibi birçok farklı işleve sahiptir. Kemik dokusunun bir görevi de mineral deposu olmasıdır. Kalsiyum, fosfat, magnezyum gibi önemli iyonları depolamakta ve bu iyonların vücut sıvılarındaki sabit konsantrasyonlarını korumak için kontrollü bir salınım yaparak önemli depo görevi görmektedir.(30) Kemik dokusu içerdği bu mineraller sayesinde vücutta bir kaldırma sistemi oluşturarak, iskelet kası kasılmaları sırasında oluşan kuvvetleri arttırabilir ve bu kasılmaları vücut hareketlerine dönüştürebilir.(31) Bu özelliği ile iskelet yapıya mekanik ve metabolik işlevler kazandırır. Kemik metabolizmasında biyokimyasal, hormonal, hücrel ve biyomekanik başta olmak üzere birçok faktör etkilidir. Bu faktörler kemiğin özelliklerini ve kalitesini belirlemede önemli rol oynamaktadır.(1) Kemik dokusu aynı zamanda yüksek rejenerasyon kapasitesine sahiptir.(32) Kemik, ekstraselüler matriksi kalsifiye olmuş rijit, özel bir bağ dokusudur.

2.1.1 Kemik Hücreleri

Kemik dokusu içinde birçok hücrel bileşen bulundurmaktadır. Bunlar; osteojenik öncü hücreleri, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve kemik iliği hematopoetik elementler başta olmak üzere farklı hücre popülasyonlarına aittir. Bu hücreler kemik homeostazisinde önemli rol oynamaktadır.(33, 34)

Osteoprogenitör Hücreler

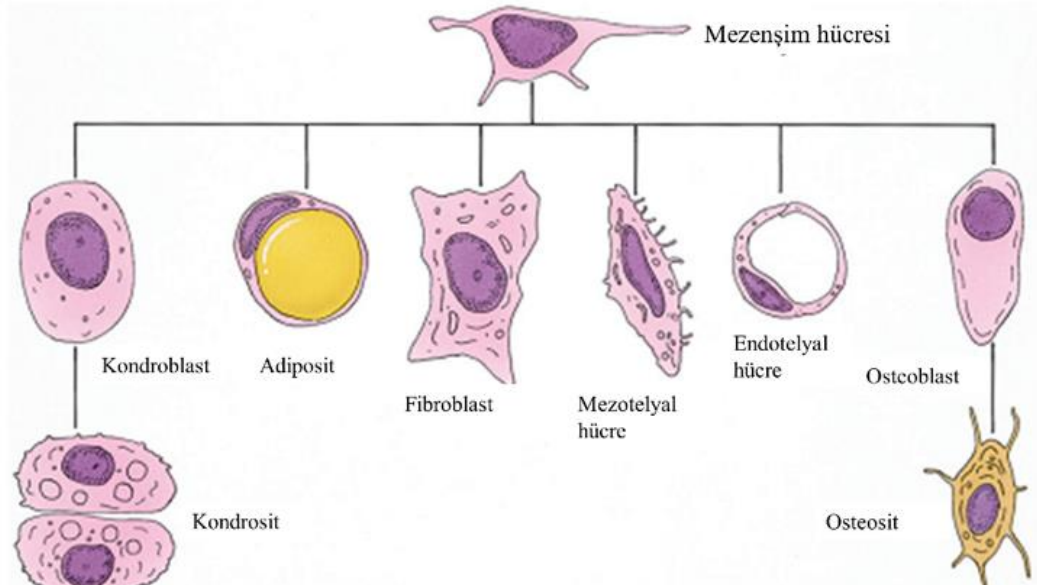
Osteoprogenitör hücreler, kemiğin esas hücreleridir. Oval yapıda çekirdeklere sahip olup, yassı yapıdadırlar.(34) Bu hücreler, kökenlerini mezenkimden aldıkları için mezenkimal kök hücreleri olarak adlandırılırlar.(Şekil 2.1) Endosteum ve periosteum kemik yüzeyindeki zarlar olarak tanımlanır ve bu hücreler bu bölgelerde bulunurlar. Bu hücreler,

gelişimlerini tamamladıktan sonra kemikte aktif bir role sahip olmazlar ve normal şartlar altında pasif hale geçerler. Ancak kemikteki bir hasar ya da yaralanma, internal rezorpsiyon ya da kırık iyileşmesi gibi durumlarda tekrar aktive olurlar.(2, 3)

Osteoblastlar

Osteoblastlar, osteoprogenitör hücrelerden gelişen kemik oluşumundan sorumlu birincil hücrelerdir. Bu hücreler, organik kemik matriksinin sentezlenmesi ve mineralizasyonunun kontrol edilmesi, kemik mineralizasyonuna yardımcı olma ve kalsiyum ve fosfat metabolizmasının düzenlenmesi gibi birçok önemli işlevi gerçekleştirirler.(35) Osteoblastlar, kemik matriksinin organik bileşenleri olan proteoglikanlar, glikoproteinler, tip 1 kollajen ve osteonektin gibi maddelerin sentezinden sorumludur.(30, 31)

Osteoblastlar, genellikle yan yana sıralanmış ve aktif organik kemik matriksinin sentezlendiği kemik yüzeylerinde bulunurlar. Osteoblastların görünümü, epitelium benzeri bir tabakayı andırır. Ayrıca osteoblastlar, kemik örtü hücreleri ve osteositler olarak iki farklı hücre tipine farklılaşabilirler.(36)



Şekil 2.1. Mezenkim Hücresi

Osteoblastlar, genellikle 20-30 mikrometre (mm) apındadır ve içerdikleri organeller arasında endoplazmik retikulum, golgi cisimciği, mitokondri, çekirdek ve kollajenle dolu salgı kesecikleri bulunur. Ayrıca, hücre uzantıları sayesinde diğer hücrelerle iletişim kurabilirler.(35) Osteoblastlar, sadece organik ve inorganik kemik matrikslerinin sentezinde değil, aynı zamanda diğer hücrelerle iletişim kurarak kemik remodelasyon sürecinde de önemli rol oynarlar. Bu süreçte, kollajen, non-kollajen matriks proteinleri, sitokinler, büyüme faktörleri, alkali fosfotaz, prostaglandin, nötral proteaz gibi mediyatörleri üretilirler.(35) Osteoblastlar g ve proliferasyon kapasitesinden yoksun, tamamen farklılaşmış hücrelerdir. Kemik oluşumu için öncelikle, Indian Hedgehog (IHH) geninin runt ile ilişkili transkripsiyon faktörü 2 (RUNX2) geniyle ekspresyonu gereklidir. Daha sonra, farklılaşmamış mezenkimal progenitör hücreler ve osteoprogenitör hücreler bölgeye göç ederek osteoblastların oluşumunu ve çoğalmasını sağlarlar.(37)

Osteoprogenitör hücreler, proliferasyon kapasitesine sahip ve osteoblastlara farklılaşabilen hücrelerdir. Bu hücreler, kemik iliği, endosteum ve periosteumda yer almaktadır. Osteoblastların oluşumu, osteoindüktif ve osteogenetik büyüme faktörlerinin salınması sonucu osteoprogenitör hücrelerden farklılaşmasıyla gerçekleşir. BMP, trombosit kaynaklı büyüme faktörleri gibi osteoindüktif ve osteogenetik faktörler örnek olarak verilebilir. Aktif matriks sentezi sırasında, osteoblastlar sütün veya kübik şekil alır ve bazofilik sitoplazmaya sahip olup protein sentezleyen hücrelerin yapısına benzer. Matriks aktivitesi azaldığında, osteoblastlar düzleşir ve sitoplazmik bazofil miktarı azalır. Osteoblastların bu aktivite periyodu, paratiroid hormonu (PTH) tarafından uyarılmaktadır.(38, 39)

Osteoblastlar, polarize özellik gösteren hücrelerdir. Yeni kemik dokusu, hücre yüzeyinden salgılanarak eski kemik matriksi ile temas eden bölgede oluşur. Oluşan yeni osteoblast tabakası ile daha önceden oluşan kemik tabakası arasında immatür bir doku olan osteid bulunur. Osteoblastlar tarafından salgılanan polipeptit yapılı osteokalsin, glikoproteinlerle birlikte Ca^{+2} iyonlarını bağlayarak lokal konsantrasyonlarını arttırır. Alkalen fosfataz ve fosfat iyonlarının lokal konsantrasyonlarının arttırılması da osteoblastlar tarafından gerçekleştirilir. Bu sayede, her iki iyonun yüksek konsantrasyona ulaşması, matriks kalsifikasyonunda ilk adım olan hidroksiapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ kristallerinin

oluşmasını başlatır. Daha fazla minerallerin birikmesiyle hidroksiapatit kristalleri hızla büyür ve kollajen fibrilleri ve proteoglikanları içeren birleşmiş kalsifiye madde kütlesi oluşur.(40, 41)

Osteositler

Osteoblastların kendi salgıları ile çevrelenerek mineralize kemik matriksi içinde hapsolması sonucu osteositler meydana gelir. Osteoblastların muhafaza edildiği alana laküna adı verilir ve osteoblastlar bu alanlarda organellerin çoğunu kaybederek yıldız şeklinde hücrelere dönüşerek osteosit haline gelirler. Bu dönüşüm sırasında hücreler, birçok sitoplazmik uzantı oluşturur ve bu uzantılar kalsifiye matriks tarafından sarılır. Osteositlerin meydana getirdiği bu uzantılar, dendritler olarak bilinmekte ve kanaliküli adı verilen silindirik kapalı bölmeler boyunca uzanmaktadır. Kanaliküller sayesinde kemik metabolik faaliyetleri için ihtiyaç olan molekül ve iyonların transferi sağlanmaktadır.(42)

Dendritler, komşu osteositlerle temas kurarak kan damarlarının yanı sıra farklı bölgelere de yayılabilir. Her osteosit ve onun sitoplazmik süreçleri, bir boşluğu ve çevredeki yedi kanalikülleri doldurur. Komşu hücrelerin uzantıları, boşluklu bağlantı noktaları aracılığıyla temas kurar ve bu bağlantı noktaları aracılığıyla hücreden hücreye aktarılır. Boşluklu bağlantıları yoluyla yapılan bu değişim, bir zincirdeki yaklaşık on hücre için besin sağlayabilir. Osteositler ve kemik matriksi arasında bulunan küçük hücre dışı sıvı, osteositler ve kan damarları arasındaki moleküler alışverişi kolaylaştırır. Osteositler, mekanik sinyalleri biyokimyasal araçlara dönüştürebilir, böylece anabolik ve katabolik süreçlerin düzenlenmesine yardımcı olur. Bu düzenleme, osteositlerin kan kalsiyum homeostazının düzenlenmesine katılmasına ve kemik üzerindeki mekanik yükü algılamasına izin verir. Daha sonra, osteositler bu bilgiyi osteoblast ve osteoklast fonksiyonunu düzenleyen kemikteki diğer hücrelere aktarırlar.(43, 44)

Osteositler, granüllü endoplazmik retikulum ve golgi cisimciklerinin osteoblastlara kıyasla belirgin bir şekilde azaldığı, ancak nükleer kromatin yoğunluğunun çok daha fazla olduğu hücrelerdir. Yassı ve badem şeklinde olan osteositler, kemik matriksinin

sürekliliğinin sağlanmasında önemli bir rol oynarlar ve osteoklastların kontrolü altında apoptoza uğrarlar. Bu hücrelerin ölümü, matriksin rezorpsiyonu ile sonuçlanır. Çeşitli kemik hastalıkları ve bozuklukları, osteosit-laküna-kanaliküler sistemin düzenlenmesini etkileyerek hücresel ağda önemli değişikliklere neden olabilir.(42)

Matür kemikte en çok bulunan hücre tipi, osteositlerdir. Ancak yaşlanma, östrojen hormonunun azalması ve glukokortikoid yapılı hormonların artması gibi durumlarda osteositlerin sayısı azalmaktadır.(45) Osteositler, kemikteki diğer hücre tiplerine dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Bu hücreler, bazı durumlarda lakünlerden dışarı çıkarak dinlenme halindeki osteoprogenitör hücrelere dönüşebilirler. Osteoprogenitör hücreler de gerektiğinde osteoblastlara dönüşebilirler.(46)

Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik dokusunun yıkımından sorumlu dev hücrelerdir ve sitoplazmalarında bol miktarda lizozom, mitokondri ve golgi cisimcikleri bulunur. Bu organeller, Howship lakünası içinde yer alır. Osteoklastlar, fonksiyonlarına göre aktif veya pasif durumda bulunabilirler ve kemik matriksindeki organik ve inorganik yapıları çözerek etki gösterirler. Kemik rezorpsiyonu, aktif osteoklastlar aracılığıyla gerçekleştirilir. Aktive osteoklastlar, rezorbe olacak kemik yüzeyine doğru parmaksı uzantılar yaparak asit ve proteolitik enzimler salgırlar. Bu salgılar aracılığıyla organik matriks ve kemik tuzları çözülerek kemik rezorpsiyonu gerçekleştirilir.(47)

Kemik remodelinginde, kalsitonin ve parathormon gibi hormonlar ve sinyal faktörleri tarafından osteoklast aktivitesi kontrol edilir. Kalsitonin, osteoklastlar üzerindeki reseptörlere direkt olarak bağlanarak etkisini gösterirken, parathormon osteoblastlar üzerinden etki eder. Aktive olan osteoblastlar, osteoklast uyarıcı faktör adı verilen bir sitokin salgılayarak rezorpsiyona neden olurlar. Bu sayede, osteoblastlar ve osteoklastlar koordineli bir şekilde çalışarak kemik remodelingini gerçekleştirirler.(37, 38)

Kemik Matriksi

Kemik dokusu, mineralize bir bağ dokusu olarak organik ve inorganik bileşenlerden meydana gelir. Bu dokuda, yüksek oranda farklılaşmamış hücreler bulunur. Kemik

matriksinin yaklaşık %30-35'i organik yapıdan oluşur. Organik yapı %90 oranında tip 1 kollajenden, %10 oranında ise kollajen olmayan proteinler, proteoglikanlar, glikoproteinler, karbonhidratlar ve lipitlerden meydana gelir.(36)

Organik matrikste kollajenin yanı sıra kondroitin sülfat, keratan sülfat ve hyaluronik asit gibi glikozaminoglikanlar ve glikoproteinler de yer almaktadır. (46)

Kemik matriksinin organik kısmı, osteoblastlar tarafından sentezlenerek oluşur ve bu mineralize olmamış kısım osteoid olarak adlandırılır. Organik kısımda bulunan kollajen liflerin arasına, kalsiyum ve fosfat iyonları çökerek hidroksiapatit kristalleri meydana gelir. Hidroksiapatit kristallerinin birleşmesi ve yeni matriks sentezi ile birlikte olgunlaşma dönemi başlar. Bu süreç, minerallerin yayılması ve matriksin tamamen mineralize olması için birkaç ay sürer. Kollajen olmayan proteinler, minerallerin yayılmasına ve matriksin tamamen mineralize olmasına yardımcı olur. Mineralize olmuş osteoid yapısı, yük taşıma kapasitesi, organları koruma özelliği ve sistemik mineral depolama fonksiyonları gibi özellikler kazanır.(36)

Kemik dokusunun inorganik kısmı, yaklaşık olarak kemik ağırlığının %65'ini oluşturmaktadır. Bu kısım, özellikle kalsiyum ve fosfat iyonlarından oluşmaktadır. Bunların yanı sıra, bikarbonat, magnezyum, potasyum, sodyum, sitrat gibi diğer elementler de bulunabilir. İnorganik matriks içerisindeki kalsiyum ve fosfat iyonları, birleşerek $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ formülüne sahip hidroksiapatit kristallerini oluşturur. Kemikteki kalsiyum(%99), sodyum (%25), magnezyum ve potasyum inorganik matrikste bulunur.(45)

Kemik matriksi, mineralize bir bağ dokusu olarak organik ve inorganik bileşenlerden oluşmaktadır. İçeriğinde yüksek oranda kollajen bulunması nedeniyle asidofilik bir yapıya sahiptir. İnorganik minerallerin kollajen matriks ile birleşmesi, kemik dokusunun sertliğinin ve direncinin oluşmasını sağlar. Kemik dokusu dekalsifiye olduktan sonra bile şeklini korumaya devam eder ve tendon kadar esnek hale gelir. Kemik matriksinin organik kısımlarının, özellikle kollajenin çıkarılması, kolayca kırılabilir ve rezorbe edilebilir hale getirir, ancak orijinal şeklini korumaya devam eder.(45)

Periosteum ve Endosteum

Kemik, iç ve dış yüzeylerini oluşturan periosteum ve endosteum adlı vaskülarize bağ dokusu ile kaplı bir dokudur. Bu tabakalar hücresel katmanlar içeren bağ dokusu tabakalarıdır.

Periosteum, iç ve dış tabakalardan oluşur. İç tabaka hücresel açıdan zengin, gevşek bir yapıdadır ve osteoblastlara dönüşebilme potansiyeli taşır. Dış tabaka ise daha sıkı bağ dokusundan oluşmakta olup, hücrelidir. Periosteum ve kemik dokusu arasındaki bağlantıyı sağlayan çok sayıda kan damarı bu dış tabakada mevcuttur. Sharpey lifleri olarak bilinen kalın kollajen lifler, periosteumun dış tabakasından çıkarak kemik matriksine tutunarak periosteum ve kemik matriksini birleştirir.(46, 48)

Endosteum, kemik iliği stromasının çevresinde bulunan ince bir tabakadır. Kemik üretim potansiyeline sahip olsa da, periosteumdan daha ince bir yapıdadır. Endosteum, kemikte bulunan boşlukları tamamen örter, bunlar arasında Volkmann kanalları, Havers kanalları ve süngerimsi kemik iliği boşlukları bulunur. Endosteum, tek katlı yassı hücrelerden oluşur ve bağ dokusu fibrilleriyle ilişkilidir.(46)

2.1.2 Kemik Makroskobik Yapısı

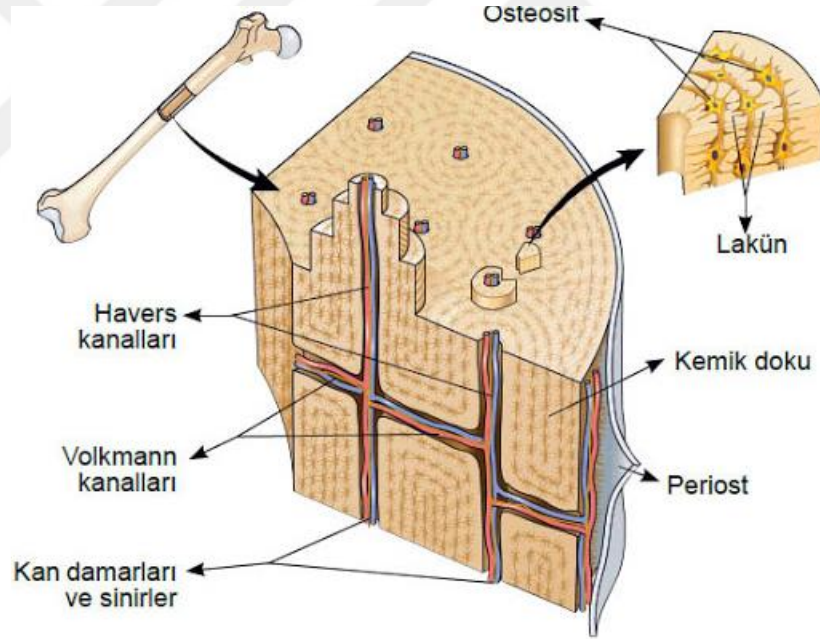
Kemik dokusunun temel işlevi, canlıların iskelet sistemi ile kaslarına destek olmaktır. Bunun yanı sıra, kemik dokusunun farklı görevleri de bulunmaktadır. Bu görevler arasında kas tendonlarının tutunmasını sağlayarak organizmanın hareketine yardımcı olmak, fonksiyon sırasında iletilen kuvvetleri absorbe ederek dağıtmak, hayati organları korumak, hematopoetik sistem hücrelerinin üretimini sağlamak ve organizmanın kalsiyum ve fosfor dengesini korumak yer almaktadır.(49) Kemik dokusu, dış dokusundan sonra vücuttaki en sert dokudur. Kemik dokusu, yaşam boyunca remodellinge uğrayan canlı ve dinamik bir dokudur ve çok dayanıklı ve sert olmasına rağmen aşırı kullanımda hipertrofiye uğrayabilirken, fonksiyonda olmadığı anda atrofiye uğrayarak küçülebilir.(49)

Kemik dokusu makroskobik olarak incelendiğinde, sert (kompakt) kemik ve süngerimsi (spongiyöz) kemik olarak iki ana kategoriye ayrılır. Süngerimsi kemik, daha yumuşak ve esnek yapıda olan düzensiz kemik trabeküllerinden oluşan ve kemik iliği içeren bir yapıdır

Kompakt kemikteki lakünler, kemik hücreleri olan osteositleri barındırmaktadır. Kompakt kemik aynı zamanda kemiğın uzun yüzeylerinde, diğ r bir deyişle diafiz bölgesinde bulunmaktadır ve kemik çevresinde koruyucu bir kabuk görevi görür. Kompakt kemik, kemik üzerine gelen kuvvetleri yayar ve kemiğ  güçlendirir.(49)

2.1.3 Kemiğın Mikroskopik Yapısı

Havers kanalları, dikey yönde seyreden kanallar olup kemik dokusundaki kan damarlarını içermektedir. Volkman kanalları ise kemik dokusunda yatay yönde seyreden kanallardır ve Havers kanalları ile kesişerek kan damarlarını kemik yüzeyine doğ r taşır.(46, 50, 51)



şekil 2.2. Osteosit şeması

Kemik lamelleri, kemik dokusunu oluşturmaktadır. Bu lameller, paralel olarak birbiri üzerine dizilim gösterir ve bu diziliş sert ve süngerimsi kemikte farklılık göstermektedir. Sert kemiğın i erdiğ  lameller 3 farklı tipte görülür. Bunların  oğ  Havers kanallarının etrafını saran i  içe geçmiş halkalar şeklinde bulunurlar. Havers kanalı ve onun etrafını saran 4-20 adet lameller birleşerek silindirik şekilli Havers sistemini oluşturur.(46, 50) Bu

silindirik yapıya osteon da denilmektedir. Havers sistemi, sert kemik yapısının temel birimidir. Bu sistemin aralarında bulunan alanlar, interstiyel sistem (ara lamel sistemi) olarak adlandırılır ve farklı büyüklükte, düzensiz, köşeli kemik alanları şeklinde bulunur.(46, 51) Havers sistemi ve interstiyel sistemin sınırı keskin bir çizgi ile belirginleştirilir. Bu çizgi yapıştırıcı çizgi olarak anılır. Sert kemiklerin dış ve iç yüzeyleri, çembersel lameller adı verilen üçüncü bir tür lamel tarafından sarılır. Çembersel lameller periost ve endosteumun hemen altında yer alır ve kemik gövdesinin dış ve iç yüzünde iç içe daireler şeklinde uzanırlar.(46) (Şekil 2.2.)

Süngerimsi kemik, ince trabeküllerden meydana gelir ve lameller düzensiz bir yapı sergiler. Bu kemikteki Havers ve Volkmann kanalları sert kemikteki kadar yoğun değildir. Beslenme ise endosteum tarafından kanaliküler yoluyla sağlanır.(46) Kemik dokusu, primer ve sekonder kemik olmak üzere iki kategoriye ayrılır. İlk kemik dokusu, embriyolojik gelişimde ve kırık tamirinde görülen immatür özelliklere sahip olan geçici bir yapı olan primer kemik dokusudur. Bu kemik dokusu, non-lamellar özellikleri ile karakterizedir. Zamanla, olgunlaşmış lameller yapıya sahip sekonder kemik dokusu yerini alır.(50)

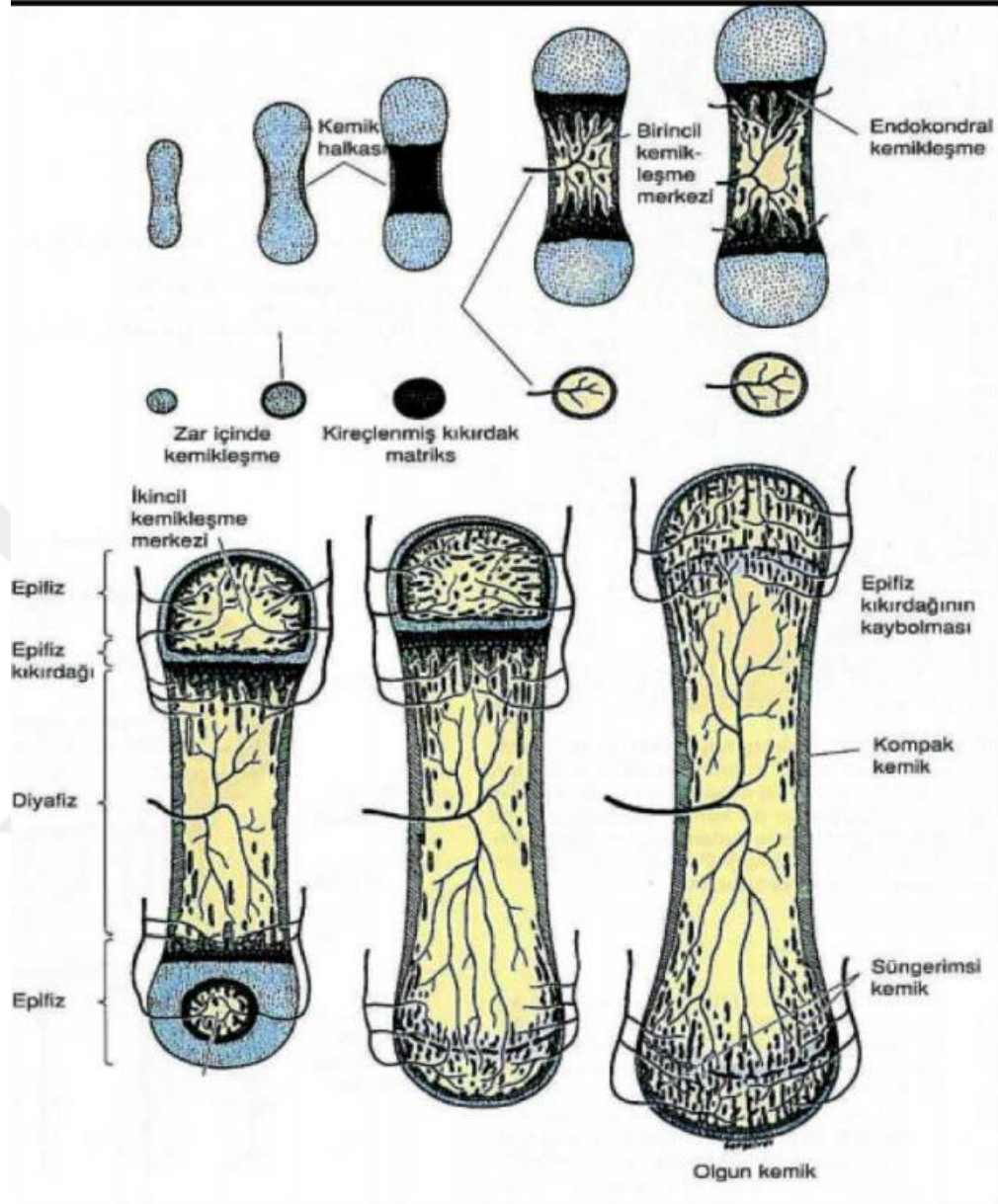
2.1.4 İntramembranöz ve Endokondral Kemikleşme

Embriyoda meydana gelen kemik oluşumu iki farklı şekilde tanımlanabilir: intramembranöz kemikleşme ve endokondral kemikleşme. Direkt bağ dokusundan meydana gelen kemikleşme intramembranöz kemikleşme ile gerçekleşirken, ortamda bulunan kıkırdak dokusundaki hücrelerin farklılaşmasıyla gerçekleşen kemikleşme endokondral kemikleşme ile gerçekleşir. Bazı durumlarda ise ektopik kemik oluşumu gözlemlenebilir. Ektopik kemik oluşumu, patolojik durumlarda kemik dokusu dışındaki dokularda da kemik oluşumunun meydana gelmesidir.(50)

İntramembranöz kemikleşme; mezenkim kökenli yoğun embriyonel bağ dokusunun içinde oluşmaya başlar.(52) Kemik yapım bölgelerinde, mezenkim hücreleri yoğunlaşarak sitoplazmik uzantıları aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurarlar. İnce kollajen fibriller, hücreler arasındaki boşlukları doldurarak ilk kemik trabeküllerinin oluşumunu sağlarlar.

İlk trabeküllerde damarlar dallanır ve birbirleriyle anastomoz yaparak ağısı bir yapı oluştururlar. Aynı zamanda, çevredeki bağ dokusunda da değişiklikler meydana gelir. Bağ dokusu hücreleri trabeküllerin yüzeylerinde biriktikçe büyüyüp genişler ve sonuçta osteoblastlar oluşur.(52) Bu dönüşüm tamamlandıktan sonra osteoid madde mineralize olmaya başlar ve mineralizasyon gerçekleştikçe lakünalar içinde bulunan osteoblastlar oluşur ve kemikleşme süreci başlar.(53) Kemik üniteleri, kemikleşme merkezinden periferiye doğru yer değiştirerek büyürler ve bu süreçte trabeküller ağ şeklinde yapılanarak kansellöz kemiği oluştururlar. Frontal, parietal, oksipital, temporal ve mandibular kemiklerin bazı kısımları ile maksiller kemiğin tamamı intramembranöz olarak kemikleşirler.(34)

Endokondral kemikleşme, kıkırdak dokusundaki hücrelerin farklılaşması ile oluşur. İlk olarak, hyalin kıkırdak yapısında bir taslak oluşur. Bu taslak, apozisyonel büyüme gerçekleştirerek uzunluğunu artırır ve bunun sonucunda diafiz ve epifizler oluşur. Kondrositler, kıkırdak matriksini rezorbe ederek trabeküllü kıkırdak matriksini oluştururlar. Periost, oluşan matriks üzerine ince bir tabaka yeni kemik dokusu ekler ve mezenkim dokusu ve kan damarları çoğalmaya başlar. (35) Ağısı kemik zaman geçtikçe mineralize hale gelir ve kalsifiye kemiği oluşturur.(35, 36) (Şekil 2.3.)



Şekil 2.3. Epifiz Kemikleşmesi

Tibia, humerus, femur gibi uzun kemikler, yassı kafa kemikleri ve mandibular kondil endokondral olarak kemikleşmektedir.(35, 36)

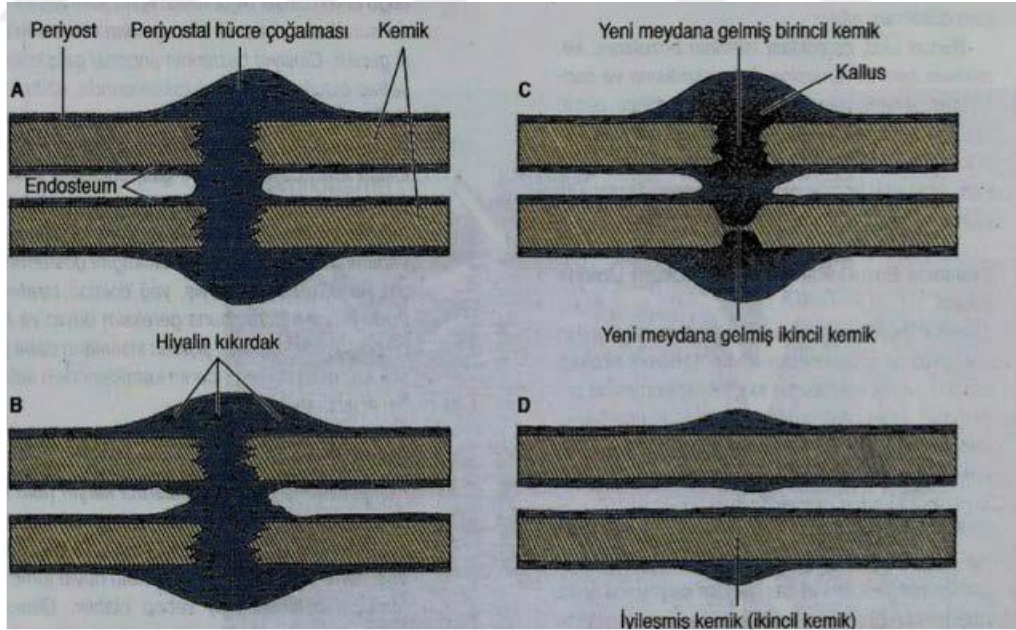
Kemik fonksiyona başladıkça remodellinge uğrar. Bununla birlikte kompakt yapıda bir dış tabaka ve kansellöz yapıda iç tabaka oluşur. Yaşlanma süreciyle birlikte, kemik

merkezi rezorbe olur. Bu süreçte, kemik dokusu yıkılmakta ve kemik iliği tarafından doldurulmaktadır. Kemikteki bu yapısal değişim, yaşam boyu devam eden remodeling süreci olarak adlandırılmaktadır.(35, 36)

2.1.5 Kemik İyileşmesi

Kemik dokusu, sürekli kuvvete maruz kalması ve vücudun kalsiyum depolama işlevi nedeniyle yapısal ve işlevsel olarak dinamik bir doku olarak kabul edilir. Bu dinamik özelliği sayesinde, kemik dokusu yıkım yaşadığında tekrar yapılanarak iyileşme sağlanabilir. Kemik iyileşmesi, klinik açıdan ayırt edilmesi zor ancak histolojik olarak tanımlanabilen dört aşamadan oluşmaktadır.(37) (Şekil 2.4.)

- İnflamasyon Fazı
- Yumuşak Kallus (Granülasyon) Fazı
- Sert Kallus fazı
- Yeniden Şekillenme (Remodeling) Fazı



Şekil 2.4. Kemik İyileşmesi

İnflamasyon Fazı

Kemik travması sonrasında ilk olarak, ilgili bölgede inflamasyon meydana gelir. Travma sonrası 12-14 saat içinde, bölgedeki vasküler yapıların parçalanması ile trombosit agregasyonu ve pıhtı oluşumu başlar. Oluşan pıhtının görevi; inflamasyon hücrelerine, endotelial hücrelere ve fibroblastlara matrisi sağlamaktır.(38) Akut enflamatuvar yanıt ilk 24 saat içinde pik yapar ve 7. günde sonlanır. Yara bölgesine ilk olarak nötrofiller göç eder. Nötrofillerin görevi akut enflamatuvar fazı başlatmaktır. Sonrasında bölgeye makrofajlar, lenfositler ve plazma hücreleri gelir. Makrofajlar hem bölgedeki nekrotik dokuları uzaklaştırmak hem de iyileşme sürecini başlatan sitokin ve büyüme faktörlerini salgılamakla görevlidir. Trombositler, makrofajlar ve kan hücreleri tarafından bazı büyüme faktörleri salgılanmaktadır. Bunlar; transformatör edici büyüme faktörü (TGF- β), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), trombositlerden türetilmiş büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörleri (FGFs), interlökin-1 ve 6 (IL-1, IL-6), tümör nekroz faktör (TNF- α), kemik morfogenetik proteinleri (BMPs), insülin benzeri büyüme faktörleri-1 ve 2 (IGF1, IGF-2) ve makrofaj koloni uyarıcı faktörler gibi büyüme faktörleridir. Kemige uygulanan kuvvetler ve mekanik gerilimler sonucunda mezenkim hücreleri uyarılır. Mezenkim hücrelerinin uyarılmasıyla büyüme faktörleri, kondroblast ve osteoblastlara dönüşür. Yapım ve onarımda rol alan bu hücrelerin kaynağı kemik iliğı, periost ve kan damarlarıdır.(37)

Yumuşak Kallus (Granülasyon) Fazı

Meydana gelen inflamasyondan sonra travma bölgesinde fibrinden zengin bir granülasyon dokusu oluşmaktadır. Granülasyon dokusu, yaralı bölgenin stabilitesini sağlayan kıkırdaktan oluşan kallus adında bir çatı oluşturur. Bu süreçte bölgede baskın olan doku, avasküler kıkırdak kallustur. Zamanla kemikleşmenin gerçekleşmesiyle vasküler yapılar da oluşmaya başlar.(38) Bu aşamada bölgede, hücresele seviyede kondroblast ve fibroblastların baskın olduğu görülür.(37)

Kondroblastların kollajen ve glikozaminoglikanları sentezlemesiyle kıkırdak bir matris oluşur. Hyaluronik asit, kondrotin sülfat ve dermatan sülfat gibi glikozaminoglikanların

yüksek su tutma kapasiteleri sayesinde matriksin boyutları artar. Kallusta mineralizasyonun başlaması ise kallus içine kondrositlerin gelmesiyle gerçekleşir.(37)

Sert Kallus Fazı

Bu faz, primer kemik oluşumunun başladığı osteogenezisin en etkin dönemidir. Osteoblastik aktivite en üst seviyededir. Periferal kallus alanlarında mineralize kemik matriksi gözlenmesi ile karakterizedir.(37) Sert kallus oluştuğunda kalsifiye kırıkta yerini non-lamellar kemiğe bırakır. Böylelikle kemik mekanik açıdan daha rijit, kuvvetlere karşı daha dirençli hale gelir. Bu fazda mineralize bölgeye osteoblast ve osteoklastların göçü ve yenilenmiş dokunun vaskülarizasyonu için gerekli olan uyarıcı etki, kalsifiye kırıkta sayesinde gerçekleşir. Bölgeye gelen osteoklastlar, kırıkta matriksi rezorbe eder ve yara yerinde non-lamellar kemiğin oluşmasını sağlar.(37, 38)

Kemik iyileşmesinin iyi bir şekilde gerçekleşmesi, yara bölgesindeki vaskülarizasyonun artmasına bağlıdır. Bölgede damarlanma arttıkça oksijen basıncı da artar ve bu da osteoblastların farklılaşması için gereklidir. Yapılan çalışmalarda; anjiyojenik faktörler kullanılarak damarlanmanın artırıldığı durumlarda kemik oluşumu ve iyileşmenin de arttığı tespit edilmiştir.(37, 38)

Yeniden Şekillenme (Remodeling) Fazı

Kemik iyileşmesinin son aşaması, non lamellar kemiğin lamellar kemiğe dönüşmesi ile gerçekleşir. Bu süre birkaç aydan bir yıla kadar sürebilir. Vaskülarizasyon da bu fazda devam eder. Lamellar kemik zamanla sert kallusun yerini alır; korteks ve medulla da kademeli olarak gelişir. Kırıkta dokusunun rezorpsiyonu osteoklastların çeşitli büyüme faktörleri, interlökinler ve sitokinler tarafından uyarılmasıyla gerçekleşir. Rezorbe olan kırıkta dokusu, osteoblastların ürettiği osteoid doku tarafından işgal edilir ve böylece mineralizasyon gerçekleşir.(37, 38)

Osteoklastlar, yara bölgesinde oluşan yeni kemiksi dokuyu remodelinge uğratarak kemik anatomisini tekrar oluştururlar. Osteoblastlar ise, yeni kemikte osteoid ve kalsiyum fosfatı daha fazla depolayarak mineralize matriks yoğunluğunu artırır. Osteoblast ve osteoklastların bu karşılıklı aktiviteleri sonucunda kemik çapı azalır, kemik yoğunluğu

artar. Sonuç olarak; kemik, fiziksel aktivitelere karşı koyma ve yük taşıma özelliğini yeniden kazanır.(37, 38)

2.1.6 Kemik İyileşmesini Etkileyen Faktörler

Kemik iyileşmesi, birçok olayın etkisinde gerçekleşen kompleks bir süreçtir. İskelet gelişimi, büyüme faktörleri, beslenme, hormonlar, sigara, ilaç kullanımı ve sistemik hastalıklar kemik iyileşmesinde etkisi olan bazı faktörler arasında yer almaktadır. Bu faktörler, kemik gelişimini çeşitli evrelerinde etkileyerek kemik oluşumunu yönlendirmektedirler.(5)

Hormonlar

Paratiroid hormonu, kemik metabolizması için önemli bir yere sahiptir. Bu hormon etkisini; osteoklastları aktifleştirerek gösterir ve doğrudan kemik rezorpsiyonunu artırır. Ancak düşük dozlarda kullanıldığında trabeküler kemik oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir. Kemik metabolizmasında önemli bir yere sahip bir diğer hormon da kalsitonin hormonudur. Kan plazmasındaki kalsiyum konsantrasyonu arttığında kalsitosin hormonu salgınır ve osteoklastlara etki ederek kemik rezorpsiyonunu engeller. Böylece kan kalsiyumunu azaltarak kemik kalsiyum miktarını artırır ve parathormonun tam tersi etki gösterir.(6, 39) Büyüme hormonu, hipofizin anterior lobundan salgınır ve epifizyal plak gelişimini uyararak kemik metabolizmasını etkiler. Büyüme hormonu ve bu hormona bağımlı büyüme faktörleri iskelet sisteminin büyümesinde, gelişmesinde ve remodelinginde önemli bir yere sahiptir. Bunun yanında, kalsiyumun idrar ile atılmasını ve bağırsak emilimini de artırmaktadır.(40) Testesteron, östrojen gibi androjen hormonları da kemik metabolizmasında etkilidir. Ossifikasyon merkezinin gelişmesi ve iskeletin olgunlaşması gibi etkilere sahiptirler. Bu etkilerini epifizyal plak üzerinden gösterirler. Yapılan çalışmalarda, östrojen eksikliğinin osteoporoza neden olduğu bildirilmiştir.(6) Cao ve ark. (41) tarafından yapılan deneysel çalışmada overektomi yapılarak östrojen sentezi durdurulmuş ve bunun sonucunda kırık iyileşmesinin olumsuz yönde etkilendiği rapor edilmiştir. Glukokortikoidler fazla salgılandığında kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bunun nedeni, osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara dönüşmesini ve kollajen üretimini engellemeleridir.(5) Tüm bunların dışında IL-1,

osteoprotegerin, interferon, TNF, koloni uyarıcı faktör gibi birçok faktör de kemik metabolizması üzerinde etkili olmaktadır.(6)

Beslenme

Birçok besin, kemik metabolizmasının gelişiminde etkin rol oynamaktadır. Özellikle kalsiyum ve fosfor açısından zengin besinler, kemik gelişimini olumlu yönde etkilemektedir. Kalsiyumun bağırsaklardan emilmesi ve kana karışması, özellikle D vitamini varlığında gerçekleşmektedir.(6)

Proteinler, insan vücudunun yaşamsal fonksiyonları için önemli bir yere sahiptir. Proteinler enerji üretimi amacıyla kullanıldıklarında sülfat açığa çıkar ve açığa çıkan sülfat metabolitleri böbreklerden atılır. Bu eliminasyonun gerçekleştirilebilmesi için de plazmadaki kalsiyum kullanılmaktadır. Sonuç olarak; proteinlerin sindirimi sonucunda plazma kalsiyumun miktarı azalmakta ve bu da kemik iyileşmesini negatif yönde etkilemektedir.(42)

C vitamini, B6 vitamini ve çinko bağ dokusunun temel yapısını oluşturan kollajen sentezinde görev almaktadır. Dolayısıyla; bu vitaminleri içeren besinler eksik alındığında kemik metabolizması da etkilenmekte ve kemik iyileşmesi yavaşlamaktadır.(43)

Yaş

Yaş arttıkça; hücrelerin rejenere olma kapasitesi de azalmakta ve yapım olayları yerini yıkıma bırakmaktadır. Artan yaşla orantılı olarak; mezenkimal hücre farklılaşması, yeni kemik dokusu oluşması, kemik iyileşmesi ve kırığın yeniden şekillenmesi yavaşlamaktadır. Ayrıca kadınlarda artan yaşla birlikte osteoporöz riskinin artmasıyla da kemik iyileşmesi etkilenmektedir.(54)

Alışkanlıklar

Sigara ve alkol kullanımı gibi alışkanlıklar da kemik metabolizması üzerinde etkilidir. Sigara, yara iyileşmesini geciktirmekte ve doku yenilenmesini olumsuz yönde etkilemektedir.(44) Tüm bunlara neden olan en önemli etken, nikotinin vazokonstriktör etkisidir. Vazokonstriktör etki sonucu, yara bölgesine olan kan akımı azalmakta ve

iyileşme olumsuz etkilenmektedir. Ayrıca karboksihemoglobin düzeyinde, platelet agregasyonunda, kan viskozitesinde artış ve kollajen sentezindeki azalma da nikotinin kemik metabolizmasını olumsuz yönde etkilediği durumlardır.(45) Nyquist ve ark.(46) yaptıkları klinik çalışmada, kronik alkol kullanımının da, kemik yapımını azalttığı rapor etmişlerdir. Bu bilim insanları alkol bağımlısı bireylerin iliak kemik densitometre değerlerinin alkol kullanmayan bireylere göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir.(46)

Sistemik Hastalıklar ve İlaçlar

Kemik iyileşmesi, birçok sistemik hastalık ve ilaç tarafından etkilenmektedir. İyileşmeyi olumsuz etkileyen sistemik hastalıkların başında diyabetes mellitus gelmektedir. Diyabetes mellitusun primer ve sekonder olmak üzere iki tipi mevcuttur. Primer diyabetes mellitus insüline bağımlıyken sekonder diyabetes mellitus insülininden bağımsızdır. Her iki tipinin de ortak özelliği, plazma glukoz miktarındaki artıştır.(46)

Glukokortikoid hormonlarının fazla salgılanması kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir. Bununla birlikte uzun süreli kortikosteroid kullanılması gereken cushing sendromu, lupus eritematosuz gibi otoimmün deri hastalıkları ve romatizmal eklem hastalıkları gibi durumlarda da kemik iyileşmesi negatif yönde etkilenmektedir.(5)

İskelet sisteminde genel tutuluma neden olan paget hastalığı, osteopetrozis, raşitizm, osteomalazi, osteogenezis imperfekta, Gaucher hastalığı, poliastatik fibröz displazi gibi genetik ve metabolitik hastalıklar da kemik iyileşmesini olumsuz yönde etkilemektedir.(6)

Sistemik hastalıkların yanında, bu hastalıkların tedavisinde kullanılan çeşitli ilaçlar da kemik iyileşmesi üzerinde etkilidir. Bu ilaçlara nonsteroid antienflamatuar ilaçlar (NSAI), bifosfonatlar, kortikosteroidler ve antidepresan ilaçlar örnek olarak verilebilir. NSAI ilaçlar etkilerini prostoglandinler üzerinden göstermektedir. Prostoglandinler iltihabi durumlarda aktiviteleri artan mediyatörlerdir. Bütün vücut dokularında olduğu gibi diş ve diş çevresi dokularda da bulunurlar. Diş çekimi gibi sekonder iyileşen yaralarda, hücre ve doku kaybı daha fazla olduğu için iltihabı reaksiyon da daha şiddetlidir. Dolayısıyla sekonder iyileşmede prostoglandin aktivitesi normal dokuya göre daha fazladır. Bununla

birlikte; sekonder iyileşmenin daha uzun sürede tamamlanmasına paralel olarak prostoglandin aktivite düzeyi de anlamlı olarak artmaktadır. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, NSAI ilaçlar kemik iyileşmesini yavaşlattığı belirtilmiştir. Bunun nedeni olarak; NSAI ilaçlar prostoglandinlerin osteoblastik aktiviteyi arttırıcı etkisini engelleyerek kemik iyileşmesini geciktirdiği düşünülmektedir.(47)

Proton pompa inhibitörlerinin de yapılan çalışmalar sonucunda osteoklastik ve osteoblastik aktiviteyi etkileyerek kemik yapım yıkımını bozduğu bildirilmiştir. Kemik iyileşmesinin bozulabileceği, fraktür riskinin artabileceği, implant osseointegrasyonunun azalabileceği rapor edilmiştir.(55, 56)

Son zamanlarda sıkça kullanılan denosumab ve bifosfonat türü ilaçlar da kemiği ciddi şekilde etkileyerek iyileşmeyi bozmaktadır. Özellikle uzun yarılanma ömrüne sahip olan bifosfonatlar, kemik remodelingini olumsuz yönde etkilemektedir. Bifosfonatlar etkilerini osteoklastlar üzerinden göstermektedir. Bifosfonata maruz kalan osteoklastlar, fonksiyonlarını kaybederek ölürler. Yaşam süresi dolan ve osteoklastlar tarafından rezorbe edilemeyen kemik dokusu nekroz olur ve ortamdan uzaklaştırılmaz. Bunun sonucunda, sağlıklı kemik dokusunun da devamlılığı bozulur ve kemik hem yeniden remodele olamaz hem de ortamda sağlıklı bir doku bırakır. Bifosfonatların osteoporöz, paget gibi sistemik hastalıklardan metastaz riski olan malign rahatsızlıklara kadar geniş bir kullanım alanı vardır.(48)

2.2 Trombositten Zengin Ürünler

Geçmişte olduğu gibi günümüzde de otojen materyallerin altın standart olduğu değişmeyen gerçeklerden biridir.(57) Kan vücudumuzun yumuşak ve sert dokularının iyileşmesinde en önemli otojen kaynak olarak kullanılır.(58)

İlk olarak 1980 yılında trombositopenili hastalarda cerrahi adeziv olarak tanımlanan fibrin yapıştırıcılar, yara sahasını kapatma amacıyla iyileşmenin başlamasını uyararak kan kaynaklı ürünlerin ilk formudur.(59) Hemostatik ajan ve cerrahi yapıştırıcı olmalarının yanı sıra doku iyileşmesini de olumlu yönde etkileyebilecekleri saptanmıştır.(59) Özellikle trombosit zengin ürünler olmak üzere kan konsantreleri başlangıçta doku

yapıştırıcıları olarak kullanılsa da zamanla biyolojik materyallerin arasında yerini almıştır. Trombositlerdeki dönüştürücü büyüme faktörü-beta (TGF- β)'nın keşfiyle fibrin yapıştırıcıların sert ve yumuşak doku rejenerasyonunda kullanılabileceği düşünülmeye başlanmıştır.(60) 1990'larda fibrin yapıştırıcıdan daha yüksek konsantrasyonda olan trombosit ve fibrinojen içeren trombositten zengin plazma (TZP) kullanıma sunulmuştur.(61) TZP, 1997 yılında ilk defa Whitman ve ark.'nın (62) yapmış olduğu çalışma ile oral cerrahi alanında da kullanılmaya başlanmıştır.

2.2.1 Trombositten Zengin Plazma

İlk kez 1997 yılında maksillo-fasiyal rekonstrüksiyon cerrahisinde trombositten zengin preperasyonun etkilerinin anlatıldığı çalışmalarda, trombositten zengin plazma ve içerisindeki büyüme faktörleri içeriğine vurgu yapılarak tanıtılmıştır.(62) TZP santrifüjlenmiş kanın trombin ve kalsiyum ile aktivasyonundan sonra zayıf bir fibrin ağı olarak ortaya çıkan sıvı veya jel formunda kullanılabilen birinci kuşak bir trombosit konsantratıdır. Otojen olmalarına rağmen elde edilirken dışardan yapay olarak sığır trombini ve kalsiyum klorit ilavesi olduğu için tamamen otojen olmayan ürünlerdir. Ani fibrin polimerizasyonu başlatıldığı için sitokinler ve fibrin arasındaki sinerjinin kaybına neden olur. İçlerinde sığır trombini veya kalsiyum klorit (CaCl_2) gibi yabancı 15 madde ve yapay pıhtılaştırıcılar bulunan materyallerin önemli dezavantajları vardır. Bu materyallerde iki santrifüj yöntemi uygulanmaktadır. İlk olarak yavaş santrifüj sırasında EDTA (etilendiamin tetraasetik asit), CA (sitrik asit) ile kaplanmış tüpler ile doğal pıhtılaşma engellenmektedir. İlk santrifüj sayesinde eritrositler çöktildikten sonra ikinci hızlı santrifüj işleminde, yapay pıhtılaşma oluşturmak için alınan plazmanın içine sığır trombini, CaCl_2 veya başka yapay bir pıhtılaştırıcı ilave edilir.(63)

TZP geliştiricileri, büyüme faktörünün serbest bırakılmasında ve yara iyileşmesinin farklı evrelerinde önemli bir rol oynadıkları gösterilse de, lökositleri kan konsantrelerinden çıkarmayı amaçlamışlardır.(64) TZP, kandan türetilen büyüme faktörleri kullanılarak çeşitli dokuların vaskülarizasyonunu indükleyebilen rejeneratif bir ajan olarak uzun yıllardan beri kullanılmasına rağmen koagülopatiler, faktör V ve faktör XI'a karşı antikor oluşturulması gibi komplikasyonlara sebep olabilmektedir. Ayrıca, çoğunlukla TZP'de

bulunan pıhtılaşmayı engelleyen maddelerin ilave kullanımı ile ilgili dezavantajların yara iyileşme sürecini engellediği gösterilmiştir. (65)

TZP'nin Dezavantajları;

1-Oluşan ürün tamamen otojen olmadığından yara iyileşmesinin ilk döneminde yabancı madde reaksiyonu oluşturarak doğal enflamasyona engel olabilmektedir.(65)

2-Yapay pıhtılaşma ile oluşan fibrin matriks yapısı doğal pıhtılaşma ile oluşan fibrin matriks yapısından farklı olarak daha rijittir. Bu durum, sert yapı içeriğindeki büyüme faktörlerini kontrollü yavaş bir salınımla değil de hızlı ve kısa sürede salınmasına neden olmaktadır.(66)

3- Maliyetinin yüksek olması, hazırlama sürecinin birçok basamaktan oluşmasından dolayı zaman kaybına neden olur.(67)

2.2.2 Trombositten Zengin Fibrin

Birinci nesil trombositten zengin kan ürünlerinin dezavantajları nedeniyle yeni kan ürünleri geliştirme arayışları devam etmiştir. İkinci nesil kan ürünü trombositten zengin fibrin (TZF), 2001 yılında Fransa'da Choukroun tarafından tanıtılmıştır.(68) Tanıtılan bu yöntemde TZF'de herhangi bir antikoagülan ilavesi bulunmayan cam kaplı veya tamamen cam olan tüpte kan alındıktan hemen sonra santrifüj edilmiştir.(69) TZF'de kan herhangi bir biyokimyasal modifikasyona uğramadığından doğal pıhtılaşma süreci gözlenmiştir. Bu yöntemde pıhtılaşma cam tüpteki silika ile temas eden ve aktive olan trombositler sayesinde başlarken vakit kaybetmeden 2700-3000 rpm devirde (yaklaşık 400 G göreceli santrifüj kuvveti (Rcf)) 10-12 dakika süre ile santrifüj edilmiştir. Tüpün silika çeperine ortalama 400 G ile çarpan trombositler aktive olmakta ve fibrin polimerizasyonu uyarılarak lökositten ve trombositten zengin fibrin pıhtı elde edilmektedir.(66) Her santrifüj cihazı aynı devirde aynı G kuvvetine sahip değildir. G kuvveti; santrifüjün dönme hızına (rpm) ve motor yarıçapına göre farklılık göstermektedir.

$$Rcf \text{ ya da } G \text{ kuvveti} = 1.12 \times r \text{ (mm)} \times (rpm/1000)^2 \text{ (70)}$$

Santrifüj işleminden sonra tüpün en alt katmanında kırmızı kan hücreleri (eritrositler), en üst katmanında trombositlerden fakir plazma ve tüpün orta katmanında trombositlerden zengin fibrin pıhtı olmak üzere, üç tabaka oluşmaktadır. Cam tüpe alınan kanın santrifüje geç konulması durumunda, bu üç doğal pıhtılaşma katmanı ayrılmadan oluşacağından istenilen sonuç alınamaz. Trombosit ve lökositlerin fibrin içerisindeki dağılımları homojen değildir. TZF pıhtı, ana gövdeyi oluşturan sarı renkte fibrin bir kısım ve pıhtı sonunda kırmızı bir kısımdan oluşur. TZF pıhtısının bu iki kısmı arasında, lökositlerin ve trombositlerin en yoğun olarak bulunduğu beyazımsı kısım ‘buffy coat’ olarak adlandırılır.(71) Cerrahi uygulamalarda ‘buffy coat’ kısmının tamamen uzaklaştırılmayıp, fibrinin üzerinde bir miktar bu kırmızı tabakanın da bulunması önerilmektedir.(70)

İlk olarak geliştirilen tamamen otojen trombositten zengin fibrin önce TZF olarak isimlendirildi, ardından lökositten de zengin olduğu için L-TZF olarak isimlendirildi.(67) Günümüzde özellikle diş hekimliğinin periodontoloji ve implantoloji alanlarında TZF yaygın olarak kullanılmaktadır.(72) Tamamen otojen olması ve hiçbir yabancı madde içermemesi TZF ile oluşan yara iyileşmesinin doğal enflamasyona sahip olmasını sağlamıştır ve özellikle yumuşak dokularda, doğru metotlar ile kullanımlarda başarılı sonuçlar alınmıştır.(73) Bilindiği üzere enflamasyon, hastalık veya travmaya verilen olumlu bir yanıt veya işlem olarak ortaya çıkar.(74) Akut enflamasyonun çözülmesi (rezolüsyonu) başlangıçta yaralanmanın kısa süreli ve limitli olduğu durumlarda gerçekleşir ve böylelikle dokuya zarar veren uyaran ortadan kaldırılarak doku normale döner.(75) TZF trombositler, lökositler, sitokinler ve dolaşımda bulunan kök hücrelerin konsantre halde bulunduğu kompleks güçlü üç boyutlu mimaride olan bir fibrin yapıdan oluşur.(71)

Alınan kanın içerisindeki trombositlerin % 97’sinin, lökositlerin ise %50’den fazlasının bu üç boyutlu fibrin yapısı ile TZF pıhtı içerisinde bulunduğu belirtilmiştir.(71) Cam ile aktive edilen fibrinin ağ yapısı itibarıyla insan dokularında 7-11 günde rezorbe olduğu, bu rezorbsiyon süresinin yumuşak doku iyileşmesi için yeterli olduğu, buna rağmen sert doku iyileşmesinde tek başına kullanıldığındaki osteokondüksiyon özelliğinin halen daha kesin

olmadığı bildirilmiştir. TZF, otojen veya otojen olmayan greft materyalleri ile birlikte üstün özellikli bir biyolojik materyal olarak kullanılmaktadır.(66)

Kısa veya uzun dönemde cam tüp veya cam kaplı plastik tüplerde silika ile etkileşimin kaçınılmaz bir durum olması, silika partüküllerinin büyük miktarının santrifüj sırasında kırmızı kan hücreleriyle birlikte çökmesine rağmen, az bir miktarın buffy coat, fibrin ve trombositten fakir plazmada asılı kalabilmesi ve tedavi esnasında bu partüküllerin hastaya geçme ihtimali gibi yan etkilerin eliminasyonu için titanyum trombosit zengin fibrin (T-TZF) geliştirilmiştir (76, 77) Bu yöntemdeki fibrin, geleneksel TZF prosedürü şeklinde, herhangi bir antikoagülan içermeyen 10 ml titanyum tüplere hemen alınan venöz kanın 2800 rpm de 12 dakika santrifüj edilmesiyle elde edilmektedir. Fibrin pıhtı, titanyum tüp içerisinde kırmızı kan hücreleri ile hücresiz plazma arasında bulunmaktadır.(77)

T- TZF, trombosit aktivasyonunda silika yerine titanyumu kullanarak daha sıkı bir fibrin ağ yapısının oluşmasını sağlamaktadır.(78) Bu sıkı fibrin yapısı ise T-TZF membranın doku içindeki rezorpsiyon süresini arttırarak tek başına otojen greft materyali olarak kullanılmasını mümkün kılmaktadır. Yapılan çalışmalarda T-TZF yumuşak doku ve kemik iyileşmelerinde iyi sonuçlar vermiş ve doku içine yerleştirildikten sonra 30 günden daha fazla rezorbe olmadan kalabildiği gösterilmiştir.(139) Ayrıca uzun rezorbsiyon süresi ve doğal matriks yapısından dolayı vücut içindeki kemik iyileşme mekanizmalarını harekete geçirdiği de gösterilmiştir.(77)

TZF pıhtısının histolojik analizlerinde, fibrin iskele içindeki trombositlerin ve inflamatuvar hücrelerin esas olarak TZF pıhtısının proksimal kısmında biriktiği gösterilmiştir.(79) Bu nedenle TZF bazlı matrikslerin rejeneratif kapasitesini arttırmak için modifiye edilmiş santrifüj protokollerinin TZF matriksi içindeki hücresel dağılımı ne ölçüde etkileyebileceği araştırılmıştır. G kuvveti azaltılırken santrifüjleme süresinin arttırılarak gelişmiş lökosit sayılarına, özellikle nötrofilik granülositlere sahip bir geliştirilmiş trombosit zengin fibrin (advanced platelet rich fibrin (G-TZF)) elde edilmiştir. G-TZF, güçlü üç boyutlu fibrin matriks ile karakterizedir ve büyüme faktörlerinin yavaş ve sürekli

salınımı için bir ortam ve anjiyogenezis için bir iskele olarak hizmet etmektedir.(69) Ayrıca G-TZF içindeki trombositler ve lökositler TZF'ye kıyasla tüm pıhtıya eşit olarak dağılmaktadır.(79)

Daha iyi bir otojen materyal elde etmek amacıyla santrifüj süresini ve hızını değiştirerek konsantre büyüme faktörü (CGF), G-TZF ve enjekte edilebilen trombositten zengin fibrin (E-TZF) ürünleri geliştirilmiştir (79, 80) E-TZF'de plastik tüp kullanımı ile TZF membran oluşmadan sıvı halde iken vücuda verilmesi amaçlanmaktadır.

TZF'lerin santrifüj protokolleri:

- 1- TZF (L-TZF) 2700 rpm 12dk (69)
- 2- T-TZF 2700 rpm 12dk (77)
- 3- G-TZF 1500rpm 14dk (79)
- 4- CGF 2400-2700 rpm 12dk (80)
- 5- E-TZF 700 rpm 3dk (81)

2.2.3 Enjekte Edilebilen Trombositten Zengin Fibrin (E-TZF)

TZF ürünlerindeki son gelişmelerden biri, enjekte edilebilir trombositten zengin fibrin (E-TZF)'in üretilmesidir.(82) TZP ile kıyaslandığında, TZF'nin uygulamalarını sınırlayan dezavantajı enjekte edilmeye uygun olmayan bir jel halinde elde edilmesiydi. Doğrudan enjeksiyonların yanı sıra çeşitli biyomalzemelerin anjiyojenik potansiyellerini geliştirmek için kullanılabilen enjekte edilebilir TZF bazlı bir matriksin geliştirilmesi için klinik bir ihtiyaç bulunmaktaydı.(83) TZP enjeksiyonları diz artroplastisi, plastik cerrahide, kalp ameliyatları sonrası enfeksiyon riskini azaltmak, spor sakatlanmaları, ortopedi ve travmatolojide tendon, ligament yaralanmaları, osteoartrit, kas-iskelet rejeneratif prosedürleri, menisküs vb., dermatolojide alopesi, akne vb. alanlarda kullanılmaktadır.(84, 85) Tüm bu uygulamalar, lokal yara iyileşmesini hızlandırmak için TZP'de yer alan trombositler tarafından salınan otojen büyüme faktörünün etkisine dayanmaktadır.(86) Yapılan çalışmalarda, TZF'den 7-11 gün boyunca büyüme faktörlerinin salındığı bildirilmiştir.(11) TZF'de devamlı büyüme faktörlerinin

salınımının hücre proliferasyonu, migrasyonu ve farklılaşması üzerinde daha güçlü uyarıcı etkisi olduğu belirtilmiştir.(87)

Wend ve ark.(81) düşük ve sabit santrifüjleme süresinde (3 dakika) kademeli olarak azaltılan G kuvvetinin (yüksek G kuvveti:2800 rpm, orta G kuvveti:1400 rpm ve düşük G kuvveti:E-TZF:700 rpm) etkisini araştırdıkları çalışmalarında lökositler, nötrofiller, monositler ve lenfositlerin toplam hücre sayısı, düşük G kuvveti kullanılan E-TZF'den daha yüksek olduğunu göstermişlerdir. TZF temelli matrislerin geliştirilmiş rejeneratif potansiyelinden ötürü, bu materyaller doğal bir ilaç dağıtım sistemi olarak hizmet etmek için potansiyel bir kaynak haline gelmiştir.(11)

2.3. Kemik Greftleri

Kemik greftleri osteojen, osteokondüktif ve osteoindüktif aktiviteyi sağlayarak kemik dokusunun iyileşme yanıtını artıran, tek başına veya diğer materyallerle birlikte kullanılan materyallerdir. Oral ve maksillofasiyal cerrahide sıkça kullanımı olan kemik greftleri kas ve iskelet sistemi tümörleri cerrahisi, travma, osteomyelit, konjenital anomaliler, revizyon artroplasti cerrahisi gibi rekonstrüktif müdahaleler esnasında oluşan kemik defektlerini doldurmak amacıyla, kemik greftleri ve kemik grefti yerini alabilecek materyaller sıklıkla kullanılmaktadır.(88, 89)

Kemik greftinin etkinliğini sağlayan biyolojik mekanizmalar; osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyondur. Osteogenezis, kemik greftlerinden köken alan osteoprogenitor hücrelerinin canlı osteoblast hücrelerine dönüşerek yeni kemik oluşumunu indüklemesi olayıdır. Osteokondüksiyon, kemiği oluşturan bileşiklerin; alıcı kemik bölgesinden greft içine ilerleyebilmesine, yeni oluşan kılcal damarlara, perivasküler doku ve osteoprogenitör hücrelere cansız bir iskelet görevi gören yapısal çatı oluşturmaktır. Osteoindüksiyon, çevresel mezenkimal hücrelerin stimüle edilerek kıkırdak ve kemik üreten hücrelere dönüşümlerinin sağlanmasıdır. Yani yeni kemik oluşumunun uyarılmasıdır. (88-91)

2.3.1. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması

Kemik greftleri, otogreftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastlar olmak üzere dört kategoriye ayrılır. Otogreftler aspire kemik iliği, spongios kemik, nonvasküler kortikal kemik ve vaskülerize kemik olmak üzere çeşitli tiplere sahiptir.(89) Allogreftler ise greft tipine göre kondral, spongiyoz ve osteokondral olarak sınıflandırılır. Elde edilme yöntemine göre ise taze, dondurulmuş, dondurulup kurutulmuş ve demineralize edilmiş şeklinde kategorize edilir. Ayrıca, steril edilme yöntemlerine göre steril olarak işlenmiş, radyasyonla steril edilmiş ve etilen oksit ile steril edilmiş olarak sınıflandırılır.(88)

2.3.2 Otogreftler

Hastanın kendisinden elde edilen ve aynı hastada kullanılan greftlerdir. Canlı kemik hücreleri ve kemik morfogenetik proteinlerini içermesi nedeniyle osteojenik etkiye sahiptir. Yerleştirildiği bölgede; osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon sağlaması nedeniyle kemik greftleri arasında altın standart olarak kabul edilmektedir.(92)

Otojen kemik greftleri ağız içinde; maksilla tüber, zigomatiko-maksiller çıkıntı, zigoma, mandibula simfiz ve ramustan elde edilebilmektedir. Otojen greftler ağız dışında, genellikle iliak krestten, kostadan, distal femurdan ve proksimal tibiadan temin edilebilmektedir.(93) Kemik blok halinde ya da partikül formunda elde edilebilmektedir. Kortikal, kansellöz ya da kortiko-kansellöz yapıda bulunmaktadır. Avantajları arasında greftin osteojenik aktiviteye sahip olması ve konağın grefte karşı düşük immün yanıt göstermesi yer almaktadır. Bununla birlikte, greftin elde edilmesi için ikinci bir cerrahi alanın açılması, intraoral elde edilme miktarının kısıtlı olması, donör bölgenin morbidite riski, greftin hızlı rezorbe olması gibi dezavantajları bulunmaktadır.(91, 94, 95)

2.3.3 Allogreftler

Allogreft de otogreft gibi insanlardan elde edilmektedir. Fakat allogreftin farkı, greftin hastanın kendisinin yerine farklı bir kişiden elde edilmesidir. Allogreftler, kemik bağışı yapan kadavralardan alınmakta, böylece ihtiyaç durumunda istenilen miktarda kemik bankalarından alınıp kullanılmaktadır. Hem osteoindüktif hem de osteokondüktif özellikleri bulunmaktadır.(96) Otojen greftlerle karşılaştırıldığında kolay elde edilebilir

olması, ikinci cerrahiye gerek duyulmaması, post-operatif hasta şikayetlerinin ve operasyon süresinin daha az olması gibi çeşitli avantajlara sahiptir. Dezavantajı ise antijenik cevap oluşturabilmesi ve bakteriyel veya viral kontaminasyon riski taşımasıdır.(96-98) Alıcı ve verici kişiler arasında genetik farklılıkların neden olduğu immün cevabını önlemek amacıyla antijenite azaltan ve aynı zamanda hastalık bulaşmasını önleyen çeşitli yöntemler uygulanmaktadır. Bu amaçla günümüzde kullanılan yöntemler, dondurma, dondurarak kurutma ve demineralize ederek dondurarak kurutmadır.

2.3.4. Ksenogreftler

Ksenogreftler farklı türdeki canlılardan elde edilen greftlerdir. Sığır, domuz veya mercanların iskeletinden elde edilebilmektedirler. Yalnızca iskelet yapı olarak görev yapması amacıyla kullanılan bu greftlerin içerisindeki organik komponentler deproteinize edilmektedir. Deproteinizasyon sonucunda geriye pörözlü inorganik yapı kalır. Bu pörözlü yapı, içerisinde damarlanmanın ve hücre göçünün başlaması için osteokondüktif etki gösterir.(90)

2.3.5. Alloplastlar

Sinterleme yöntemiyle elde edilen, sentetik kemik benzeri greftlerdir. Otojen greftlerin hızlı rezorbe olması ve kısıtlı miktarda elde edilmesi, allogreftlerin hastalık taşıma riski gibi dezavantajlarından dolayı son yıllarda sentetik materyallerin kullanımı artmıştır. Rezorpsiyon süreleri fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre değişimlik göstermektedir. Kalsiyum karbonat (CaCO_3) kırılkan ve kolay rezorbe olmaktadır. Ancak hidroksiapatit (HA) ile trikalsiyum fosfatın (TCP) kombine kullanımı ile hem sert yapıda hem de rezorbe olabilen bir materyal elde edilmektedir. Kullanılan materyale göre osteokondüktif ve bazen de osteoindüktif etki gösterebilmektedir.(99) Dezavantajı ise nadiren de olsa yabancı cisim reaksiyonu oluşturabilmesidir.(89, 100)

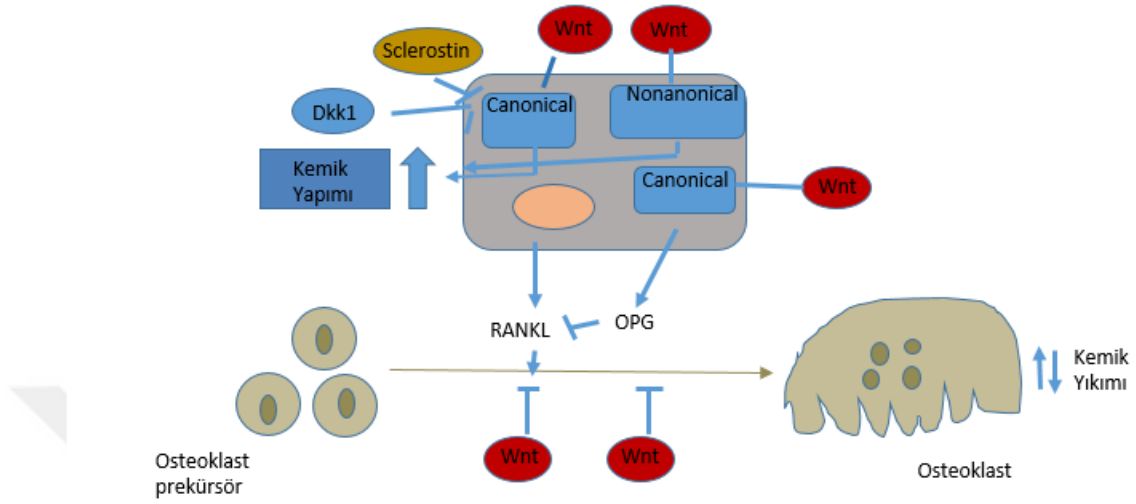
2.4. Wnt/ β - catenin Sinyal yolağı

Wnt sinyal yolları erişkin dönemde rejeneratif kapasitesi olan hücrelerin adezyonunda, hedef hücrelerin gen transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyonik dönemdeki

hücrelerde ise hücre polaritesinin, proliferasyonunun sağlanmasında, hücre farklılaşmasında ve göçünde önemli rol oynamaktadır.(101) Wnt/ β -cat sinyal yolağı, Wnt sinyal yollarından birisidir. Wnt/ β -cat sinyalizasyonunun aktivasyonu, doku hasarında erken bir cevaptır ve tüm dokulardaki hücreler temelli onarımın uyarılması için gereklidir.(102, 103) (Şekil 2.5.)

Genel olarak Wnt sinyal yolağının aktivasyonunun azaltılmasının rejeneratif kapasiteyi azalttığı bilinmektedir.(104) Güçlü rejeneratif kapasitesi olan planaryalarda Wnt sinyal yolağının inhibe edilmesi sonrası biçimsiz anatomik oluşumlar ortaya çıkmıştır.(105-107) Rejeneratif kapasitesi limitli olan dokularda ise Wnt sinyal yolağı tamir için gereklidir.(104) Örneğin, iskeletteki kırık sonrası Wnt sinyal yolağı inhibe edilirse kaynaşmamış kemik ortaya çıkmaktadır.(23, 108, 109) Memelilerde cilt yaralanmalarında iyileşme genelde skarla olmaktadır ancak Wnt sinyal yolağı aktive edildiğinde tamamen işlevsel epidermis oluştuğu görülmüştür.(110) Multiple myeloma hastalarında yeni kemik oluşumunu teşvik etmek için Wnt sinyal yolağının aktive edilmesiyle ilgili fazI/II klinik çalışmalar yürütülmektedir.(111, 112) Kemoterapi sonrası ortaya çıkan oral mukozitisin tedavisi amacıyla yapılan bir çalışmada Wnt agonisti olan R-spondin'in sistemik kullanımının mukoza yenilenmesini uyardığı gösterilmiştir.(113)

Wnt sinyal yolağının periodontal dokuların gelişiminde ve homeostazındaki rolü bilinmektedir.(108, 114-116) Wnt antagonistlerinin faktörlerin aktivasyonu ile oluşturulan Wnt sinyalinde azalma, Wnt ligandlarının eksikliği veya Wnt reseptörlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlar kemik kaybına neden olmaktadır. Popelut ve ark.(102), farelerde implant cerrahisi sonrası osseointegrasyonu inceledikleri çalışmada Wnt sinyalinin kemik oluşumundaki asıl rolünün yanı sıra, implant osseointegrasyonunda yaygın bir kullanıma sahip olabileceğini göstermişlerdir. Farelerde β -kateninin bağlandığı transkripsiyon faktörü olan lenfoid bağlayıcı faktör (Lef-1) eksikliğinin eksik diş oluşumuna ve diş gelişiminde tomurcuk safhasında duraklamaya sebep olduğu gösterilmiştir.(117) Lef-1'in aşırı ekspresyonu ise epitelde artış ve diş benzeri yapıların oluşumuna sebep olmaktadır.(118)



Şekil 2.5. Wnt sinyal yolağı osteoblast/osteoklast aktivitesi

2.4.1 Glikojen Sentaz Kinaz-3 (GSK-3)

Glikojen sentaz kinaz (GSK), glikojen sentezinin düzenlenmesindeki fonksiyonunu tanımlamak üzere çalışılan ilk kinazlardan biridir.(92-94) GSK-3'e duyulan ilgi son yıllarda glikojen metabolizmasının ötesine geçmiş ve GSK-3'ün pek çok hücrel ve fizyolojik olayda merkezi bir rol oynadığı bilinmektedir.(94)

GSK-3'ün üç formu ($GSK-3\alpha$, $GSK-3\beta$ ve $GSK-3\beta 2$) Wnt ve Hedgehog sinyal yollarında, hücre bölünme siklusunda, kök hücre yenilenmesinde ve farklılaşmasında, apoptozda, transkripsiyonda ve insülin aktivitesinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynarlar. Ayrıca, GSK-3'ün farmakolojik inhibitörlerinin Alzheimer hastalığı, bipolar affektif bozukluk, diyabet gibi çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılabileceği düşünülmektedir.(94)

Yapılan çalışmalarda GSK-3 inhibitörleri in-vitro olarak araştırılmış ve sıçanlarda osteoblast farklılaşmasını ve kemik kütlesini arttırdığı görülmüştür.(119) Derin çürüklü dişlerde yapılan bir çalışmada GSK-3 inhibitörleri reparatif dentin yapımını indüklediği ve

doğal, işlevsel dentin oluşturduğu gösterilmiştir.(120) GSK-3'ün birçok küçük molekül inhibitörü geliştirilmiş ve farklı deneylerde etkili bir şekilde Wnt aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir. Tideglusib (NP-12, NP03112) bir GSK-3β inhibitörüdür ve Alzheimer gibi nörolojik bozuklukların tedavisinde klinik olarak denenen bir ilaçtır. Ayrıca farelerde pulpa hasarında reperatif dentin oluşturduğu da gösterilmiştir.(120, 121)

2.4.2 Tideglusib

Tideglusib Wnt/β katenin yolağında kritik regülatör olan GSK-3β aktivitesini suprese etmektedir.(122, 123) Tideglusib kullanımı sonrasında glikojen sentaz kinaz 3β (GSK-3β)'nın beyinde ciddi derecede yükselmesi Alzheimer hastalarında etkili olabileceği izlenimi yaratmıştır. Ayrıca hücre canlılığını sürdüren genlerin transkripsiyonlarını önleyen β-katenin yolağını baskılaması da önemli bir konudur. Tüm bu etmenler bu kinazın Alzheimer için potansiyel ilaç olduğuna işaret eder.

GSK-3β doku iyileşmesi yolağında da önemli bir role sahiptir. Bu yüzden, bu ilacın son yıllarda derin dentin çürüğünün tamiri üzerindeki etkisiyle ilgili çalışmalar yapılmaya başlanılmıştır.

Dentin ve kemik doku yapısal olarak ve iyileşme mekanizması açısından benzerlik göstermektedir. Dentinin ağırlığının %70'i mineral matriks, %20'si organik matrix, %10'u sudan oluşurken; alveolar kemiğin ağırlığının % 65'i mineral matriks, %25'i organik matriks, %10'u sudan oluşur.(124) Bu benzerlikten yola çıkarak biz de Tideglusib'in aynı etki mekanizmasıyla kemik dokusuna etki edebileceğini düşünmekteyiz. Ancak bildiğimiz kadarıyla kemik iyileşmesinde tek başına veya greft türleriyle birlikte uygulanmasına yönelik henüz literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır.

Yapılan çalışmalar göz önüne alındığında, rejenerasyonda önemli bir role sahip Wnt/β cat sinyal yolağının aktive edilmesinde GSK-3 inhibitörü bir molekül olan Tideglusib'in potansiyel etkisinin ortaya çıkartılmasının kemik iyileşmesinde potansiyel bir etkiye sahip olabileceği düşünülebilir.

Bu yüzden bu çalışmanın amacı deneysel olarak oluşturulan kalvaryal kemik defektlerinin iyileşmesinde;

1. E-TZF'nin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek,
2. Tideglusib'in kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek,
3. E-TZF, Tideglusib ile ksenogreftin kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini değerlendirmek,
4. E-TZF ile Tideglusib'in kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerini karşılaştırmaktır.



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışma, Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen 3 aylık, ortalama 250-350 gram ağırlığındaki, sağlıklı, erişkin dişi 40 adet rat üzerinde yürütüldü. Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun 12.07.2021 tarih, 2021/4 toplantılı, 2021.07.001 protokol ve 100 sayılı kararı ile onaylandı. Denekler deney öncesi laboratuvar şartlarına alışması için 1 haftalık alışma dönemine bırakıldı. Çalışma boyunca denekler, veteriner hekim kontrolünde uygun kafeslerde ve her bir kafeste 2 denek olacak şekilde yerleştirildi. Deneklerin hepsi standart laboratuvar diyeti (sıçan yemi ve musluk suyu) ile beslendi. Tüm ratlar, 22 ± 2 °C sıcaklıkta %40-%60 nem oranında, sürekli ılık ve temiz havada, 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık sıklıkta barındırıldı.

3.1.2 Çalışma Grupları

Denekler randomize olarak 1 adet kontrol grubu (grup 1) ve 4 adet çalışma grubu (grup 2, grup 3, grup 4, grup 5) olmak üzere, her biri 8 adet rat içeren toplam 5 gruba ayrıldı. Tüm gruplarda yapılan cerrahi işlemler genel anestezi altında gerçekleştirildi.

- 1.Çalışma Grubu (Kontrol Grubu-Jelatin Sünger)
- 2.Çalışma Grubu (Tideglusib+Jelatin Sünger)
- 3.Çalışma Grubu (Tideglusib + Ksenojen Graft + Jelatin Sünger)
4. Çalışma Grubu (E-TZF + Ksenojen Graft + Jelatin Sünger)
5. Çalışma Grubu (Tideglusib + E-TZF + Ksenojen Graft + Jelatin Sünger)

3.2. İlacın Hazırlanması ve Uygulanması

3.2.1 Tideglusib

Deney öncesi ratlar tartılarak kiloları kaydedildi ve uygulanacak ilaç miktarı katı formda olan Tideglusib ile sıvı formda olan E-TZF'nin defekt sahasına uygulanırken standartizasyonunu sağlamak amacıyla; Tideglusib (2-(1-naphthalenyl)-4-(phenylmethyl)-1,2,4-thiadiazolidine-3,5-dione, Cayman 50 mg, Abd) dimetil sülfoksit

ile dilue edildi. Tideglusib defekt başına 10 µl hacme 50 nM, jelatin sünger ile uygulandı.(29, 125) (Şekil 3.1.)



Şekil 3.1. Tideglusib

3.2.2 Jelatin Sünger

Defekt sahasına uygulanmak üzere steril emilebilir jelatin sünger (Surgispon, Türkiye)



kullanıldı.(Şekil 3.2.)

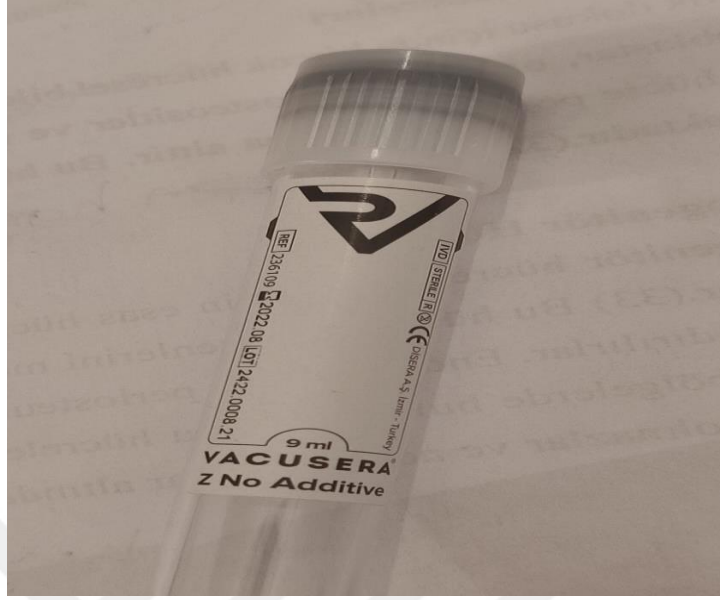
Şekil 3.2. Surgispon(Türkiye) emilebilir hemostatik sünger

3.2.2. E-TZF'nin Hazırlanması ve Uygulanması

E-TZF eldesinde çalışma grubunda yer almayan denek rattan anestezi altında ağrısız olarak venöz 5 ml kan alındı. Alınan kan katkısız plastik tüp (Şekil 3.4) içerisine yerleştirilerek, 700 rpm devirde 3 dakika santrifüj (Hettich Eba 20,Abd) edildi. Santrifüjleme sonrası oluşan sarı-turuncu renkli sıvı, steril enjektör içine çekilerek santrifüj tamamlandıktan 2-3 dakika içerisinde defekte uygulandı.(126, 127) (Şekil 3.3.)



Şekil 3.3. Santrifüj cihazı(Hettich Eba) ve uygulama protokolü (rpm x süre)



Şekil 3.4. Katkısız plastik tüp

3.2.3. Kemik Grefti

Deney gruplarında kullanılmak üzere ksenogreft (Geistlich Pharma, Wolhusen, İsviçre) kullanıldı. Greftler kullanımdan önce steril serum fizyolojik solüsyon içerisinde bir süre bekletildi. (Şekil 3.5.)



Şekil.3.5. Ksenogreft

3.2.4. Anestezik İlaçların Hazırlanması

Cerrahi girişim öncesi tüm ratlara intraperitoneal enjeksiyon ile preanestezik ajan olarak 20 mg/kg dozda Xylazine HCl (Alfazyne, Ege-Vet, Türkiye) ve genel anestezik ajan olarak 90 mg/kg dozda Ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı, Türkiye) uygulandı.

3.3. Kemik Defektinin Oluşturulması

Cerrahi girişimlerin tümü, yukarıda anlatılan anestezi protokolü uygulanarak gerçekleştirildi. Ratlar supin pozisyonda ameliyat masasına yatırıldı. Cerrahi bölgenin asepsisi povidon iyot ile sağlandıktan sonra ratların kafa derisinde 15 numaralı bistüri ucu kullanılarak sagittal suturu takip eden 2cm'lik tam kalınlıkta insizyon yapıldı. Yumuşak dokular ve periost kaldırılarak rat kalvaryumuna direkt ulaşım sağlandı. Kritik-boyutlu kalvaryal defekt daha önce tanımlandığı gibi oluşturuldu.(128, 129) Cerrahi loop ile, yavaş hızda bir el matkabı kullanarak, serum fizyolojik irrigasyonu altında parietal orta hatta 5 mm'lik bir kalvaryal kemik defekti oluşturuldu.(130) İşlem esnasında duranın zarar görmemesi için özen gösterildi. Kanama kontrolünün ardından yumuşak dokudaki insizyon rezorbe olabilen sentetik sütür 4.0 vicryl (Pegalak-Doğsan, Türkiye) yardımıyla bölge primer olarak kapatıldı. (Şekil 3.6.- Şekil 3.13.)



Şekil 3.6. Cerrahi öncesi çalışma sahasının tıraşlanması



Şekil 3.7. Cerrahi öncesi hazırlık ve asepsi



Şekil 3.8. Asepsi altında insizyon bölgesi ve subperiostal flap kaldırılması



Şekil 3.9. Defekt sınırlarının oluşturulması



Şekil 3.10. 5mm çapta kemik eksizyonu sonrası defekt sahası



Şekil 3.11. Defekt sahasına Tideglusib eklenmiş ratta(Grup 2) intraoperatif görünüm



Şekil 3.12. Defekt sahasına E-TZF,Ksenogreft ve Tideglusib eklenmiş rat, İntraoperatif görünüm



Şekil 3.13. Postoperatif suture edilmiş rat kalvaryası

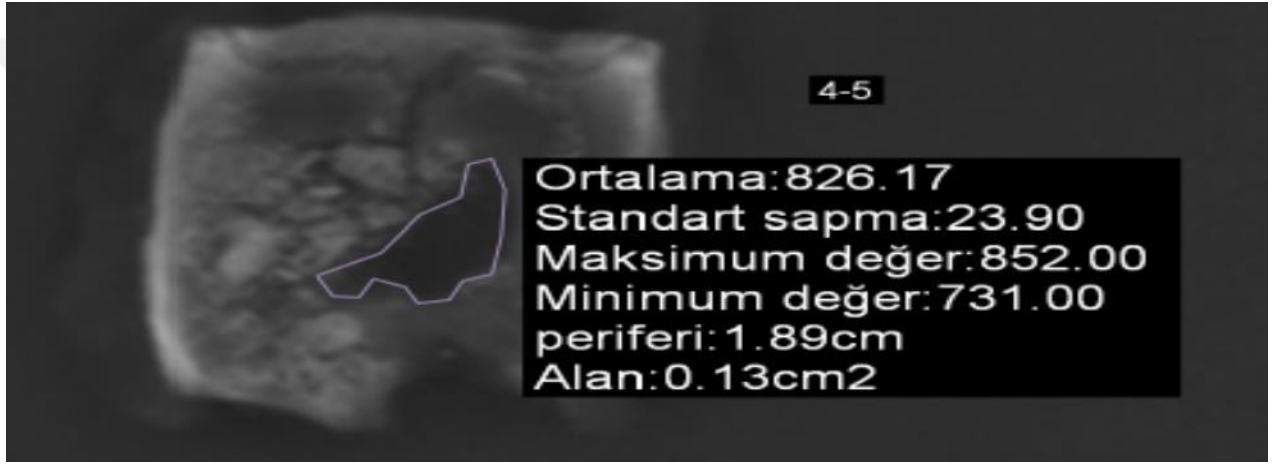
3.4. Operasyon Sonrası Bakım

Postoperatif dönemde antibiyotik 40mg/kg sefalosporin ve analjezik ajan subkütan karprofen (Rimadyl® , Pfizer, New York, Illinois, ABD) 5 mg/kg dozda olacak şekilde 5 gün boyunca tüm deneklere uygulandı. Deneyin 8. haftasında, deneklere IV yüksek doz (150 mg/kg) tiyopental sodyum (Pental®, IE Ulagay, Türkiye) ile genel anestezi protokolü uygulandı ve deneklerde ötenazi gerçekleştirildi.(131, 132) Sonrasında deneklerin kalvaryum kemiklerini içeren kafa kısmı çıkarıldı ve denekler histopatolojik ve histomorfometrik inceleme için hazırlandı.

3.5. Radyografik Analiz

Ötenazi işleminden sonra defekt alanı, komşuluğundaki sağlam kemik dokularla ile çevre dokudan diseke edildi. Doku eksize edildikten sonra radyografik görüntülemeye çevre dokuların artefaktını önlemek için kırıldı ve 3-4 gün boyunca 4°C'de %10 formaldehit-PBS (pH = 7.4) içinde sabitlendi. Kalvarya dokuları bir mikroradyografi ünitesi (X-ray tube: ORIX-65, Ardet®, Istanbul, Turkey. Parameters: 65 kVp, 8 mA, 0.1 s, 30-cm film-focus distance) kullanılarak görüntülendi. Kaset üzerindeki görüntünün dijital ortama

aktarılması için bilgisayarlı radyografi okuyucu (FCR Prima T2, FujiFilm®, Tokyo, Japonya) kullanıldı ve elde edilen görüntüler saklandı. Görüntüler anonimleştirilip randomize edildikten sonra iki gözlemci tarafından bilgisayar yazılımında (Image Intelligence™, FujiFilm®, Tokyo, Japonya) kör ölçümlerle değerlendirildi. Standart sapma, kemik kalsifikasyonun gerçekleşmediği düşünülen radyolusens alan ve bu bölgenin periferinin değeri hesaplandı. Bu veriler istatistiksel analizler için kullanıldı. (Şekil 3.14.)



Şekil 3.14. Radyolusens kemik sahasının sınırları ve bu sahanın alan ölçümü

3.6. Histopatolojik Preparatların Hazırlanması ve Analizi

Rat kalvaryumdan alınan defekt alanı örnekleri %10'luk nötral formalin solüsyonunda 48 saat süreyle fikse edildikten sonra %5'lik nitrik asit solüsyonu ile dekalsifiye edilmiş kapalı sistem doku takibine alındı. Dekalsifikasyon sonrası örnekler parafin bloklara gömüldü. Parafin bloklardan hazırlanan 4 mikronluk kesitler hematoxilen&eoizin (H&E) boyası ile boyanarak ışık mikroskopik olarak incelemeye alındı. Elde edilen kesitlerde, bilgisayarlı dijital kameraya (AxioCam MRc, Carl Zeiss Microscopy, LLC, New York) bağlı ışık mikroskobu (Axioscope 2 Plus, Carl Zeiss Microscopy, LLC, New York) altında sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapımı alanları ile hiposellüler, kompakt kemikten oluşan matür kemik alanları tespit edildi. Alanlar belirlendikten sonra görüntüler x40 büyütmede kaydedildi.

3.7. Histomorfometrik İnceleme

Işık mikroskobuyla kaydedilen görüntüler deePatho morfometrik alan işaretleme programı ile eski ve kemik alanları işaretlenerek, görüntü işleme programı (AxioVision Release 4.8.2(06-2010), Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena,Almanya) ile μm^2 biriminde total alan hesaplaması yapıldı.

3.8. İstatistiksel Analiz

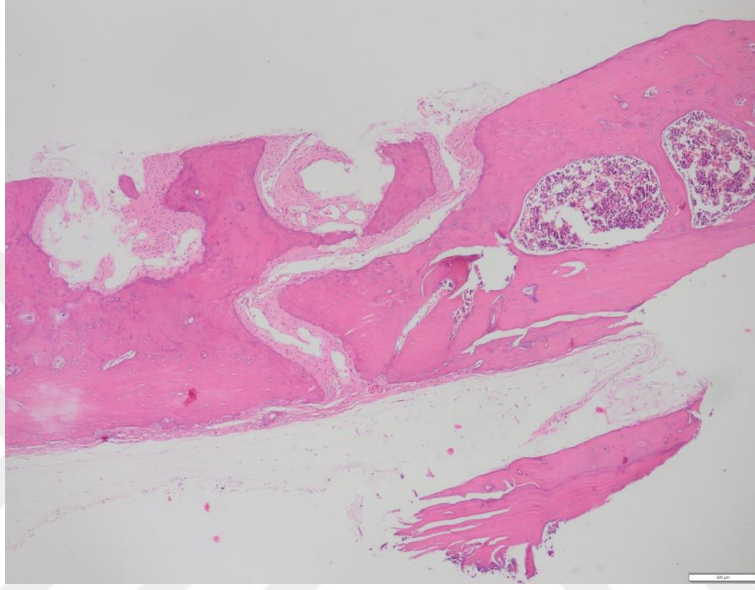
Araştırmadaki verilerin istatistiksel analizleri için SPSS Windows 25.0 bilgisayar paket programı kullanıldı. Sayısal değişkenlerin normal dağılıma sahip olup olmadığını incelemek amacıyla histogram ve olasılık grafiklerinden ve Kolmogorov-Smirnov testinden faydalanıldı. Normal dağılım gösteren verilerin tanımlayıcı istatistikleri için ortalama ve standart sapma($\bar{x} \pm SS$) değerleri, normal dağılım göstermeyen veriler için ise ortanca(median) ve çeyrekler arası aralıklar (%25-75) kullanıldı. Ölçeklerin güvenilirlik incelemesi için; test-tekrar test, gözlemci içi ve gözlemciler arası güvenilirlik için sınıf içi korelasyon katsayısı (Intraclass correlation coefficient-ICC) değerleri, iç tutarlılık hesapları için de Cronbach Alfa katsayısı analiz edildi. (133)

Tablo 3.1. İstatistiksel anlamlılık düzeyleri ve katsayıları (133)

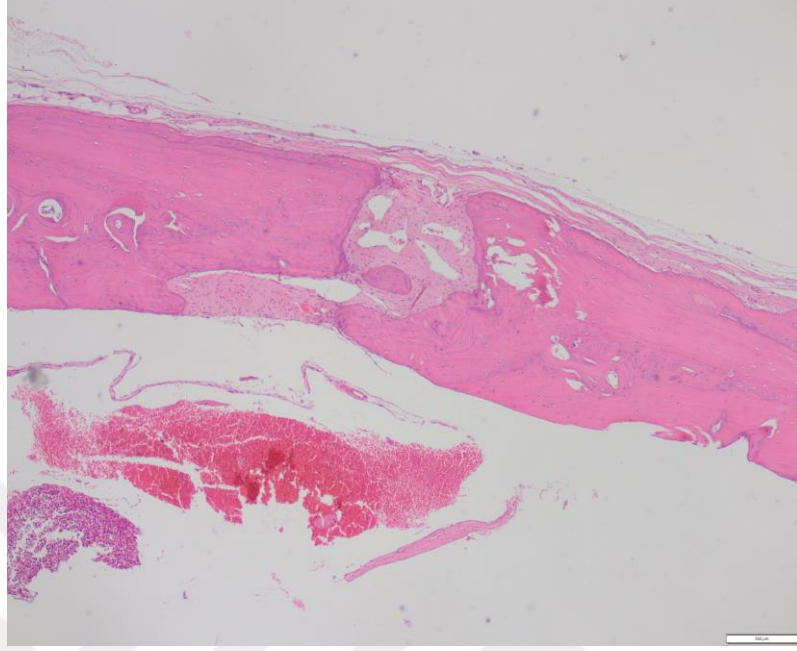
Kullanılan Katsayılar	Düzeyi
Sınıf İçi Korelasyon Katsayısı (ICC)	
1,00-0,90	Mükemmel
0,90-0,75	İyi
0,75-0,50	Orta
<0,50	Zayıf
Cronbach Alfa Katsayısı	
1,00-0,90	Mükemmel
0,90-0,80	İyi
0,80-0,70	Kabul Edilebilir
0,70-0,60	Şüpheli
0,60-0,50	Zayıf
<0,50	Kabul Edilmez

4.BULGULAR

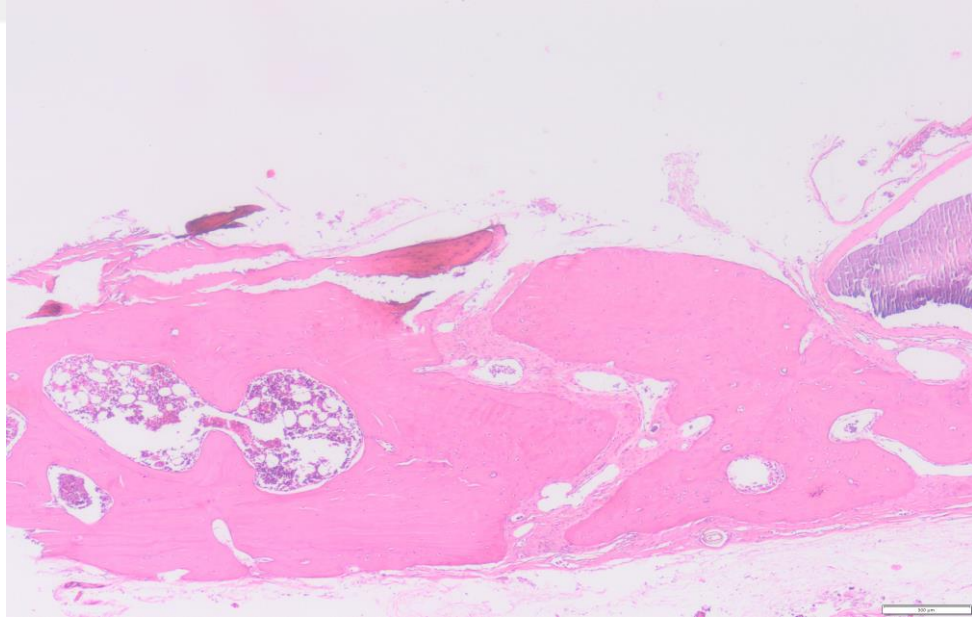
4.1. Histopatolojik ve Histomorfometrik Bulgular



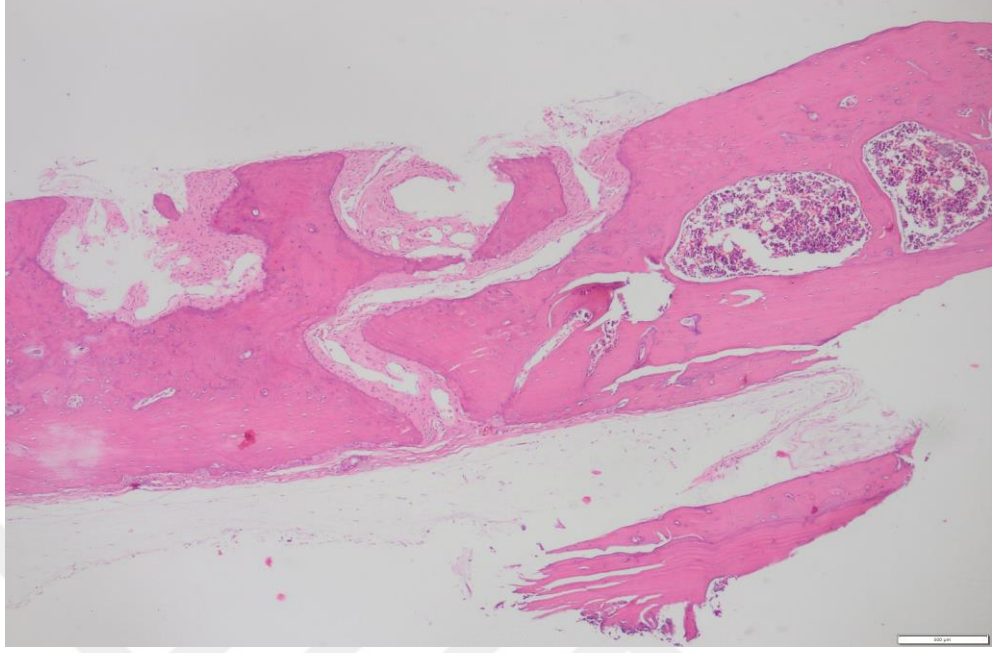
Şekil 4.1. Grup 1 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40)



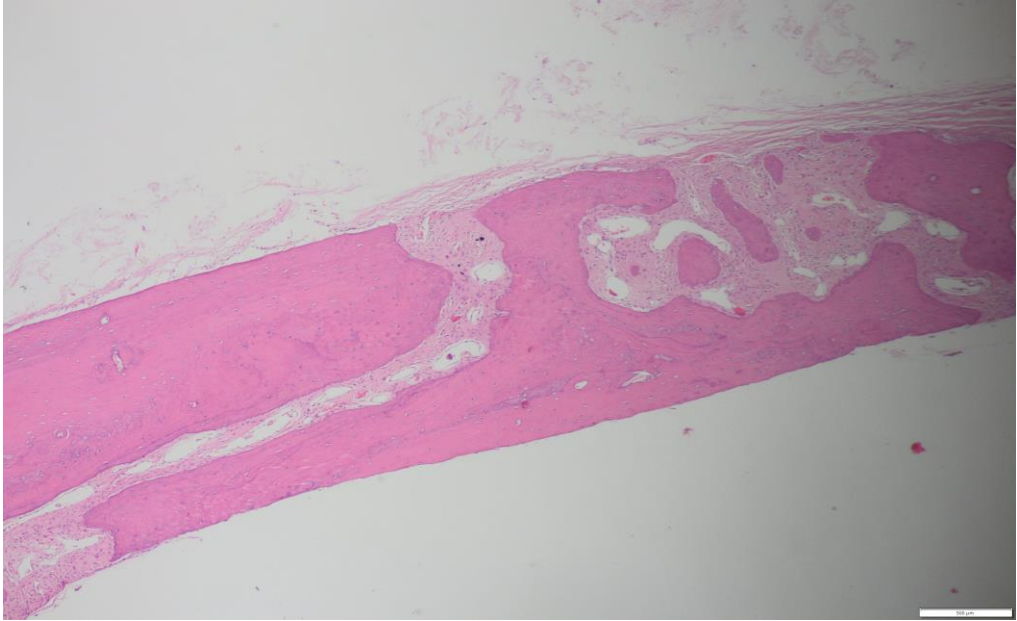
Şekil 4.2. Grup 2 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40)



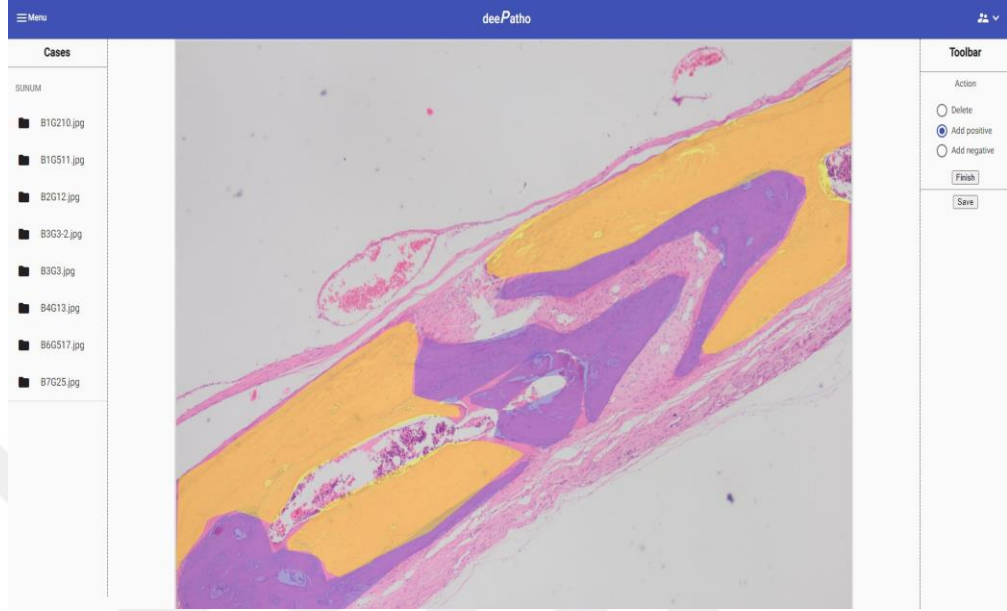
Şekil 4.3. Grup 3 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40)



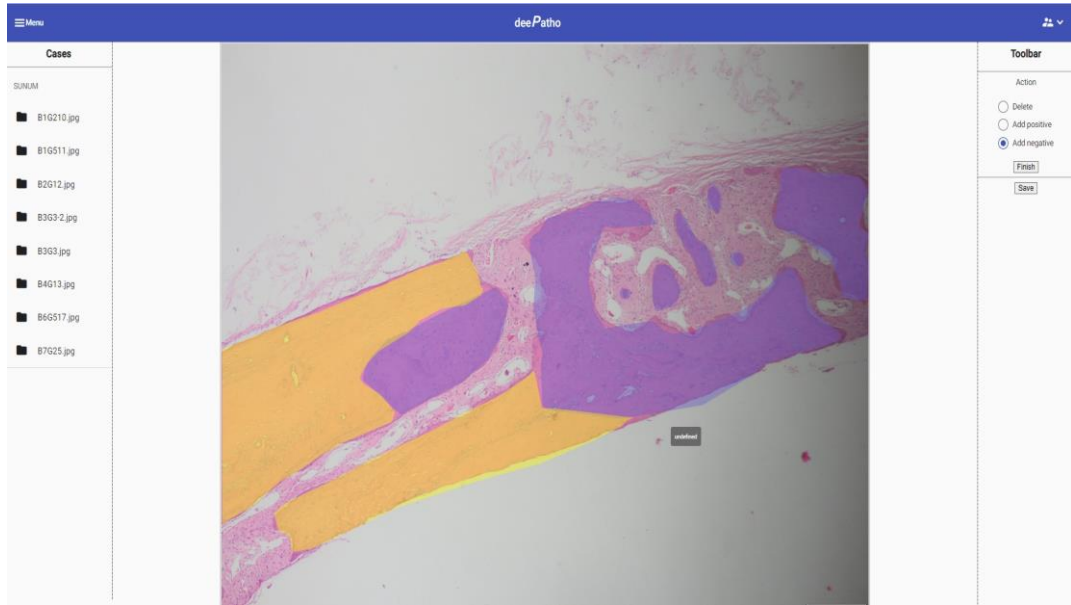
Şekil 4.4. Grup 4 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40)



Şekil 4.5. Grup 5 sellüler, osteoblastik aktivite gösteren yeni kemik yapım alanları ile hiposellüler kompakt kemikten oluşan matür kemik alanlarının izlendiği ışık mikroskopik görünüm (H&E, x40)



Şekil 4.6. Grup 2 yeni kemik yapım alanları mavi, matür kemik alanları sarı ile morfometrik olarak işaretlenmiştir. (H&E , X40)



Şekil 4.7. Grup 5 yeni kemik yapım alanları mavi, matür kemik alanları sarı ile morfometrik olarak işaretlenmiştir. (H&E , X40)

Pozitif alan değeri 5.grupta en yüksek düzeyde olup, bunu sırasıyla 4. grup, 3. grup, 2. grup ve kontrol grubu izlemekteydi. Negatif alan değeri kontrol grubunda en yüksek düzeyde olup, bunu sırasıyla 2. grup, 3. grup, 5. grup ve 4. grup izlemekteydi. Toplam alan değeri 5.grupta en yüksek düzeyde olup, bunu sırasıyla 4. grup, 3. grup, 2. grup ve kontrol grubu izlemekteydi. Fark analizi sonuçları ise pozitif ve toplam alan değerlerinin gruplar arasındaki farklarının istatistiksel olarak anlamlı olduğunu gösterdi. (Tablo 4.1)

Tablo 4. 1. Deney ve kontrol gruplarının pozitif ve negatif alan değerleri ile fark analizi sonuçları

	Kontrol	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	p değeri a
	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	
Pozitif	15282.01±12745.02	16517.70±13130.57	19213.31±16608.88	23623.81±20560.21	43881.77±29571.92	0.000
Negatif	24773.69±24559.27	22683.48±18913.23	22666.77±19548.00	19148.48±19722.55	21948.34±24200.82	0.428
Toplam	40055.70±29301.04	39201.18±24099.41	41880.08±23632.57	42772.30±27564.78	65830.10±36529.25	0.000

a. Kruskal Wallis Testi, SS: Standart Sapma. Kontrol: Jelatin Sünger, Grup 2: Tideglusib+Jelatin Sünger, Grup 3: Tideglusib + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 4: E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 5: Tideglusib + E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger

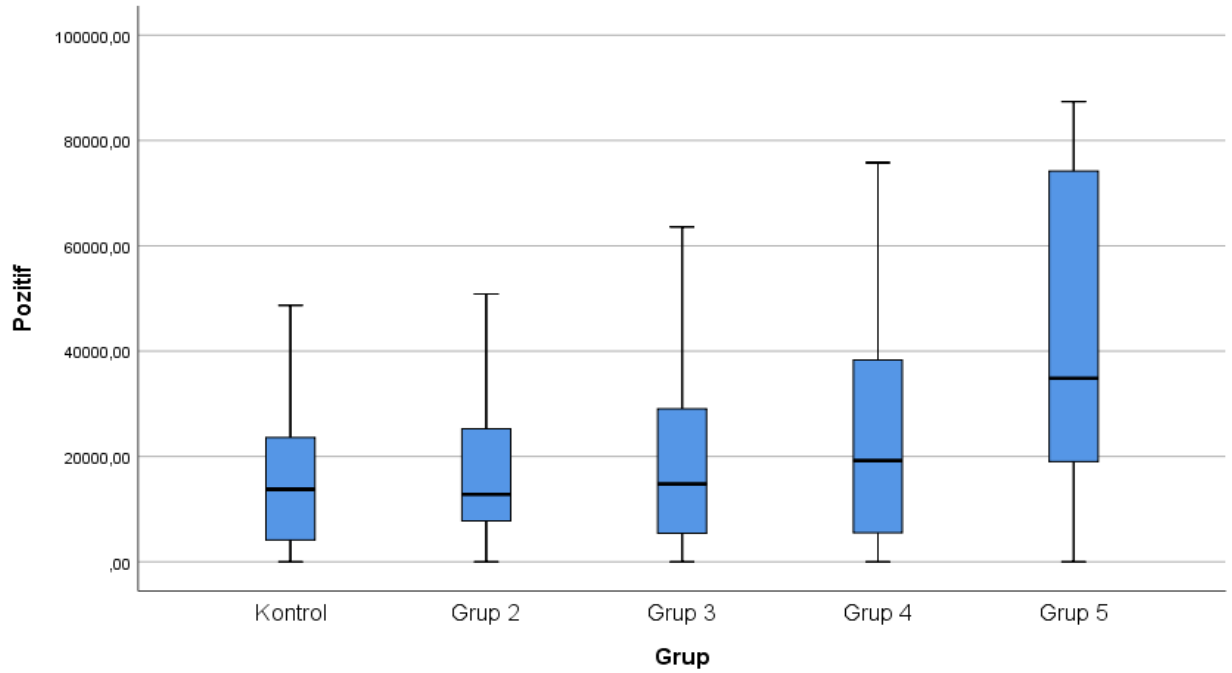
Deney ve kontrol gruplarının pozitif alan değerlerinin arasındaki farkın ikili gruplar arasında kıyaslanması için yapılan Post Hoc test sonuçlarına göre kontrol-4. grup, kontrol-5. grup, 2. grup-5. grup, 3. grup-5. grup ve 4. grup 5. grup arasında anlamlıydı ($p<0.05$). Toplam alan değerlerinin ise kontrol-5. grup, 2. grup-5. grup, 3. grup-5. grup ve 4. grup 5. grup arasındaki farklar anlamlıydı ($p<0.05$). Bunların dışındaki tüm ikili grup farkları istatistiksel olarak anlamlı değildi. ($p>0.05$) (Tablo 4.2)

Tablo 4. 2. Deney ve kontrol gruplarının pozitif ve negatif alan değerlerinin arasındaki farkın ikili gruplar arasında kıyaslanması için yapılan Post Hoc test sonuçları (p değerleri)

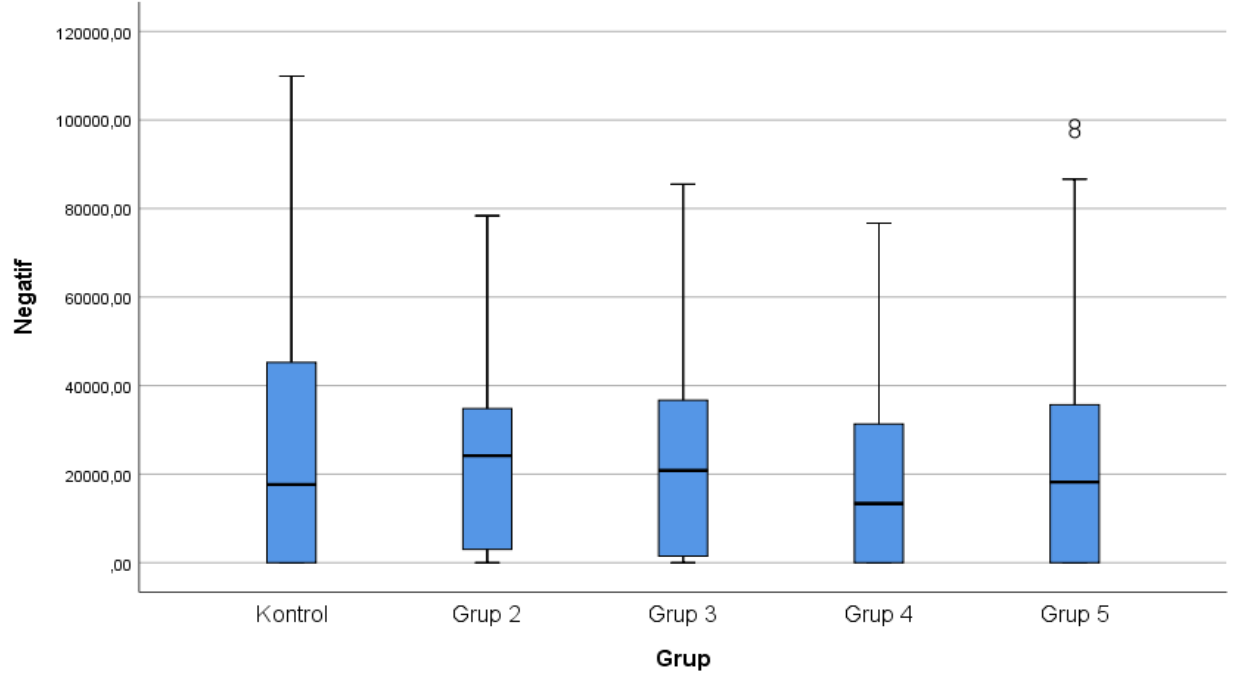
	Pozitif ^a	Negatif ^a	Toplam ^a
Kontrol-Grup 2	0.632	0.884	0.990

Kontrol-Grup 3	0.185	0.852	0.567
Kontrol-Grup 4	0.012	0.151	0.457
Kontrol-Grup 5	0.000	0.284	0.000
Grup 2-Grup 3	0.535	0.746	0.479
Grup 2-Grup 4	0.090	0.143	0.423
Grup 2-Grup 5	0.000	0.302	0.000
Grup 3-Grup 4	0.253	0.152	0.772
Grup 3-Grup 5	0.000	0.335	0.000
Grup 4-Grup 5	0.000	0.755	0.000

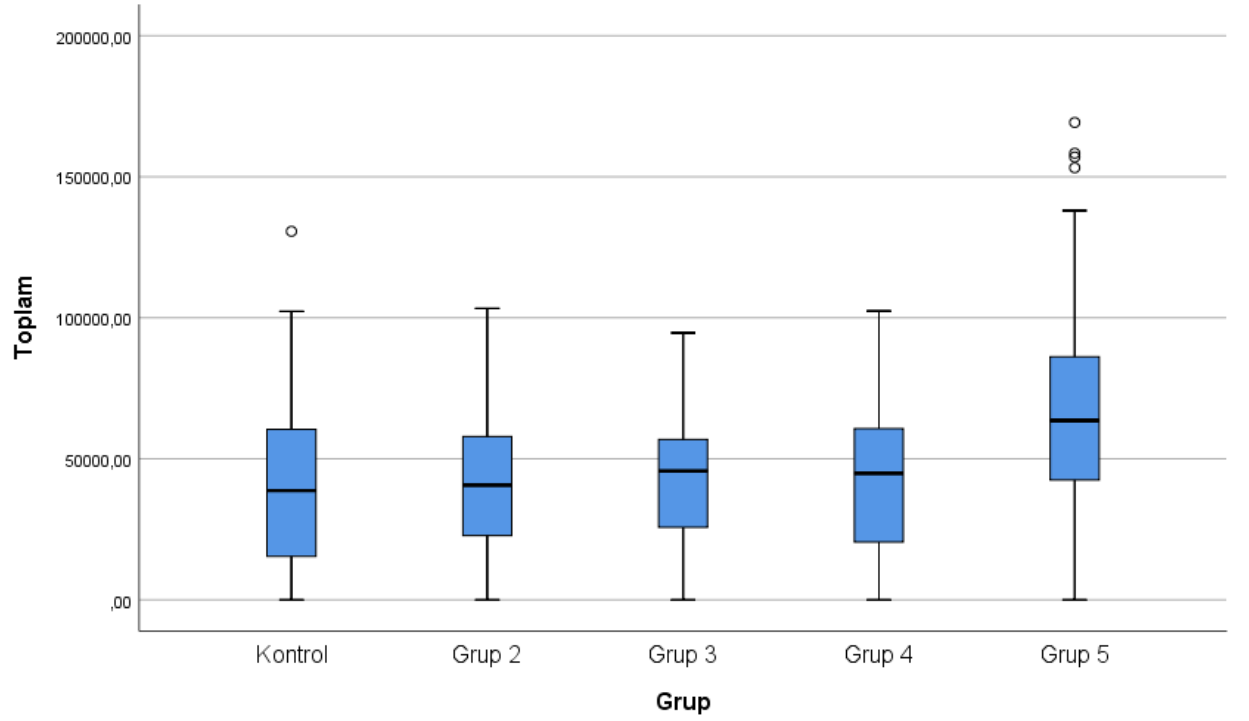
a. Mann Whitney U Testi. Kontrol: Jelatin Sünger, Grup 2: Tideglusib+Jelatin Sünger, Grup 3: Tideglusib + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 4: E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 5: Tideglusib + E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger



Şekil 4.8. Pozitif alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları



Şekil 4. 9. Negatif alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları



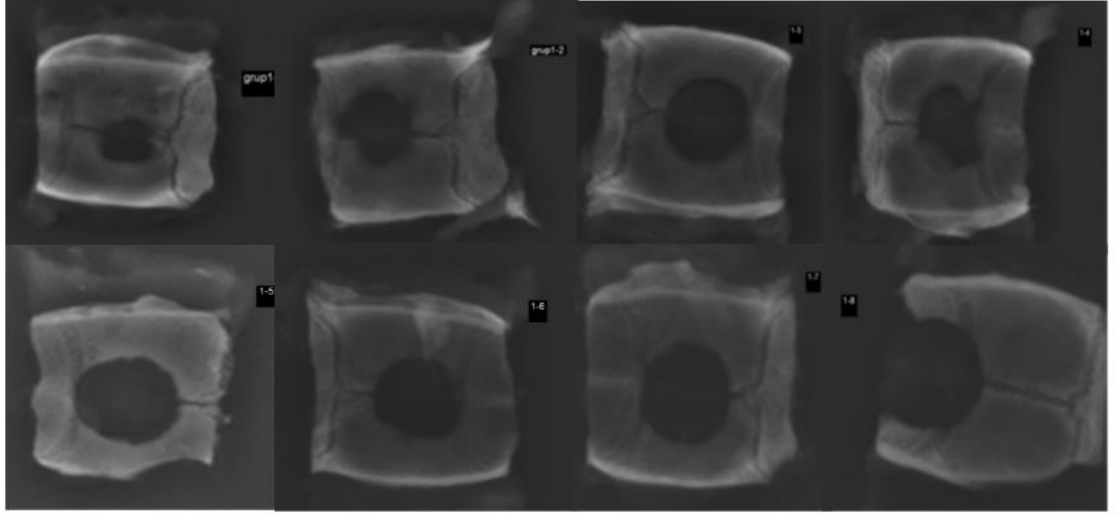
Şekil 4. 10. Toplam alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları

Histomorfometrik çalışmada pozitif alan ölçümleri Grup 5'te en fazla olmak üzere bunu sırasıyla Grup 4, Grup 3, Grup 2 ve Grup 1'in takip ettiği tespit edildi. Çalışma gruplarında ölçülen pozitif alan ölçümlerinde anlamlı fark tespit edildi ($p<0,000$).

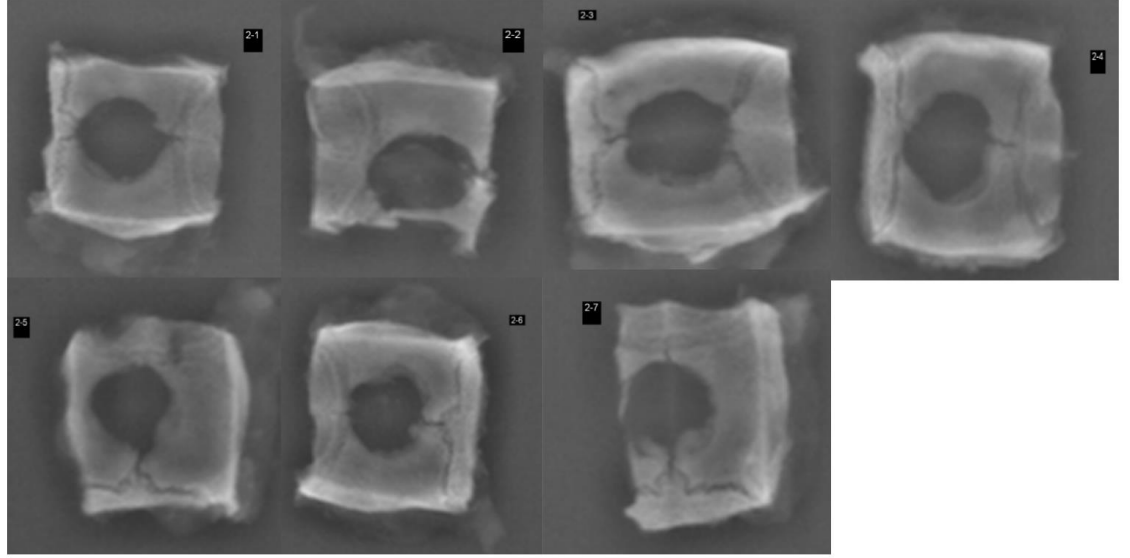
Çalışmada negatif alan ölçümleri kontrol grubunda en yüksek düzeyde olup, bunu sırasıyla 2. grup, 3. grup, 5. grup ve 4. grup izlemekteydi. Çalışma gruplarında ölçülen toplam alan ölçümlerinin farklı olmadığı tespit edildi. ($p<0,428$)

Çalışmada toplam alan ölçümleri değerleri 5.grupta en yüksek düzeyde olup, bunu sırasıyla 4. grup, 3. grup, 2. grup ve kontrol grubu izlemekteydi. Çalışma gruplarında ölçülen toplam alan ölçümlerinde anlamlı fark tespit edildi ($p<0,00$).

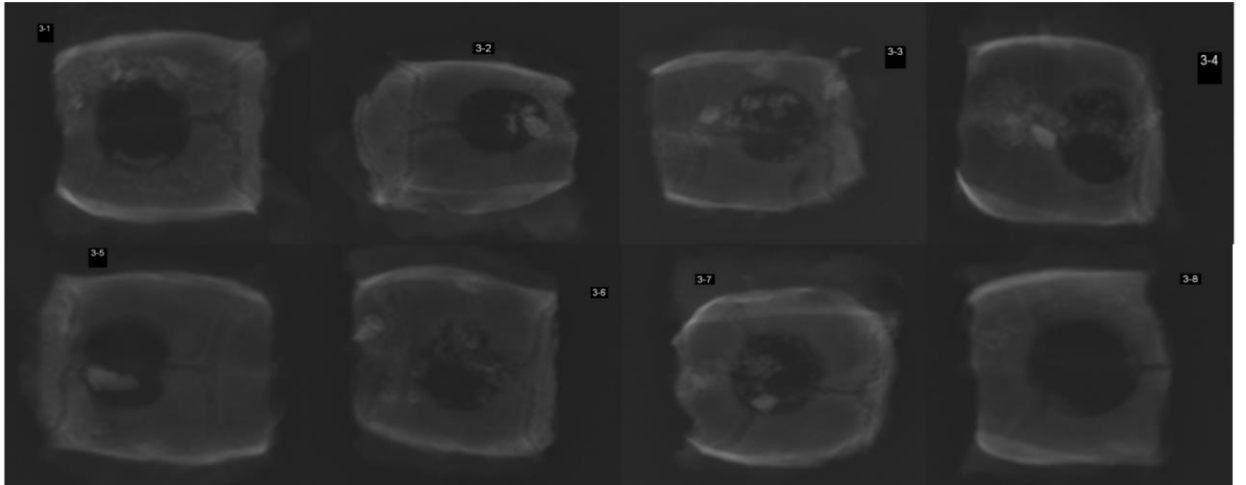
4.2. Radyografik Tarama ve Morfometrik Bulgular



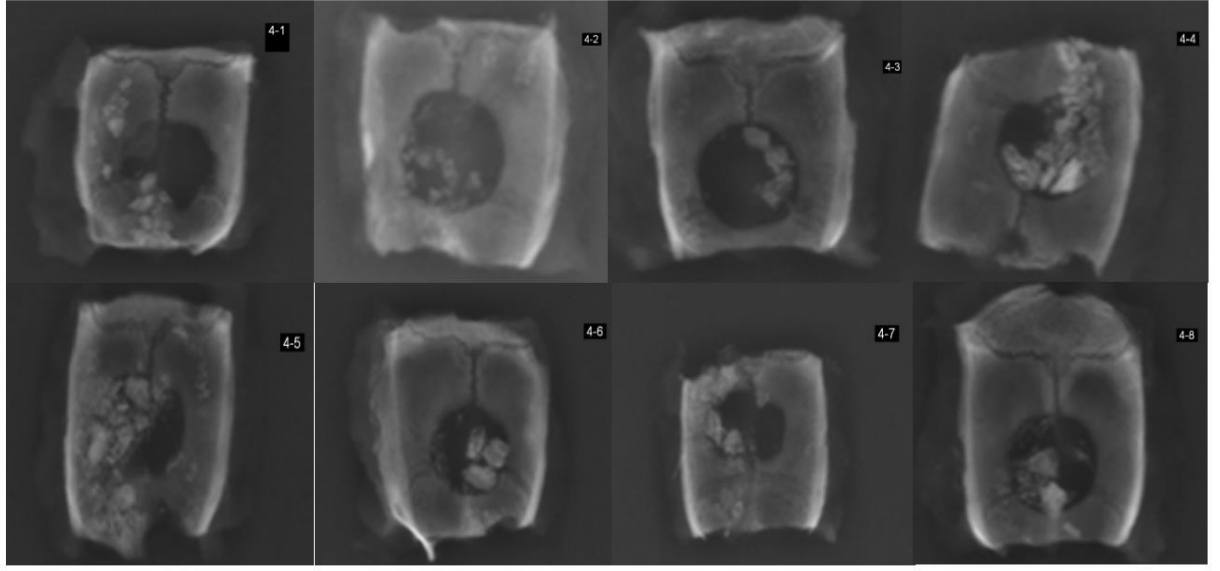
Şekil 4.11. Grup 1 postoperatif radyografik görünüm



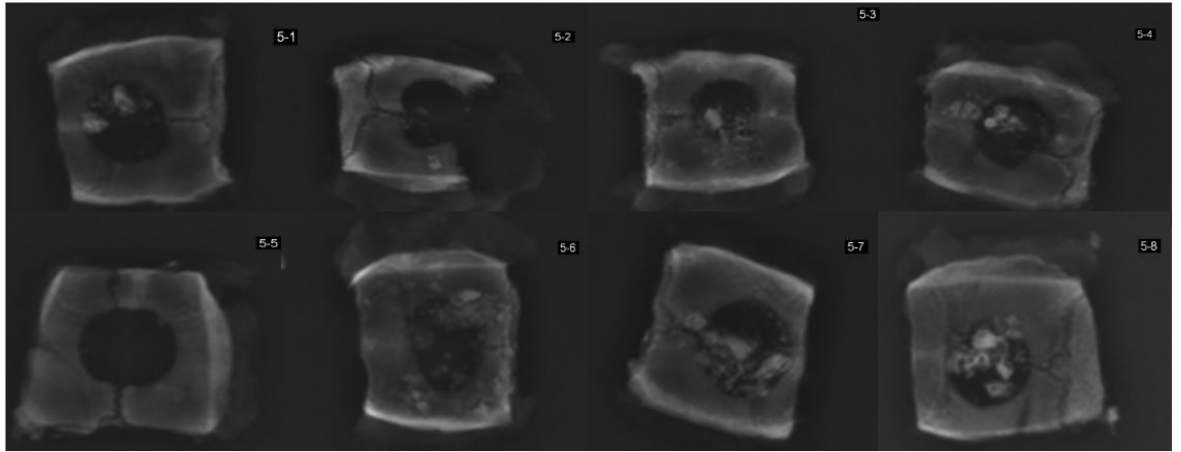
Şekil 4.12. Grup 2 postoperatif radyografik görünüm



Şekil 4.13. Grup 3 postoperatif radyografik görünüm



Şekil 4.14. Grup 4 postoperatif radyografik görünüm



Şekil 4.15. Grup 5 postoperatif radyografik görünüm

Radyoloji görüntülerinde periferi ve alan değerleri kontrol grubunda en yüksek düzeyde olup, bunu sırasıyla 1. grup, 2. grup, 3. grup, 4. grup ve 5. grup izlemekteydi. Fark analizi sonuçlarına göre periferi ve alan değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0.05$) (Tablo 4.6).

Tablo 4. 3. Kemikleşme radyolojik değerlendirme ve olgu grupları arasındaki fark analizi sonuçları

Grup	Kontrol	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5	p değeri
	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	X±SS	
Periferi	2.49±0.32	2.44±0.39	2.36±0.72	2.09±0.53	1.73±0.52	0.000 ^a
Alan	0.31±0.07	0.24±0.06	0.20±0.07	0.17±0.06	0.13±0.06	0.000 ^b

a. One Way ANOVA Testi, b. Kruskal Wallis Testi, , SS: Standart Sapma. Kontrol: Jelatin Sünger, Grup 2: Tideglusib+Jelatin Sünger, Grup 3: Tideglusib + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 4: E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 5: Tideglusib + E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger

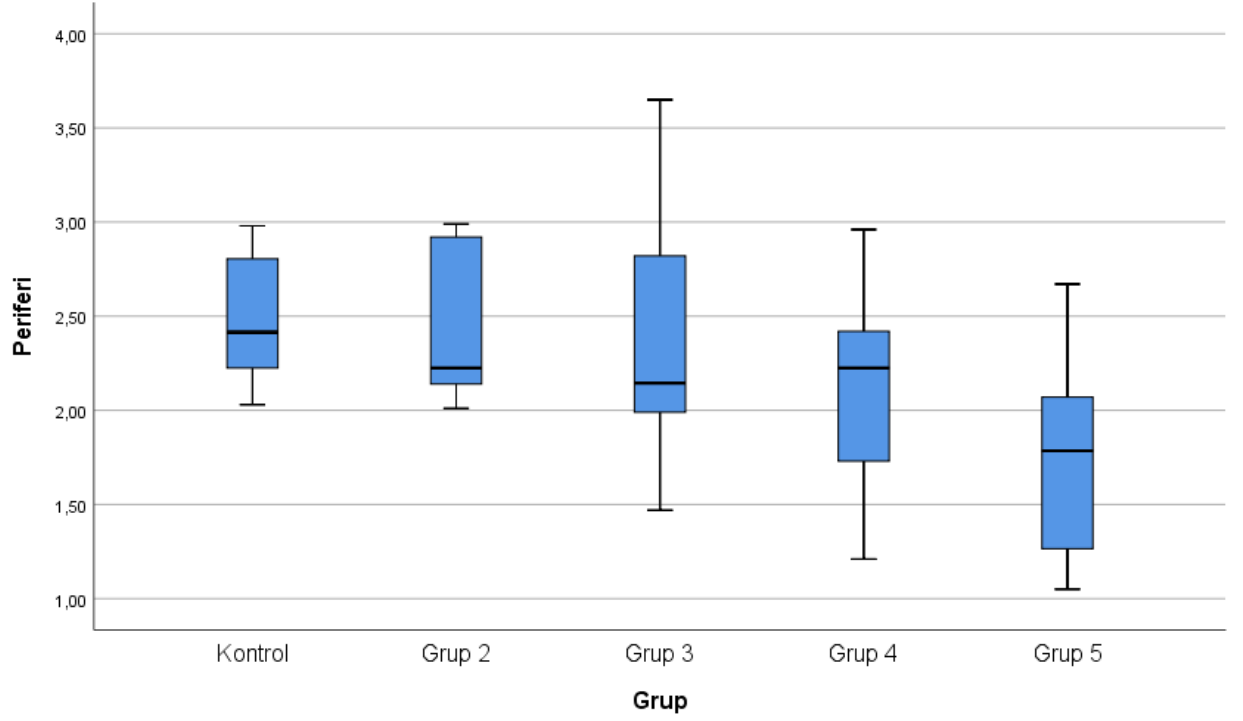
Deney ve kontrol gruplarının kemik ölçüm parametrelerinin arasındaki farkın ikili gruplar arasında kıyaslanması için yapılan Post Hoc test sonuçlarına göre periferi parametresi kontrol-5. grup, 2. grup-5. grup ve 3. grup 5. grup arasında anlamlıydı ($p<0.05$). Alan parametre farkı 2.grup-3. grup ve 3. grup-4. grup dışındaki tüm ikili kıyaslamalarda anlamlıydı (Tablo 4.7).

Tablo 4. 4. Deney ve kontrol gruplarının kemik ölçüm parametrelerinin arasındaki farkın ikili gruplar arasında kıyaslanması için yapılan Post Hoc test sonuçları (p değerleri)

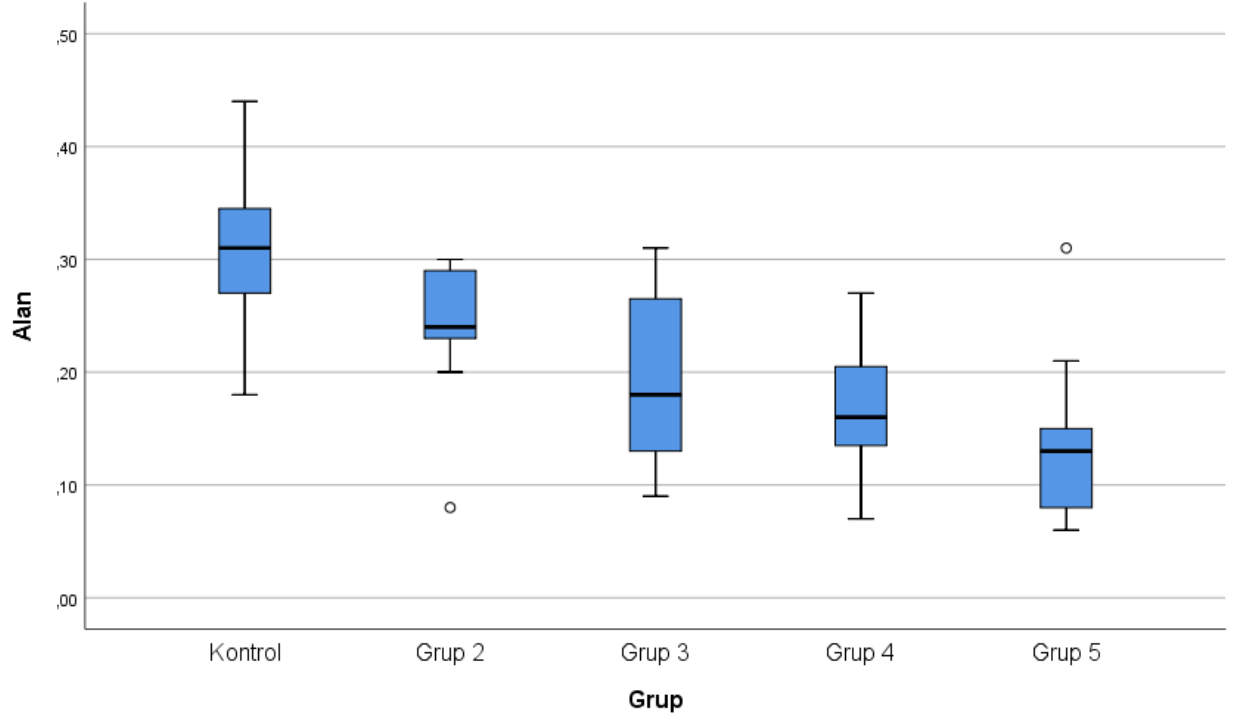
	Periferi ^a	Alan ^b
Kontrol-Grup 2	0.999	0.012
Kontrol-Grup 3	0.943	0.000
Kontrol-Grup 4	0.200	0.000
Kontrol-Grup 5	0.001	0.000
Grup 2-Grup 3	0.990	0.093
Grup 2-Grup 4	0.360	0.002
Grup 2-Grup 5	0.003	0.000
Grup 3-Grup 4	0.614	0.402

Grup 3-Grup 5	0.009	0.015
Grup 4-Grup 5	0.281	0.039

a. Tukey Testi, b. Mann Whitney U Testi. Kontrol: Jelatin Sünger, Grup 2: Tideglusib+Jelatin Sünger, Grup 3: Tideglusib + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 4: E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger, Grup 5: Tideglusib + E-TZF + Ksenojen Greft + Jelatin Sünger



Şekil 4. 16. Radyografi ölçümü periferi değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları



Şekil 4. 17. Radyografi ölçümü alan değerinin gruplar arasındaki dağılımı ve farkları

Çalışmada perifer ve alan değerleri kontrol grubunda en yüksek düzeyde olup, bunu sırasıyla 1. grup, 2. grup, 3. grup, 4. grup ve 5. grup izlemekteydi. Fark analizi sonuçlarına göre perifer ve alan değerleri arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p < 0.05$)

5.TARTIŞMA

Çene ve yüz bölgesindeki kemik defektleri; konjenital, periodontal hastalıklar, enfeksiyon, neoplazm, travma veya cerrahi operasyonlar sonrası oluşan deformiteler gibi sebeplerle meydana gelmektedir. Bu defektlerden dolayı estetik, fonksiyonel hatta fonasyonel problemler sıkça oluşabilmektedir. Bu yüzden kemik defektlerinin rekonstrüksiyonuyla ilgili olarak yapılan çalışmalar oral ve maksillofasiyal cerrahide büyük öneme olup, ogmentasyon ve rejeneratif tedavi prosedürleri ile alakalı çalışmalar her geçen gün daha da artarak devam etmektedir.

Oral ve maksillofasiyal cerrahide kist, tümör, ileri implant cerrahileri, travma, kronik enfeksiyon gibi kazanılmış ya da konjenital defektlerin tedavisi için kemik doku kazanımına yönelik genellikle kemik greftleri kullanılmaktadır. Günümüzde farklı özellikte greft materyalleri klinik olarak kullanıma girmesine rağmen greft materyallerinden beklenen özellikleri tek başına taşıyan bir greft materyali henüz bulunamamış olup bu alanda çalışmalar devam etmektedir. Bu çalışmaların temel amacı kemik doku fonksiyonunun yeniden kazandırılması, idamesi ve şekillenmesi için doğal kemik dokusunun fiziksel ve biyolojik özellikleri ile uyuşan materyaller üretmektir.(134) Bu açıdan bakıldığında kemik defekti modelleri, biyomalzemelerin deneysel olarak test edilmesinde çok önemli bir rol oynamaktadır.(135) Günümüzde otojen greftler minimal düzeyde antikor cevabı, yüksek düzeyde anjiyogenez ve osteojenitesi ile altın standart olarak görülmektedir. Otojen greftler osteokondüktif ve osteoindüktif özellikleri taşıyan diğer greft türlerinden farklı olarak osteogenezise de katkıda bulunur.(89, 100) Ancak donör saha morbiditesi, hızlı rezorpsiyon özellikleri bu greft türünün dezavantajları arasında yer almaktadır.(136)

Allogreftler ve ksenogreftler gibi doğal materyaller otojen greftlere alternatiftirler. Allogreftler, büyük kemik defektlerini onarmak için kullanılabilir, ancak bu greft tipinin bulaş riskinin yüksek olması, bağışıklık sisteminin cevabı sonucu greftin vücut tarafından reddedilmesi ve etik kaygılar gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ksenogreftlerin ise yüksek rezorpsiyon hızı ve inflamatuvar cevap riski nedeniyle kemik iyileşmesini olumsuz etkileyebilme, zoonotik hastalıklar gibi dezavantajları bulunmaktadır. Ancak son

zamanlarda tüm bu dezavantajlarına rağmen ksenogreftler kolay ulaşılabilirliği ve düşük maliyetli olmaları nedeniyle otojen ve allogreftlerden daha popülerdirler.(137)

Hayvansal kaynaklı ksenogreftler osteoblastların büyümesi için yapı iskelesi görevi görürler ve yeni kemik oluşumu için alan sağlarlar. Ayrıca minimum kontaminasyon riski taşıdıkları ve donör saha morbiditesi gibi dezavantajları olmadığından diğer greftlere göre daha avantajlıdır.(135)

Çalışmamızda bu nedenle kemik rejenerasyonunu incelemek için kemik grefti kullandığımız gruplarda, işlem sonrası yara bakımı ve enfeksiyon riski taşıyan bölgelerin minimuma indirilmesi amacıyla yavaş rezorbe olan, osteokondüktif özellikleri olan sığır kaynaklı ksenogreft tercih ettik. Kullandığımız deproteinize sığır kemiği minerali (DBBM) biyouyumlu materyaller olan ksenogreftlerin en sık kullanılan çeşitlerinden biridir.(138)

Daha önce yapılan çalışmalarda ksenogreftlerin osteoindüktif etkisiyle ilgili bir görüş birliği sağlanamamıştır. Ksenogreftler yavaş rezorbe olan, hidroksiapatit kristalleri arasındaki mikropor ve mikropartiküller aracılığıyla organik bir iskelet sağlayan, osteokondüktif özellikteki biyomateryaller olduğu yönündedir. Mikropor ve mikropartiküller osteoblast ve kan hücrelerinin migrasyonunu sağlayarak bu materyale yüksek osteokondüktif özellik kazandırmaktadır.(139)

Köpeklerde yapılan bir çalışmada oluşturulan defektlere ksenogreft uygulanmış ve 3. ve 7. aylarda histolojik örnekler alınmıştır. Sonuçlar ksenogreftin osteokondüktif özelliğini yerine getirdiğini ve yerini yeni kemik dokusuna bırakmaya başladığını göstermiştir.(140) Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada, sinüs ogmentasyonunun başarısında ksenogreft ve otojen greft kullanımı karşılaştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda yeni kemik oluşumunun, otojen greft uygulanan bölgelerde sığır kaynaklı ksenogreft uygulanan bölgeye kıyasla daha fazla olduğu, ksenogreft uygulanan bölgede greft hacmindeki azalmanın daha az olduğu ve ksenogreftlerin yavaş rezorbe olan osteokondüktif bir materyal olduğu raporlanmıştır.(141)

Yapılan çalışmaların çoğunda ksenogreftlerin biyouyumlu ve osteokondüktif olduğunu gösterilmesine karşın, bazı çalışmalarda ksenogreftlerin istenmeyen ve olumsuz etkileri öne sürülmüştür.(142) Ksenogreftlerin kemik iyileşmesine pozitif yönde etkisinin olduğunu rapor eden çalışmaların yanında bunun tam tersini öne süren çalışmalar da vardır. Bu çalışmalarda greft partiküllerinin kemikten ayrı olarak, bağ dokusu ile çevrili olduğu ve hatta osteokondüktif etki göstermediği vurgulanmıştır.(143)

Ksenogreftlerin osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerinin değerlendirildiği bir rat kalvaryal defekt modelinde, bu greft materyallerinin osteoindüktif ve osteokondüktif etkilerinin olmadığı bildirilmiştir.(144) Donos ve ark. yaptıkları bir çalışmada deproteinize sığır kaynaklı kemik greftlerin tek başına veya mine matriks grefti ile birlikte uygulandığında kemik oluşumunu sağlamada yetersiz olduğunu raporlamışlardır.(145) Başka bir çalışmada DBMM'nin biyolojik faktörlerin eksikliğinden dolayı osteoindüksiyon ve osteogenezis yapamadığı ve kemik rejenerasyonunu kendi başına aktive edemeyeceği öne sürülmüştür.

Ksenogreftlerin sahip olduğu oldukça uzun rezorpsiyon süresi, yeni kemik oluşumunu geciktirir ve greft iyileşme süresini uzatır ve osteojenik hız ile senkronize olamaz. Bu nedenle, greft materyalini büyüme faktörlerini içeren biyolojik bir ajan ile kullanmanın greft iyileşme süresini azaltabileceği ve kemiğin yeniden şekillenmesinin osteoindüktif süreci arttırabileceği öne sürülmüştür.(138) Kemik defektlerinde rejenerasyon için TZF'nin diğer materyallerle birlikte kullanımının TZF'nin tek başına kullanımına göre daha etkili olduğu kanıtlanmıştır.(146) TZF'nin osteoindüktif ve/veya osteokondüktif özellikleri sayesinde genellikle kemik remodelasyonunu arttırabildiği,(147) periodontal rejeneratif cerrahi prosedürlerde yumuşak doku iyileşmesini hızlandırdığı bilinmektedir.(148-150) Ayrıca, TZF'nin otojen kemik greftleriyle birlikte uygulandığında, azalmış kemik rezorpsiyonu ve artmış kemik hacmi ve kalitesi açısından umut verici sonuçlar gösterdiği rapor edilmiştir.(151, 152) TZF'nin tek başına kullanıldığı başka bir araştırmada kemik yıkımını azalttığı bildirilmiştir.(153)

Kök dere ve ark.(154) tavşan tibiasında oluşturdukları kemik defektinde TZF ve TZF/otojen greft etkilerini histomorfometrik olarak değerlendirmişlerdir. Çalışmanın

sonunda araştırmacılar TZF'nin tek başına veya otojen kemik grefti ile kullanıldığında kemik defektlerinin iyileşmesini hızlandırdığını, yeni kemik alanı değerlerindeki artışta TZF kullanımının önemli bir fayda sağladığını raporlamışlardır. Lee ve ark.(155) yaptıkları bir çalışmada benzer şekilde tek başına otojen kemik kullanmak yerine TZF ile karıştırılmış otojen kemiğin kullanılmasının klinik sonuçlarının daha iyi olduğunu öne sürmüşlerdir. Yapılan bir çalışmada, tavşan kalvaryal defektlerinde TZF ile kombine otojen ve deproteinize sığır greft materyallerinin kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisi radyografik dansitometri ve histomorfometrik analiz ile değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda TZF'nin tek başına veya otojen kemikle birlikte kullanıldığında kemik oluşumu üzerinde olumlu bir etkisinin olduğu ancak deproteinize edilmiş sığır kemiği ile kombinasyonunun etkili olmadığı bildirilmiştir.(156)

Yapılan bazı deneysel çalışmalarda sentetik greft materyallerinin TZF ile kullanımı sonucu yeni kemik oluşumunda artış görüldüğü ve TZF'nin kemik rejenerasyonunda pozitif etkiye sahip olduğu raporlanmıştır.(157) Nacopulos ve ark.(158), hayvan modelinde tek başına TZF'nin iyileştirici özelliklerini TZF'nin sentetik greft materyaline ilave formu ile karşılaştırmışlar, sentetik greft materyaline TZF ilavesinin yeni kemik oluşumunu önemli ölçüde artırdığını ve kemik rejenerasyonu için etkili bir ajan olduğunu bildirmişlerdir. Yine koyun tibiasında yapılan başka bir çalışmada TZF ile birlikte uygulanan bifazik kalsiyum fosfatın kemik oluşumunu arttırdığı histomorfometrik olarak gösterilmiştir.(159)

Özdemir ve ark.(160) TZF'nin kemik büyümesi üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri hayvan çalışmasında TZF ve ksenogreftin, 3 aylık takip öncesinde diğer iki gruba göre daha fazla yeni kemik oluşumunu indüklediğini raporlamıştır. Başka bir çalışmada araştırmacılar ksenogreftle kombine TZF'nin sıçanların kalvariasındaki kemik defektleri üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve TZF'nin sadece ksenogreft ile birlikte kullanıldığında kemik rejenerasyonu üzerinde olumlu bir etkisi olduğu sonucunu bildirmişlerdir.(161)

Farklı greft malzemelerine trombosit ürünleri eklendiğinde, kemik ogmentasyon işlemlerinden sonra daha öngörülebilir bir sonuç elde edilmektedir.(156) Doku mühendisliğindeki son gelişmelerle büyüme faktörü konsantrasyonunu artırmak ve geleneksel TZF'ye kıyasla üstün rejeneratif potansiyel sağlamak amacıyla santrifüj kuvvetlerinin değiştirilmesiyle hem sert hem de yumuşak doku rejenerasyonunu indükleyebilen lökositlerle zenginleştirilmiş bir trombosit konsantresi olarak E-TZF geliştirilmiştir.(162) Lökositler, anti-enfeksiyöz etkilerinin yanı sıra interlökin (IL) -1 β , IL-6, IL-4 ve tümör nekrozu faktör alfa (TNF- α) gibi anahtar immün sitokinlerin salgılanması yoluyla immün regülasyonu nedeniyle yara iyileşmesinde anahtar rol oynayan hücrelerdir.(6, 7, 163) Temel bilimlerdeki çalışmalar doku rejenerasyonu sırasında lökositlerin önemli etkisini ortaya çıkarmıştır.(164, 165)

E-TZF, azaltılmış santrifüjleme hızının bir sonucu olarak, daha yüksek konsantrasyonlarda rejeneratif hücreler ve büyüme faktörleri içerir. E-TZF, enflamatuar mediatörleri azaltmada ve doku rejenerasyonunu hızlandırmada yer alan bir sitokin olan interlökin 10 (IL-10) 'dan zengin olması gibi bir farkla L-TZF'den ayrılır. Ayrıca E-TZF'nin sıvı formülasyonu, kemik rejenerasyonunu desteklemek için klinisyenlerin biyomateryalleri tek başına veya diğer biyomateryallerle kombinasyon halinde kolayca uygulayabilmelerine olanak sağlar.(162) Doku rejenerasyonu için gerekli hücre proliferasyonu, migrasyonu ve vaskülarizasyonuna katkıda bulunan TGF- β 1, PDGF ve VEGF gibi çeşitli büyüme faktörlerini içeren E-TZF'nin faydaları göz önünde bulundurularak, kemik rejeneratif prosedürlerinde E-TZF etkinliğini doğrulamak için çok sayıda in vitro ve in vivo çalışma yapılmıştır.(126, 166-169)

Mu ve ark.(138) tavşanlarda sinus ogmentasyonunda deproteinize sığır kemik minerali (DBBM) ile (E-TZF) +DBMM kombinasyonunun anjiyojenik ve osteojenik etkilerini kısa ve uzun dönemde karşılaştırmışlardır. Yapılan mikro-CT, histolojik değerlendirmenin sonucunda E-TZF+DBBM, uzun vadede kemik hacmini arttırmada başarısız olmasına rağmen erken iyileşme döneminde vasküler oluşumu, kemiğin yeniden

şekillenmesini ve kemik greft materyallerinin ikamesini hızlandırdığı, erken implant yerleşimini sağlayan sinüs ogmentasyonunda fayda sağlayabileceği raporlanmıştır.

Kyyak ve ark.(169) yaptıkları bir in vitro çalışmada E-TZF'nin allojenik ve ksenojenik greftlerle ile uygulanmasının hücre göçünü ve farklılaşmasını arttırdığını, bu durumun daha hızlı kemik iyileşmesi açısından klinik bir avantajla sonuçlanabileceğini bildirmişlerdir.

Awni ve ark.(170) ise köpekler üzerinde yaptıkları bir çalışmada, palatal ekspansiyon cerrahisinde uygulanan E-TZF etkinliğini araştırmış, çalışma sonucunda E-TZF'nin osteoblast, kan damarı ve yeni kemik oluşumunda anlamlı bir katkısı olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çalışmalarda E-TZF'nin TZP ile karşılaştırıldığında insan osteoblastlarının göçünü, çoğalmasını ve farklılaşmasını etkileyerek osteoblast davranışını daha belirgin bir şekilde etkileyebildiği(126), E-TZF'nin kemik rejenerasyonunu desteklemede ve mineralizasyonunu arttırılmada diğer kan ürünlerine kıyasla en iyi performansı gösteren ürün olduğu öne sürülmüştür.(167)

Yüksek büyüme faktörü salınımı, 3 dakika gibi çok kısa sürede santrifüj ile eldesi ve katkısız tüp ile tamamen otolog bir sistem olduğu için çalışmamızda E-TZF kullanımını tercih edilmiş ve rejeneratif etkiye katkısı araştırılmıştır. E-TZF, antikoagülan içermediğinden ve bu nedenle kısa bir süre içinde pıhtılaşabildiğinden, alındıktan sonraki 15 dakika içinde kullanılmalıdır. Bu yeni formülasyon, greft stabilitesini arttırmak ve stabil bir fibrin kemik grefti oluşturmak için, kemik greftleriyle karıştırma dahil olmak üzere çeşitli prosedürler için kullanılabilir. Bu amaçla çalışma gruplarımızda E-TZF'yi tek başına kullanmak yerine kemik grefti grupları ile kullanmayı tercih ettik.

Gelişen teknoloji, görüntüleme metotları ve moleküler biyolojideki ilerlemelere paralel seyretmekte olup, kemik dokuda oluşan iyileşme artık moleküler düzeyde

değerlendirilebilmektedir. Bu sayede kemik dokudaki iyileşme oranının ve hızının artırılması amacıyla, hücrel diferansiyasyon ve proliferasyonun, büyüme faktörlerinin salınımının, hücre içi ve hücreler arası yolların işleyişi ve kapasitelerinin artırılması hedeflenmektedir. Bu sebeple ile iyileşme miktarını veya hızını indükleyen alternatif ilaç, biyomateryal dışında hücre içi ve hücreler arası yollara da yoğun bir ilgi bulunmaktadır. (171)

Bilindiği üzere, Wnt sinyal yolağı osteogenezde görev alan önemli yollardan bir tanesidir.(172) Wnt sinyal yolağı erişkin dönemde rejeneratif kapasitesi olan hücrelerin adezyonunda, hedef hücrelerin gen transkripsiyonunun kontrol edilmesinde, embriyolojik dönemdeki hücrelerde ise hücre polaritesinin, proliferasyonunun sağlanmasında, farklılaşmada ve hücre göçünde rol oynayan vücuttaki önemli bir yoldur.(101) Wnt/ β -cat sinyal yolağı, Wnt sinyal yollarından birisidir. Wnt / β -cat sinyalizasyonunun aktivasyonu, doku hasarında erken bir cevaptır ve tüm dokulardaki hücrel temelli onarımın uyarılması için gereklidir.(102, 103)

Wnt sinyal yolağının osteoblastogenezde de önemli bir rol oynadığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır.(16, 173-175) Kim ve ark.(108) yaptıkları bir çalışmada Wnt sinyal yolağı aktive edildiğinde osteblast farklılaşmasının hızlandığını, artmış tip 1 kolajen seviyesi ile göstermişlerdir. Popelut ve ark.(102) Wnt3a'nın implant osseointegrasyonundaki etkisini inceledikleri çalışmada, Wnt sinyal yolağı aktivasyonunun ardından tip 1 kolajen seviyesinde artış gözlemlemişlerdir. Bu bilim insanları Wnt sinyal yolağı aktivasyonunun kemik kütleinde artış sağladığını ve osteoblast aktivitesini arttırdığını bildirmişlerdir.

Tideglusib GSK-3 β aktivitesini suprese ederek Wnt/ β katenin yolağını aktif hale getirir.(122, 123) Tideglusib'inin diş hekimliği alanında kullanımıyla ilgili yapılan çalışmalar kısa süre önce başlamış olmasına rağmen, büyük bir ilgi görmüştür.(26-29) Neves ve ark.(28), yaptıkları bir in vivo çalışmada, Tideglusib'in yaralanmış pulpa dokusunda tersiyer dentin oluşumuna katkı sağlayabildiğini öne sürmüşlerdir. Neves ve arkadaşları(28), Tideglusib'in bu etkisini çeşitli mekanizmalarla gerçekleştirdiğini

göstermiş ve Wnt/ β katenin yolağının bu mekanizmalardan bir tanesi olduğunu öne sürmüşlerdir. Alaohali ve ark.(27), yaptıkları bir in vitro çalışmada hidrojel formunda uygulanan GSK-3 inhibitörünün dentinogenezisi indüklediğini rapor etmişlerdir. Çalışmamızdan elde edilen veriler Tideglusib'in kemik kütlesi artışında rol oynayabileceğine dair bilgiyi desteklemektedir.(176) Holmen ve ark.(177) yaptıkları bir çalışmada bu yolağın osteoblast ve osteoklast farklılaşmasını denetleyerek kemik oluşumu kontrol ettiğini bildirmişlerdir. Duan ve Bonewald(122) bu yolağın büyüme ve gelişimin yanı sıra iskeletin korunması ve maturasyonunda da görev aldığını belirtmiştir. Comeau-Gauthier ve ark.(24) kırık fiksasyonu sırasında lokal yolla uyguladıkları Tideglusib'in intramembranöz kemikleşmeyi arttırdığını bildirmişlerdir.

Daha önce yapılan çalışmalarda bir GSK-3 inhibitörü olan lityum kloritin kanonik olan Wnt/ β katenin yolağının aktivasyonu ile osteoblast farklılaşmasını, osteoblastogenezi arttırdığı ve osteoklastogenezi baskıladığı rapor edilmiştir.(178, 179) Jin ve ark.(180) ise yaptıkları deneysel bir çalışmada ovariektomi ile osteoporoz indükledikleri ratlarda lityum kloritin dental ve ortopedik implantların başarısındaki etkilerini incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda araştırmacılar, lityum kloritin implant osseointegrasyonunu, implant fiksasyonunu ve kemik oluşumunu arttırdığını, osteoporotik durumlarda implant başarısızlığını ve kemik kaybını önlemek için umut verici bir terapötik ajan olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Alpan ve ark. (29), ratlarda deneysel olarak oluşturdukları kemik defektinde lokal olarak uygulanan Tideglusib'in kemik rejenerasyonu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kemik grefti ile birlikte uygulanan Tideglusib'in kemik rejenerasyonu üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir rat çalışmasında ise Tideglusib'in, önemli kemik rejenerasyon faktörlerinden biri olan BMP-2 ve VEGF-A üzerinde adjuvan etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.(171)

Bu çalışmada Tideglusib'i tek başına uyguladığımız grupta amacımız kemik iyileşmesi üzerindeki potansiyel etkisini değerlendirmek iken, E-TZF ve Tideglusib ile kombine

uygulanan gruplarda amacımız, büyüme faktörlerini tetikleyerek yeni kemik oluşum kapasitesini değerlendirmektir.

Bildiğimiz kadarıyla literatürde E-TZF ve ksenogreftlerin birlikte kullanıldığı bazı çalışmalar olmakla birlikte Tideglusib'in bu kombinasyona dahil edildiği ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin karşılaştırmalı olarak değerlendirildiği hiçbir çalışma bulunmamaktadır. Bu bakımdan çalışmamız bu konuda yapılmış olan ilk araştırmadır.

Çalışmamızda Tideglusib'i lokal olarak uygulayarak sistemik uygulamanın sahip olduğu yan etki veya toksisite oluşumu gibi dezavantajlarını elimine etmeyi amaçladık. Tideglusib'in doz ve konsantrasyonunun belirlenmesinde Neves ve ark.(28) çalışmasını referans olarak aldık. Çalışma süresince hiç bir denekte herhangi bir yan etki ve toksik etki görülmediğini, rat modelin bu dozu iyi tolere ettiğini gözlemledik.

Kemik defektlerinin hayvan modelleri için fare, sıçan, tavşan, köpek, domuz, koyun ve keçi dahil olmak üzere birçok tür kullanılmıştır, ancak araştırmaların çoğu tekrarlanabilirlik, verim ve ekonomik sebepler nedeniyle kemirgen modellerine odaklanmıştır.(181-185) Anatomik olarak kemirgen iskeletinin femur, omurga, mandibula ve kalvaryum gibi birçok bölgesi ortotopik defektlerin alıcı bölgeleri olarak hizmet edebilir. Sıçan kalvaryumu, hızlı bir şekilde oluşturulabilen ve genellikle femoral defektlerdeki gibi iskeletin stabilizasyonu için fiksasyon gerektirmeyen tekrarlanabilir bir defekte olanak tanır. Dolayısıyla, biyomateryal veya kemik rejenerasyon stratejisinin amacı göz önünde bulundurulduğunda, sıçan kalvariye defekti kemik rejenerasyonunun in vivo değerlendirilmesi için hızlı ve yüksek verimli bir yöntem olarak tercih edilebilir. Bununla birlikte, uzun kemiklere kıyasla daha az yüke maruz kalan bir anatomik bölge olarak, biyomekanik kuvvetlere dayanması amaçlanan bir kemik rejenerasyon stratejisinin işlevsel olarak test edilmesi kalvaryum defektinde mümkün değildir.(186)

Kemik rejenerasyonunun takibi amacıyla deney hayvanlarında sıklıkla kritik boyutlu defektler tercih edilmektedir. Kritik boyutlu kemik defektlerinin özelliği, meydana gelen kemik kaybının o canlının yaşamı boyunca, iyileşmeyi indükleyici bir materyal kullanılmadan kendiliğinden iyileşemeyecek boyutta olmasıdır. Spontan olarak kemik

dokusuyla iyileşemeyen bu defektler ancak bağ dokusu oluşumuyla iyileşebilmektedir. Kemik dokudaki bir yaralanmanın kritik boyutta olmasını canlının türü, yaşı, sistemik durumu, defektin lokalizasyonu, defektin derinliği gibi etkenler belirlemektedir.(187) Kritik boyuttaki defektler için genel bir standart belirtmek pek mümkün olmasa da Takagi ve ark. (188) yaptıkları çalışmada defektin boyutunu ratlar için 8 mm olarak önermişlerdir. Ancak sonradan yapılan çalışmalarda 5 mm'lik defektlerin de bu özelliği gösterdiği raporlanmıştır.(189-192) Bu sebeple çalışmamızda kritik defekt boyutu olarak 5 mm çap tercih edildi. Komşuluğundaki dura materin kanlanması, rejenerasyon kapasitesi, kemik çapı, postoperatif yara kontrolü sağlanabilirliği açısından rat kalvaryası defekt sahası olarak seçildi.(188)

TZF eldesinde denek rat kullanılarak kan alma işlemi sırasında deney grubundaki ratlarda mortalite ihtimali önlenmeye çalışılmıştır. Literatürde donör hayvanın sağlıklı, alıcı ratlarla aynı yaş ve türde olduğu durumlarda antijenite riskinin önemsiz görüldüğü yer almaktadır.(127) Bu nedenle küçük modellerde yapılan deneysel araştırmalarda kan türevlerinin eldesi için donör hayvanlarının kullanılması literatürde önerilmektedir.(128) Çalışmamızda intraoperatif ve postoperatif dönemde alıcı ratlarda herhangi bir antijenite reaksiyonu izlenmemiştir.

Çalışmamızda kemik defektindeki değişiklikleri incelemek için örnekler histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir. Histomorfometri kemik hücrelerini, aktivitelerini ve kemik matriksini in situ olarak direkt değerlendirilebilen tek yöntem olduğu için, kemik dokusunu değerlendirmede altın standart olarak kabul edilir.(193)

Çalışmamızda bazı limitasyonlar bulunmaktadır. Bunlardan ilki çalışmanın deneysel olması ve örneklem boyutunun küçüklüğü sebebiyle klinik kullanıma direkt yansıtılamamasıdır. Klinik iş akışında uygulanabilmesi için sonuçlar ileri preklinik ve klinik çalışmalarla doğrulanmalıdır. İkinci limitasyonumuz E-TZF'in içerdiği büyüme faktörü miktarı birey içi ve bireyler arası değişmesidir. Ayrıca çalışmamızda kemik iyileşmesinin incelemesinde mikro ct kullanılmamış olması da bir başka eksiklikler.

Sonuç olarak, Tideglusib'in kalvarial kemik defektlerinde 4 hafta süreyle lokal olarak uygulanması, kemik oluşum belirteçlerinde artış ile yeni kemik alanının ve toplam kemik alanının arttığını ortaya koydu.

GSK-3 inhibisyonunun yardımıyla Wnt sinyal yolağı, kemik iyileşmesi sırasında ek faydalar sağladı. Tideglusib'i osteoblastogenez ve osteoklastogenez konusunda anlamak için daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın sonuçları başlangıç hipotezimizi kısmen desteklemektedir. Gruplar arasında en fazla iyileşmede E-TZF'nin bulunduğu grupların etkili olduğu söylenebilir. Tideglusib'in kemik doku üzerindeki etkilerini detaylı incelenmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızdan elde edilen bilgilere dayanarak E-TZF, sıvı formda olması ve enjekte edilebilirliği sayesinde diğer biyomateryallerle kolaylıkla kullanılabilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmadan elde edilen bilgiye dayanarak;

Literatürde Tideglusib ve E-TZF'nin kemik metabolizmasına etkilerinin incelenmesine yönelik deneysel çalışmaların sayısı sınırlıdır. Ratlar üzerinde uyguladığımız deney protokolünün Tideglusib ve E-TZF'nin rat kalvaryası üzerine etkilerinin araştırılmasında uygun bir model olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Benzer modellemelerle ileri çalışmaların literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Bu çalışmadan elde edilen bilgiye dayanarak; kalvaryal kemik defektlerinin iyileşmesinde Tideglusib'in tek başına kemik iyileşmesine katkısının olmadığı ancak Tideglusible birlikte ksenograft ve E-TZF kullanımının veya E-TZF ve ksenograftın birlikte kullanımının kemik iyileşmesi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olabileceği söylenilebilir.

Hem Tideglusib ve E-TZF kullanımının yara iyileşmesi üzerindeki etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi hem bu çalışmadan elde edilen bilgilerin doğrulanması hem de klinik uygulamada hekimlere rehber olabilmesi için kapsamlı deneysel ve klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.

Gerçekleştirilen bu çalışmada elde edilen verilerin, mevcut literatüre katkı sağlamasının yanı sıra, yeni tedavi konseptleri üzerine yapılacak araştırmalara öncülük edeceği de düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Ammann P, Rizzoli R. Bone strength and its determinants. *Osteoporos Int*. 2003;14 Suppl 3:S13-8.
2. McLean FC. Recent Advances in Physiology of Bone. II. The Parathyroid Glands and Bone. *J Bone Joint Surg Am*. 1963;45:1314-20.
3. N. G. Ortodontinin biyolojik temelleri:Kafa, yüz, çene büyüme ve gelişimi: Doyuran Matbaası, İstanbul; 1978.
4. Soloviev DA, Hazen SL, Szpak D, Bledzka KM, Ballantyne CM, Plow EF, et al. Dual role of the leukocyte integrin $\alpha M\beta 2$ in angiogenesis. *The Journal of Immunology*. 2014;193(9):4712-21.
5. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *Journal of Investigative Dermatology*. 2007;127(3):514-25.
6. Gosain A, DiPietro LA. Aging and wound healing. *World journal of surgery*. 2004;28:321-6.
7. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA, editors. Angiogenesis in wound healing. *Journal of investigative dermatology symposium proceedings*; 2000: Elsevier.
8. Ekström K, Omar O, Graneli C, Wang X, Vazirisani F, Thomsen P. Monocyte exosomes stimulate the osteogenic gene expression of mesenchymal stem cells. *PloS one*. 2013;8(9):e75227.
9. Yelamali T, Saikrishna D. Role of platelet rich fibrin and platelet rich plasma in wound healing of extracted third molar sockets: a comparative study. *Journal of maxillofacial and oral surgery*. 2015;14:410-6.
10. Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(4):321-8.
11. Miron RJ, Choukroun J. Platelet rich fibrin in regenerative dentistry: biological background and clinical indications: John Wiley & Sons; 2017.
12. 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. *European journal of trauma and emergency surgery*. 2018;44:87-95.

13. Nurden AT. Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2011;105(S 06):S13-S33.

14. 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.

15. Jenne C, Urrutia R, Kubes P. Platelets: bridging hemostasis, inflammation, and immunity. *International journal of laboratory hematology*. 2013;35(3):254-61.

16. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(5):1202-9.

17. Johnson ML, Kamel MA. The Wnt signaling pathway and bone metabolism. *Current opinion in rheumatology*. 2007;19(4):376-82.

18. Silkstone D, Hong H, Alman BA. β -Catenin in the race to fracture repair: in it to Wnt. *Nature Clinical Practice Rheumatology*. 2008;4(8):413-9.

19. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, et al. Osteocyte Wnt/ β -catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Molecular and cellular biology*. 2010;30(12):3071-85.

20. Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/ β -catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis. *Developmental cell*. 2005;8(5):739-50.

21. Glass DA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in osteoblasts is required for osteoclast differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006;1068(1):117-30.

22. Li J, Yin X, Huang L, Mouraret S, Brunski J, Cordova L, et al. Relationships among bone quality, implant osseointegration, and Wnt signaling. *Journal of dental research*. 2017;96(7):822-31.

23. Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, Nadesan P, Wei Q, Poon R, et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS medicine*. 2007;4(7):e249.

24. Comeau-Gauthier M, Tarchala M, Luna JLR-G, Harvey E, Merle G. Unleashing β -catenin with a new anti-Alzheimer drug for bone tissue regeneration. *Injury*. 2020;51(11):2449-59.
25. Martinez A, Gil C, Perez DI. Glycogen synthase kinase 3 inhibitors in the next horizon for Alzheimer's disease treatment. *International journal of Alzheimer's disease*. 2011;2011.
26. Zaugg L, Banu A, Walther A, Chandrasekaran D, Babb R, Salzlechner C, et al. Translation approach for dentine regeneration using GSK-3 antagonists. *Journal of dental research*. 2020;99(5):544-51.
27. Alaohali A, Salzlechner C, Zaugg L, Suzano F, Martínez A, Gentleman E, et al. GSK3 inhibitor-induced dentinogenesis using a hydrogel. *Journal of Dental Research*. 2022;101(1):46-53.
28. Neves VC, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Scientific reports*. 2017;7(1):39654.
29. Alpan AL, Çalisir M, Kizildag A, Özdede M, Özmen Ö. Effects of a glycogen synthase kinase 3 inhibitor tideglusib on bone regeneration with calvarial defects. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2020;31(5):1477-82.
30. Buckwalter J, Cooper R. Bone structure and function. *Instructional course lectures*. 1987;36:27-48.
31. Tzaphlidou M. Bone architecture: collagen structure and calcium/phosphorus maps. *Journal of biological physics*. 2008;34:39-49.
32. Stewart S, Bryant SJ, Ahn J, Hankenson KD. Bone regeneration. *Translational regenerative medicine: Elsevier*; 2015. p. 313-33.
33. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10(1):7-19.
34. S. P. Histoloji. Uludağ Üniversitesi G $\ddot{u}$ çlendirme Vakfı. 1993;2(32).
35. J. W. Integrated Bone Tissue Physiology: Anatomy and Physiology. Cowin SC, editor: CRC PRESS; 2001.
36. Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instr Course Lect*. 1996;45:371-86.

37. L. R. Cellular basis of bone turnover. Metabolic Bone Disease and Clinically Related Disorders. Krane. LVAaSM, editor 1990.
38. R.G.G. Russell. Humoral and local factors affecting bone formation and resorption. In: Stevenson JC, editor. In New Techniques in Metabolic Bone Disease,. LONDON: BUTTERWORTH; 1990.
39. Rodan GA, Martin TJ. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption - a hypothesis. Calcif Tissue Int. 1982;34(3):311.
40. Rodan GA. Introduction to bone biology. Bone. 1992;13 Suppl 1:S3-6.
41. Raisz LG, Kream BE. Regulation of bone formation (second of two parts). N Engl J Med. 1983;309(2):83-9.
42. Bonewald L. Osteocytes as multifunctional cells. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2006;6(4):331-3.
43. Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2000;1(2):133-6.
44. Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A, Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction. J Nutr. 1995;125(7 Suppl):2020S-3S.
45. SOYDAN. N. GENEL HİSTOLOJİ: İstanbul, İ.Ü. Basımevi ve Film Merkezi; 1982.
46. MT. A. GENEL HİSTOLOJİ. ANKARA: PALME YAYINCILIK 2003.
47. Junquiera LC CJ, Kelley, R.O,. TEMEL HİSTOLOJİ. İstanbul: Barış Kitabevi; 1998.
48. C. E. Genel Histoloji: Hücre ve Dokular. İzmir: Murat Onset; 1983.
49. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontol 2000. 2000;24:99-126.
50. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. J Periodontol. 2001;72(2):152-9.
51. DeLacure MD. Physiology of bone healing and bone grafts. Otolaryngol Clin North Am. 1994;27(5):859-74.
52. Caplan AI, Correa D. PDGF in bone formation and regeneration: new insights into a novel mechanism involving MSCs. J Orthop Res. 2011;29(12):1795-803.

53. Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-6.
54. Russo C, Lauretani F, Bandinelli S, Bartali B, Di Iorio A, Volpato S, et al. Aging bone in men and women: beyond changes in bone mineral density. *Osteoporosis international*. 2003;14:531-8.
55. Mester A, Apostu D, Ciobanu L, Piciu A, Lucaciu O, Campian RS, et al. The impact of proton pump inhibitors on bone regeneration and implant osseointegration. *Drug metabolism reviews*. 2019;51(3):330-9.
56. Costa-Rodrigues J, Reis S, Teixeira S, Lopes S, Fernandes MH. Dose-dependent inhibitory effects of proton pump inhibitors on human osteoclastic and osteoblastic cell activity. *The FEBS journal*. 2013;280(20):5052-64.
57. Ivanovic A, Nikou G, Miron RJ, Nikolidakis D, Sculean A. Which biomaterials may promote periodontal regeneration in intrabony periodontal defects? A systematic review of preclinical studies. *Quintessence Int*. 2014;45(5):385-95.
58. Demling RH. The role of anabolic hormones for wound healing in catabolic states. *Journal of burns and wounds*. 2005;4.
59. Niekisch R. Application possibilities of fibrin glue in dentistry and maxillofacial surgery. *Zahn-, Mund-, und Kieferheilkunde mit Zentralblatt*. 1980;68(6):555-61.
60. Tamimi FM, Torres J, Tresguerres I, Clemente C, López-Cabarcos E, Blanco LJ. Bone augmentation in rabbit calvariae: comparative study between Bio-Oss® and a novel β -TCP/DCPD granulate. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(12):922-8.
61. Fijnheer R, Pietersz R, De Korte D, Gouwerok C, Dekker W, Reesink H, et al. Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion*. 1990;30(7):634-8.
62. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 1997;55(11):1294-9.
63. Borzini P, Balbo V, Mazzucco L. Platelet concentrates for topical use: bedside device and blood transfusion technology. Quality and versatility. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2012;13(7):1138-44.
64. Reinke J, Sorg H. Wound repair and regeneration. *European surgical research*. 2012;49(1):35-43.

65. Freire MO, Van Dyke TE. Natural resolution of inflammation. *Periodontology* 2000. 2013;63(1):149-64.
66. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e37-e44.
67. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
68. Choukroun J, Adda F, Schoffler C, Vervelle A. Une opportunit  en parodontologie: Le. *Implantodontie*. 2001;42:55-62.
69. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Opportunities in implant dentistry: PRF. *Implantodontie*. 2001;42:e62.
70.  ZSAĞIR ZB. Dişeti fenotipini kalınlaştırmak amacıyla injectable-platelet-rich-fibrin'in (I-PRF) kullanılması/Using the injectable-platelet-rich-fibrin (I-PRF) for enhancing the gingival phenotype: Bezmialem Vakıf University; 2018.
71. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of periodontology*. 2010;81(4):546-55.
72. Ehrenfest DD, Sammartino G, Shibli JA, Wang H-L, Zou D-R, Bernard J-P. Guidelines for the publication of articles related to platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, or Platelet-Rich Fibrin-PRF): the international classification of the POSEIDO. *Poseido J*. 2013;1:17-28.
73. Castro AB, Meschi N, Temmerman A, Pinto N, Lambrechts P, Teughels W, et al. Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part A: intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *Journal of clinical periodontology*. 2017;44(1):67-82.
74. Majno G. *The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World*; Cambridge, MA: Harvard Univ Pr; 1975. *Annals of Internal Medicine*. 1998;128(4):318.
75. Hasturk H, Kantarci A. Activation and resolution of periodontal inflammation and its systemic impact. *Periodontology 2000*. 2015;69(1):255-73.

76. O'Connell SM. Safety issues associated with platelet-rich fibrin method. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology*. 2007;103(5):587.
77. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;51(5):438-43.
78. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Yaprak E, Toker H, et al. A novel platelet concentrate: titanium-prepared platelet-rich fibrin. *BioMed research international*. 2014;2014.
79. 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. *Journal of Oral Implantology*. 2014;40(6):679-89.
80. Kim T-H, Kim S-H, Sándor GK, Kim Y-D. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Archives of oral biology*. 2014;59(5):550-8.
81. Wend S, Kubesch A, Orlowska A, Al-Maawi S, Zender N, Dias A, et al. Reduction of the relative centrifugal force influences cell number and growth factor release within injectable PRF-based matrices. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2017;28(12):1-11.
82. Mourão CFdAB, Valiense H, Melo ER, Mourão NBMF, Maia MD-C. Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*. 2015;42:421-3.
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. *European journal of trauma and emergency surgery*. 2018;44(1):87-95.
84. Jain NK, Gulati M. Platelet-rich plasma: a healing virtuoso. *Blood research*. 2016;51(1):3-5.
85. Maria-Angeliki G, Alexandros-Efstratios K, Dimitris R, Konstantinos K. Platelet-rich plasma as a potential treatment for noncicatricial alopecias. *International journal of trichology*. 2015;7(2):54.

86. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, 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*. 2018;29(2):171-84.
87. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2009;108(5):707-13.
88. Khan SN, Cammisa Jr FP, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 2005;13(1):77-86.
89. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2013;5(Suppl 1):S125.
90. Kökden A, Türker M. Oral ve maksillofasial cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*. 1999;2(2):134-40.
91. Rogers GF, Greene AK. Autogenous bone graft: basic science and clinical implications. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2012;23(1):323-7.
92. YUKNA RA. Synthetic bone grafts in periodontics. *Periodontology* 2000. 1993;1(1):92-9.
93. Perry CR. Bone repair techniques, bone graft, and bone graft substitutes. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007)*. 1999;360:71-86.
94. Contar CMM, Sarot JR, da Costa MB, Bordini Jr J, de Lima AAS, Alanis LRA, et al. Fresh-frozen bone allografts in maxillary ridge augmentation: histologic analysis. *Journal of Oral Implantology*. 2011;37(2):223-31.
95. Tang CL, Mahoney JL, McKee MD, Richards R, Waddell J, Louie B, et al. Donor site morbidity following vascularized fibular grafting. *Microsurgery: Official Journal of the International Microsurgical Society and the European Federation of Societies for Microsurgery*. 1998;18(6):383-6.

96. Buser D, Dula K, Belser U, Hirt H-P, Berthold H. Localized ridge augmentation using guided bone regeneration. I. Surgical procedure in the maxilla. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 1993;13(1).
97. Leonetti JA, Koup R. Localized maxillary ridge augmentation with a block allograft for dental implant placement. *Implant Dentistry*. 2003;12(3):217-26.
98. Tomford WW. Transmission of disease through transplantation of musculoskeletal allografts. *JBJS*. 1995;77(11):1742-54.
99. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*. 1996;17(1):31-5.
100. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. Expert review of medical devices. 2006;3(1):49-57.
101. TANIR H, DEMİREZEN Ş. Wnt sinyal yolunun biyolojisi ve bu yolda görev alan biyomoleküller. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*. 2009;29.
102. Popelut A, Rooker SM, Leucht P, Medio M, Brunski JB, Helms JA. The acceleration of implant osseointegration by liposomal Wnt3a. *Biomaterials*. 2010;31(35):9173-81.
103. Eisenmann D. Wnt signaling (June 25, 2005), *WormBook*, ed. The C elegans. 1895.
104. Whyte JL, Smith AA, Helms JA. Wnt signaling and injury repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2012;4(8):a008078.
105. Yazawa S, Umesono Y, Hayashi T, Tarui H, Agata K. Planarian Hedgehog/Patched establishes anterior-posterior polarity by regulating Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(52):22329-34.
106. Petersen CP, Reddien PW. A wound-induced Wnt expression program controls planarian regeneration polarity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(40):17061-6.
107. Gurley KA, Rink JC, Alvarado AS. β -catenin defines head versus tail identity during planarian regeneration and homeostasis. *Science*. 2008;319(5861):323-7.
108. Kim JB, Leucht P, Lam K, Luppen C, Ten Berge D, Nüsse R, et al. Bone regeneration is regulated by wnt signaling. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2007;22(12):1913-23.

109. Leucht P, Minear S, Ten Berge D, Nüsse R, Helms J, editors. Translating insights from development into regenerative medicine: the function of Wnts in bone biology. *Seminars in cell & developmental biology*; 2008: Elsevier.
110. Ito M, Yang Z, Andl T, Cui C, Kim N, Millar SE, et al. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*. 2007;447(7142):316-20.
111. Fulciniti M, Tassone P, Hideshima T, Vallet S, Nanjappa P, Ettenberg SA, et al. Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2009;114(2):371-9.
112. Yaccoby S, Ling W, Zhan F, Walker R, Barlogie B, Shaughnessy Jr JD. Antibody-based inhibition of DKK1 suppresses tumor-induced bone resorption and multiple myeloma growth in vivo. *Blood*. 2007;109(5):2106-11.
113. Zhao J, Kim K-A, De Vera J, Palencia S, Wagle M, Abo A. R-Spondin1 protects mice from chemotherapy or radiation-induced oral mucositis through the canonical Wnt/ β -catenin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009;106(7):2331-6.
114. Lim W, Liu B, Cheng D, Williams B, Mah S, Helms J. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Journal of periodontal research*. 2014;49(6):751-9.
115. Zhang R, Yang G, Wu X, Xie J, Yang X, Li T. Disruption of Wnt/ β -catenin signaling in odontoblasts and cementoblasts arrests tooth root development in postnatal mouse teeth. *International journal of biological sciences*. 2013;9(3):228.
116. Rooker SM, Liu B, Helms JA. Role of Wnt signaling in the biology of the periodontium. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2010;239(1):140-7.
117. van Genderen C, Okamura RM, Farinas I, Quo R-G, Parslow TG, Bruhn L, et al. Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes & development*. 1994;8(22):2691-703.
118. Zhou P, Byrne C, Jacobs J, Fuchs E. Lymphoid enhancer factor 1 directs hair follicle patterning and epithelial cell fate. *Genes & development*. 1995;9(6):700-13.

119. Marsell R, Sisask G, Nilsson Y, Sundgren-Andersson AK, Andersson U, Larsson S, et al. GSK-3 inhibition by an orally active small molecule increases bone mass in rats. *Bone*. 2012;50(3):619-27.
120. Neves V, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. *Scientific reports*. 2017;7(1):1-7.
121. Meijer L, Flajolet M, Greengard P. Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. *Trends in pharmacological sciences*. 2004;25(9):471-80.
122. Duan P, Bonewald L. The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2016;77:23-9.
123. Li J, Xiang L, Jiang X, Teng B, Sun Y, Chen G, et al. Investigation of bioeffects of G protein-coupled receptor 1 on bone turnover in male mice. *Journal of orthopaedic translation*. 2017;10:42-51.
124. Gual-Vaqués P, Polis-Yanes C, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Marí-Roig A, López-López J. Autogenous teeth used for bone grafting: A systematic review. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. 2018;23(1):e112.
125. Domínguez JM, Fuertes A, Orozco L, del Monte-Millán M, Delgado E, Medina M. Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib. *Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(2):893-904.
126. 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*. 2018;29(1):48-55.
127. 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? *Clinical oral investigations*. 2017;21(8):2619-27.
128. Brown C, McKee C, Bakshi S, Walker K, Hakman E, Halassy S, et al. Mesenchymal stem cells: Cell therapy and regeneration potential. *J Tissue Eng Regen Med*. 2019;13(9):1738-55.
129. Herberg S, Kondrikova G, Periyasamy-Thandavan S, Howie RN, Elsalanty ME, Weiss L, et al. Inkjet-based biopatterning of SDF-1 β augments BMP-2-induced repair of critical size calvarial bone defects in mice. *Bone*. 2014;67:95-103.

130. Strauss FJ, Kuchler U, Kobatake R, Heimel P, Tangl S, Gruber R. Acid bone lysates reduce bone regeneration in rat calvaria defects. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2021;109(5):659-65.
131. Gökmen S, Pehlivan A, Aksoy A. Laboratuvar Hayvanlarında Ötenazi Yöntemleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*. 2019;30(1):87-94.
132. AKSOY ZNA. Türkiye’de Laboratuvar Hayvanlarında Anestezi, Analjezi ve Ötanazi.
133. Mandrekar JN. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment. *Journal of Thoracic Oncology*. 2010;5(9):1315-6.
134. Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Xu X, Chee WW, Schricker SR, et al. Encapsulated dental-derived mesenchymal stem cells in an injectable and biodegradable scaffold for applications in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 2013;101(11):3285-94.
135. Develioglu H, Saraydın S, Kartal Ü, Taner L. Evaluation of the long-term results of rat cranial bone repair using a particular xenograft. *Journal of Oral Implantology*. 2010;36(3):167-73.
136. Gorla LdO, Spin-Neto R, Boos F, Pereira RdS, Garcia-Junior I, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: a prospective, randomized, volumetric computed tomography study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2015;44(12):1486-91.
137. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard tissue*. 2013;2(2):1-12.
138. Mu Z, He Q, Xin L, Li Y, Yuan S, Zou H, et al. Effects of injectable platelet rich fibrin on bone remodeling in combination with DBBM in maxillary sinus elevation: a randomized preclinical study. *American journal of translational research*. 2020;12(11):7312.
139. Karl-EKA. PMT. *Essentials of Oral and Maxillofacial Surgery* 2014.
140. Berglundh T, Lindhe J. Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. An experimental study in the dog. *Clinical oral implants research*. 1997;8(2):117-24.

141. Lambert F, Léonard A, Drion P, Sourice S, Layrolle P, Rompen E. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. *Clinical oral implants research*. 2011;22(5):538-45.
142. Charalambides C, Beer M, Cobb AG. Poor results after augmenting autograft with xenograft (Surgibone) in hip revision surgery: a report of 27 cases. *Acta Orthopaedica*. 2005;76(4):544-9.
143. Develioglu H, Saraydin SU, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dental materials journal*. 2009;28(4):396-400.
144. PINHOLT EM, BANG G, HAANAES HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. *European Journal of Oral Sciences*. 1991;99(2):154-61.
145. Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T, Lang NP. The effect of enamel matrix proteins and deproteinized bovine bone mineral on heterotopic bone formation. *Clinical Oral Implants Research*. 2006;17(4):434-8.
146. Idulhaq M, Mudigdo A, Utomo P, Wasita B, Warman FI. Platelet-rich fibrin as a tissue engineering material in accelerate bone healing in rat bone defects: A systematic review and meta-analysis. *Annals of Medicine and Surgery*. 2022:104869.
147. Melek LN, Taalab MR. The use of injectable platelet rich fibrin in conjunction to guided bone regeneration for the management of well contained ridge defect at the time of extraction. *Egyptian Dental Journal*. 2017;63(2-April (Oral Surgery)):1197-208.
148. Del Corso M, Mazor Z, Rutkowski JL, Ehrenfest DMD. The use of leukocyte-and platelet-rich fibrin during immediate postextractive implantation and loading for the esthetic replacement of a fractured maxillary central incisor. *Journal of Oral Implantology*. 2012;38(2):181-7.
149. Amiri MA, Farshidfar N, Hamedani S. The potential application of platelet-rich fibrin (PRF) in vestibuloplasty. *Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgery*. 2021;43:1-2.
150. Amiri MA, Farshidfar N, Hamedani S. The prospective relevance of autologous platelet concentrates for the treatment of oral mucositis. *Oral oncology*. 2021;122:105549.
151. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1998;85(6):638-46.

152. Li Q, Pan S, Dangaria SJ, Gopinathan G, Kolokythas A, Chu S, et al. Platelet-rich fibrin promotes periodontal regeneration and enhances alveolar bone augmentation. *BioMed research international*. 2013;2013.
153. Aydinyurt HS, Sancak T, Taskin C, Basbugan Y, Akinci L. Effects of injectable platelet-rich fibrin in experimental periodontitis in rats. *Odontology*. 2021;109:422-32.
154. Kökdere NN, Baykul T, Findik Y. The use of platelet-rich fibrin (PRF) and PRF-mixed particulated autogenous bone graft in the treatment of bone defects: An experimental and histomorphometrical study. *Dental research journal*. 2015;12(5):418.
155. Lee H-J, Choi B-H, Jung J-H, Zhu S-J, Lee S-H, Huh J-Y, et al. Maxillary sinus floor augmentation using autogenous bone grafts and platelet-enriched fibrin glue with simultaneous implant placement. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007;103(3):329-33.
156. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Phurisat K. The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2013;41(8):e191-e200.
157. Yilmaz D, Dogan N, Ozkan A, Sencimen M, Ora BE, Mutlu I. Effect of platelet rich fibrin and beta tricalcium phosphate on bone healing. A histological study in pigs. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2014;29:59-65.
158. Nacopoulos C, Dontas I, Lelovas P, Galanos A, Vesalas A-M, Raptou P, et al. Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2014;25(6):2164-8.
159. Bölükbaşı N, Yeniyol S, Tekkesin MS, Altunatmaz K. The use of platelet-rich fibrin in combination with biphasic calcium phosphate in the treatment of bone defects: a histologic and histomorphometric study. *Current Therapeutic Research*. 2013;75:15-21.
160. Ozdemir H, Ezirganli S, Kara MI, Mihmanli A, Baris E. Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier. *Archives of oral biology*. 2013;58(5):537-44.
161. Oliveira M, Silva Ad, Ferreira S, Avelino C, Garcia Jr I, Mariano R. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2015;44(5):649-55.

162. Farshidfar N, Amiri MA, Jafarpour D, Hamedani S, Niknezhad SV, Tayebi L. The feasibility of injectable PRF (I-PRF) for bone tissue engineering and its application in oral and maxillofacial reconstruction: from bench to chairside. *Biomaterials Advances*. 2022;134:112557.
163. Eming SA, Brachvogel B, Odorisio T, Koch M. Regulation of angiogenesis: wound healing as a model. *Progress in histochemistry and cytochemistry*. 2007;42(3):115-70.
164. Pirraco RP, Reis R, Marques A. Effect of monocytes/macrophages on the early osteogenic differentiation of hBMSCs. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2013;7(5):392-400.
165. Kawazoe T, Kim HH. Tissue augmentation by white blood cell-containing platelet-rich plasma. *Cell transplantation*. 2012;21(2-3):601-7.
166. Amaral Valladão CA, Freitas Monteiro M, Joly JC. Guided bone regeneration in staged vertical and horizontal bone augmentation using platelet-rich fibrin associated with bone grafts: a retrospective clinical study. *International journal of implant dentistry*. 2020;6:1-10.
167. Fernández-Medina T, Vaquette C, Ivanovski S. Systematic comparison of the effect of four clinical-grade platelet rich hemoderivatives on osteoblast behaviour. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(24):6243.
168. Gülsen U, Dereci Ö. Evaluation of New Bone Formation in Sinus Floor Augmentation With Injectable Platelet-Rich Fibrin–Soaked Collagen Plug: A Pilot Study. *Implant dentistry*. 2019;28(3):220-5.
169. Kyyak 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. *Journal of Biomaterials Applications*. 2020;35(1):83-96.
170. Awni KM, Dewachi Z, Al-Hyani OH. Effect of Injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) on new bone formation in surgical expansion with mini-screw assisted rapid palatal expander: A dog model study. *journal of orthodontic science*. 2023;12(1):12.

171. İYİLİKCİ B, TAŞDEMİR U, ÖZMEN Ö, KIZILDAĞ A. Effect Of Tideglusib With Bone Grafting On New Bone Formation. *Cumhuriyet Dental Journal*. 2021;24(3):224-31.
172. Bergwitz C, Wendlandt T, Kispert A, Brabant G. Wnts differentially regulate colony growth and differentiation of chondrogenic rat calvaria cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2001;1538(2-3):129-40.
173. Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML. Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(12):4946-55.
174. Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, et al. High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(20):1513-21.
175. Kato M, Patel MS, Levasseur R, Lobov I, Chang BH-J, Glass DA, et al. Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. *The Journal of cell biology*. 2002;157(2):303-14.
176. Lektemur Alpan A, Calisir M, Kizildag A, Ozdede M, Ozmen O. Effects of a Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitor Tideglusib on Bone Regeneration With Calvarial Defects. *J Craniofac Surg*. 2020;31(5):1477-82.
177. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere M-C, Bouxsein ML, et al. Essential role of β -catenin in postnatal bone acquisition. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(22):21162-8.
178. Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Sasaki M, Yoshihara T, Morimoto S, Hirata M, et al. Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis. *Biochemical pharmacology*. 2014;90(4):397-405.
179. Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso G, Passeri G. GSK 3 β -inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. *Clinical oral implants research*. 2013;24(8):921-7.

180. Jin Y, Xu L, Hu X, Liao S, Pathak JL, Liu J. Lithium chloride enhances bone regeneration and implant osseointegration in osteoporotic conditions. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2017;35:497-503.
181. Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical Orthopaedics and Related Research* (1976-2007). 1986;205:299-308.
182. Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials*. 2007;28(29):4240-50.
183. Reichert JC, Epari DR, Wulschleger ME, Saifzadeh S, Steck R, Lienau J, et al. Establishment of a preclinical ovine model for tibial segmental bone defect repair by applying bone tissue engineering strategies. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010;16(1):93-104.
184. Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2008;85(1):206-17.
185. Pearce A, Richards R, Milz S, Schneider E, Pearce S. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater*. 2007;13(1):1-10.
186. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature protocols*. 2012;7(10):1918-29.
187. Donos N, Graziani F, Mardas N, Kostopoulos L. The use of human hypertrophic chondrocytes-derived extracellular matrix for the treatment of critical-size calvarial defects. *Clinical oral implants research*. 2011;22(12):1346-53.
188. Takagi K, Urist MR. The reaction of the dura to bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. *Annals of surgery*. 1982;196(1):100.
189. Kim KS, Lee JY, Kang YM, Kim ES, Kim GH, Dal Rhee S, et al. Small intestine submucosa sponge for in vivo support of tissue-engineered bone formation in the presence of rat bone marrow stem cells. *Biomaterials*. 2010;31(6):1104-13.

190. Abarrategi A, Moreno-Vicente C, Ramos V, Aranaz I, Sanz Casado JV, López-Lacomba JL. Improvement of porous β -TCP scaffolds with rhBMP-2 chitosan carrier film for bone tissue application. *Tissue Engineering Part A*. 2008;14(8):1305-19.
191. Cowan CM, Aghaloo T, Chou Y-F, Walder B, Zhang X, Soo C, et al. MicroCT evaluation of three-dimensional mineralization in response to BMP-2 doses in vitro and in critical sized rat calvarial defects. *Tissue engineering*. 2007;13(3):501-12.
192. Sawyer A, Song S, Susanto E, Chuan P, Lam C, Woodruff M, et al. The stimulation of healing within a rat calvarial defect by mPCL–TCP/collagen scaffolds loaded with rhBMP-2. *Biomaterials*. 2009;30(13):2479-88.
193. Iwaniec UT, Wronski TJ, Turner RT. Histological analysis of bone. *Alcohol: Methods and Protocols*. 2008:325-41.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	MEHMET ONUR	Uyruğu	TC
Soyadı	MEREY	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	ANTALYA YUSUF ZİYA ÖNER FEN LİSESİ	2010
Lisans/Yüksek Lisans	MARMARA ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ	2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
-	-	-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İNGİLİZCE	TIP-DİL	84

Burslar-Ödüller: -

Yayınlar:-

Bildiriler – Sözlü Sunum:-

Bildiriler – Poster Sunumu:

1. Merey Mehmet Onur, Cipoğlu Selen Elif, Özalp Öznur, Sindel Alper, Altay Mehmet Ali, Şimşek Kaya Göksel (2021). Adölesenda mediale deplase kondil boynu kırığının kapalı redüksiyonu: Bir olgu sunumu. Turkish Association of Oral and Maxillofacial Surgery 28th International Scientific Congress.

2. Cipoğlu Selen Elif, Merey Mehmet Onur, Özbudak İrem Hicran, Özalp Öznur, Şimşek Kaya Göksel, Sindel Alper, Altay Mehmet Ali (2021). Maksiller Diş Etinde Periferik

Odontojenik Miksoma Olgusu. Turkish Association of Oral and Maxillofacial Surgery
28th International Scientific Congress.

