



TC.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI



**RATLARIN KALVARYUMUNDA YAPILAN YÖNLENDİRİLMİŞ DOKU  
REJENERASYONUNDA MİNE MATRİKS PROTEİNİ, PLATELETTEN  
ZENGİN FİBRİN (PRF) VE KEMİK GREFTİNİN YENİ KEMİK  
OLUŞUMUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

**UZMANLIK TEZİ  
Tuğçe DÖNMEZER**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Tuba TALO YILDIRIM**

**Bu çalışma Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından  
DHF.19.08 nolu proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ELAĞIĞ, 2021**

## ONAY SAYFASI

---

Prof. Dr. Filiz ACUN KAYA

Dekan

Bu tez Uzmanlık Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

---

Prof. Dr. Filiz ACUN KAYA

**Periodontoloji Anabilim Dalı Başkanı**

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tuba TALO YILDIRIM

---

Danışman

Uzmanlık Tez Değerlendirme Jüri Üyeleri

.....

.....

.....

.....



## ETİK BEYAN

Kendime ait çalışmalar ile bu tez çalışmasını gerçekleştirdiğimi, çalışmaların planlanmasından, bulgularının elde edilmesine ve yazım aşamasına kadar tüm aşamalarında etiğe aykırı davranışım olmadığını, bu tezdeki tüm bilgileri ve verileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması içinde yer alan ancak bu tez çalışmasının bulguları arasında yer almayan verilere, bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi beyan ederim.

Tuğçe DÖNMEZER

İmza

Doç. Dr. Tuba Talo YILDIRIM

Danışman

Periodontoloji Anabilim Dalı

ELAZIĞ

**İTHAF**

*Canım aileme,*



## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle her zaman desteğini hissettiğim, teorik ve pratik olarak üzerimde büyük emeği olan, tezimin her aşamasında rehberlik edip yardımını esirgemeyen Değerli Hocam Doç. Dr. Tuba Talo YILDIRIM'a sonsuz teşekkür, saygı ve şükranlarımı sunarım. Uzmanlık eğitimim sırasında tanıştığım, bilgi ve tecrübelerini esirgemedi bu kısa süre zarfında bize aktaran ve mesleki vizyonumuzu genişleten Dekanımız ve Anabilim Dalı Başkanımız çok Kıymetli Hocam Prof. Dr. Filiz ACUN KAYA'ya, uzmanlık eğitimimin başından sonuna kadar kendilerinden çok şey öğrendiğim, hiçbir konuda bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen Değerli Hocam Doç. Dr. Serkan DÜNDAR'a ve Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyesi Dr. Öğr. Üyesi Alihan BOZOĞLAN'a sonsuz teşekkür, saygı ve şükranlarımı sunarım. Fırat Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Kliniği asistanları, hemşireleri ve diğer çalışanlarına, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. İbrahim Hanifi Özercan'a, patoloji laboratuvarı çalışanları ve personellerine çalışmam sırasındaki yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım. Bu tez çalışmasını DHF.19.08 no'lu proje ile destekleyen FÜBAP'a ve tüm deney süresince desteğini ve yardımlarını esirgemeyen zamansız bir şekilde aramızdan ayrılan Suat DOĞAN'a ve tüm FÜDAM personellerine desteklerinden dolayı teşekkür ederim. Bu günlere gelmemde büyük emeği olan, tüm kararlarımda, doğrularımda ve yanlışlarımda arkamda duran, beni her zaman maddi ve manevi destekleyen Annem, Babam ve Kardeşime şükranlarımı sunarım. Son olarak her zaman yanımda olan dostlarım Dt. Büşra KAMBUR, Sümeyye SAVAŞ ve Uzm. Dt. Sevcan AKÇA' ya, yardımlarını hiç esirgemedi sunan Arş. Gör. Cansu ERHAN'a, desteğini hep hissettiğim kıymetli büyüğüm, meslektaşım Dt. Sedat ERTEM' e ve çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Arş. Gör. Tuğçe Dönmezer

## İÇİNDEKİLER

|                                                    |      |
|----------------------------------------------------|------|
| ONAY SAYFASI                                       | II   |
| ETİK BEYAN                                         | III  |
| İTHAF                                              | IV   |
| TEŞEKKÜR                                           | V    |
| İÇİNDEKİLER                                        | VI   |
| TABLO LİSTESİ                                      | IX   |
| RESİM LİSTESİ                                      | X    |
| ŞEKİL LİSTESİ                                      | XIII |
| KISALTMALAR                                        | XIV  |
| 1.ÖZET                                             | 1    |
| 2. ABSTRACT                                        | 3    |
| 3. GİRİŞ                                           | 5    |
| 3.1. Genel Bilgiler                                | 8    |
| 3.1.1. Periodonsiyum                               | 8    |
| 3.1.1.1. Periodontal Ligament                      | 9    |
| 3.1.1.2. Sement                                    | 9    |
| 3.1.1.3. Dişeti                                    | 10   |
| 3.1.1.4. Alveolar Kemik                            | 11   |
| 3.1.1.4.1. Kemik Yapısı                            | 11   |
| 3.1.1.4.2. Kemiğin Tabakaları                      | 12   |
| 3.1.1.4.3. Kemik Hücresel Bileşenleri              | 13   |
| 3.1.1.4.3.1. Osteoprogenitör (Osteojenik) Hücreler | 13   |
| 3.1.1.4.3.2. Osteoblastlar                         | 13   |
| 3.1.1.4.3.3. Osteositler                           | 13   |
| 3.1.1.4.3.4. Kemik Örtü Hücreleri                  | 14   |
| 3.1.1.4.3.5. Osteoklastlar                         | 14   |
| 3.1.1.4.4. Kemik İliği                             | 15   |
| 3.1.1.4.5. Kemik Dokusunun Oluşumu                 | 15   |
| 3.1.1.4.5.1. İntramembranöz Kemikleşme             | 15   |
| 3.1.1.4.5.2. Endokondral Kemikleşme                | 16   |

|                                                                        |    |
|------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1.1.4.6. Kemik Dokusunun Sınıflandırılması                           | 16 |
| 3.1.1.4.6.1. Örgü (Birincil) Kemik                                     | 16 |
| 3.1.1.4.6.2. Olgun (İkincil) Kemik                                     | 16 |
| 3.1.1.4.6.3. Kortikal ve Kansellöz Kemik                               | 17 |
| 3.1.2. Peridontal Dokularda Hastalık ve Tedavi                         | 17 |
| 3.1.3. Yara İyileşmesi ve Rejenaratif Periodontal Tedavi               | 18 |
| 3.1.4. Yönlendirilmiş Doku Rejenarasyonu (YDR)                         | 19 |
| 3.1.5. Kemik İyileşme Mekanizması ve Rejenerasyonu                     | 22 |
| 3.1.5.1. OPG-RANKL Biyolojik Belirteçleri                              | 24 |
| 3.1.5.2. Kemik Defektleri ve Sınıflandırılması                         | 25 |
| 3.1.5.3. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu                            | 26 |
| 3.1.6. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonunda Kullanılan Biyomateryaller | 28 |
| 3.1.6.1. Trombosit Konsantreleri Kullanımı                             | 28 |
| 3.1.6.1.1. Trombositler                                                | 28 |
| 3.1.6.1.2. Trombositten Zengin Fibrin (PRF)                            | 29 |
| 3.1.6.1.2.1. PRF Yapısı ve Etki Mekanizmaları                          | 29 |
| 3.1.6.1.2.2. PRF Elde Edilmesi ve İşlem Protokolü                      | 31 |
| 3.1.6.1.2.3. Saf Trombositten Zengin Fibrin (P- PRF)                   | 33 |
| 3.1.6.1.2.4. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (L-PRF)             | 33 |
| 3.1.6.1.2.5. PRF Kullanım Yerleri                                      | 35 |
| 3.1.6.1.2.6. PRF Kullanımında Avantajlar                               | 38 |
| 3.1.6.1.2.7. PRF Kullanımında Dezavantajlar                            | 38 |
| 3.1.6.2. Mine Matriks Türevi Protein (Emdogain) Kullanımı              | 39 |
| 3.1.6.2.2. Mine Matriks Türevi Proteinin Yapısı                        | 40 |
| 3.1.6.2.3. Mine Matriks Proteini (EMD) Etki Mekanizmaları              | 40 |
| 3.1.6.3. Kemik Greftleri Kullanımı                                     | 43 |
| 3.1.6.3.1. Kemik Greft Materyallerinin Mekanizması                     | 46 |
| 3.1.6.3.2. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması                        | 47 |
| 3.1.6.3.2.1. Otojen greftler                                           | 47 |
| 3.1.6.3.2.2. Allogreftler                                              | 49 |
| 3.1.6.3.2.3. Alloplastik greftler                                      | 52 |
| 3.1.6.3.2.4. Ksenogreftler                                             | 54 |

|                                                    |            |
|----------------------------------------------------|------------|
| 3.1.6.4. Bariyer Membran Kullanımı                 | 56         |
| 3.1.6.4.1. Rezorbe Olmayan Bariyer Membranlar      | 58         |
| 3.1.6.4.2. Rezorbe Olan Membranlar                 | 60         |
| <b>4. GEREÇ VE YÖNTEM</b>                          | <b>63</b>  |
| 4.1. Deney Hayvanları Seçimi ve Cerrahi Düzenek    | 63         |
| 4.1.1. Gruplar                                     | 63         |
| 4.1.2. Cerrahi Yöntem                              | 67         |
| 4.2. PRF elde edilmesi                             | 68         |
| 4.3. Defektlerin Titanyum Kubbeler ile Kapatılması | 70         |
| 4.4. Kemik Örneklerinin Elde Edilmesi              | 73         |
| 4.5. Kesitlerin Hazırlanması                       | 73         |
| 4.6. Kesitlerin Histopatolojik Açıdan İncelenmesi  | 74         |
| 4.7. İmmunohistokimyasal İnceleme                  | 75         |
| 4.8. İstatistiksel İncelemeler                     | 76         |
| <b>5. BULGULAR</b>                                 | <b>77</b>  |
| 5.1. Yeni Kemik Oluşumu                            | 77         |
| 5.2. Osteoblast Düzeyleri                          | 78         |
| 5.3. Osteoklast Düzeyleri                          | 79         |
| 5.4. Fibrozis                                      | 80         |
| 5.5. Anjiyogenezis                                 | 81         |
| 5.6. OPG                                           | 82         |
| 5.7. RANKL                                         | 83         |
| 5.8. OPG/RANKL Düzeyi                              | 85         |
| <b>6. TARTIŞMA</b>                                 | <b>92</b>  |
| <b>7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>                     | <b>126</b> |
| <b>8. KAYNAKLAR</b>                                | <b>130</b> |
| <b>9. EKLER</b>                                    | <b>146</b> |
| <b>10. ÖZGEÇMİŞ</b>                                | <b>147</b> |



## TABLO LİSTESİ

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tablo 1.</b> Kemik greft materyallerinin karakteristik özellikleri              | 46 |
| <b>Tablo 2.</b> Grupların yeni kemik oluşumu düzeyleri açısından değerlendirilmesi | 77 |
| <b>Tablo 3.</b> Grupların osteoblast düzeyleri açısından değerlendirilmesi         | 79 |
| <b>Tablo 4.</b> Grupların osteoklast düzeyleri açısından değerlendirilmesi         | 80 |
| <b>Tablo 5.</b> Grupların fibrozis düzeyleri açısından değerlendirilmesi           | 81 |
| <b>Tablo 6.</b> Grupların anjiogenezis düzeyleri açısından değerlendirilmesi       | 82 |
| <b>Tablo 7.</b> Grupların OPG düzeyleri açısından değerlendirilmesi                | 83 |
| <b>Tablo 8.</b> Grupların RANKL düzeyleri açısından değerlendirilmesi              | 84 |
| <b>Tablo 9.</b> Grupların OPG/RANKL düzeylerinin değerlendirilmesi                 | 85 |

## RESİM LİSTESİ

|                  |                                                                                                                                                                                     |    |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Resim 1.</b>  | PRF oluşturulması                                                                                                                                                                   | 30 |
| <b>Resim 2.</b>  | Hastadan kan alımı ve alınan kanın santrifüj cihazına yerleştirilmesi                                                                                                               | 31 |
| <b>Resim 3.</b>  | PRF çeşitleri (L-PRF, I- PRF ve A- PRF) (87)                                                                                                                                        | 34 |
| <b>Resim 4.</b>  | PRF'in kemik grefti ile karıştırılarak kemik artırımı için kombine kullanımı                                                                                                        | 35 |
| <b>Resim 5.</b>  | Gömülü üçüncü mandibular molar dişin enükleasyonu ve PRF kullanımı                                                                                                                  | 36 |
| <b>Resim 6.</b>  | Alveolar kret kemiği artırımında PRF kullanımı                                                                                                                                      | 36 |
| <b>Resim 7.</b>  | Diş çekiminden sonra görülen alveolitisin tedavisinde PRF kullanımı                                                                                                                 | 36 |
| <b>Resim 8.</b>  | Alveolar soket korunmasında PRF kullanımı                                                                                                                                           | 37 |
| <b>Resim 9.</b>  | Greft verici bölgesinde yara iyileşmesinde ve yumuşak doku cerrahisinde PRF kullanımı                                                                                               | 37 |
| <b>Resim 10.</b> | Emdogain'in kemik içi defektlerde ve yumuşak doku cerrahilerinde uygulanması (Straumann, İsveç)                                                                                     | 42 |
| <b>Resim 11.</b> | Emdogain'in kemik defektinde uygulanmasından sonra oluşan kemiğin radyolojik olarak görüntülenmesi (Dr. Gunnar Heden, Straumann,İsveç)                                              | 42 |
| <b>Resim 12.</b> | Alveolar kret kemiği artırımında kemik grefti kullanılması                                                                                                                          | 45 |
| <b>Resim 13.</b> | Alveolar kret kemiği artırımında otojen blok greft uygulanması                                                                                                                      | 47 |
| <b>Resim 14.</b> | Kemik artırımında allogreft kemik greftinin uygulanması                                                                                                                             | 49 |
| <b>Resim 15.</b> | Otojen greft ve sığır kaynaklı ksenogreft                                                                                                                                           | 56 |
| <b>Resim 16.</b> | Çalışma için hayvanların anestesizisinden sonra kalvaryum kemiklerinin olduğu baş kısmının tıraş edilmesi ve hazırlanması                                                           | 67 |
| <b>Resim 17.</b> | Baş kısmının tıraş edilmesinden sonra hayvanın kalvaryum kemiğinin üzerindeki derinin insizyonu ve serum fizyolojik ile linea media üzerinde 9 adet dekortikasyon kavitesi açılması | 68 |
| <b>Resim 18.</b> | Genel anestezi altında olan hayvanlardan PRF elde etmek için açık kalp metoduna göre kan alınması                                                                                   | 69 |
| <b>Resim 19.</b> | Genel anestezi altında olan hayvanlardan PRF elde etmek için açık kalp metoduna göre kan alınması                                                                                   | 69 |

|                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Resim 20.</b> Hayvanlardan açık kalp metoduna göre alınan kanın 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmesi                                   | 69 |
| <b>Resim 21.</b> Kanın santrifüj edilmesinden sonra PRF elde edilmesi                                                                     | 70 |
| <b>Resim 22.</b> Kubbelerin hazırlanması                                                                                                  | 71 |
| <b>Resim 23.</b> Kubbelerin hazırlanan PRF ile doldurulması                                                                               | 71 |
| <b>Resim 24.</b> Kubbelerin Emdogain® Multipack Straumann® ile doldurulması                                                               | 71 |
| <b>Resim 25.</b> Kubbelerin partikül ksenogreft kemik grefti (Bioinnovation Bonefill Turkey) ile doldurulması                             | 72 |
| <b>Resim 26.</b> Kubbelerin PRF ve KG ile doldurulması                                                                                    | 72 |
| <b>Resim 27.</b> Greft materyalleri ile doldurulan kubbelerin ratların kalvaryum kemiklerine Perioacryl® ile yerleştirilmesi              | 72 |
| <b>Resim 27.</b> Kontrol grubunda hafif derecede yeni kemik oluşumunda histolojik görünüm (Hemtoksilen eozin 20x büyütme)                 | 86 |
| <b>Resim 28.</b> Emdogain grubunda orta derece yeni kemik oluşumunda histolojik görünüm (Hemotoksilen eozin 20x büyütme)                  | 86 |
| <b>Resim 29.</b> PRF+ EMD+ KG grubunda yüksek seviye yeni kemik oluşumunda histolojik görünüm (Hematoksilen eosin x20 büyütme)            | 87 |
| <b>Resim 30.</b> KG grubunda yoğun seviyede osteoblast- osteoklast hücreleri histolojik görünüm (Hematoksilen eozin 20x büyütme)          | 87 |
| <b>Resim 31.</b> Kontrol grubunda görülen orta seviye fibrozis alanı histolojik görünüm(Hematoksilen eozin 20x büyütme)                   | 88 |
| <b>Resim 32.</b> PRF+ KG grubunda görülen yoğun seviye anjiogenezis alanları histolojik görünüm (Hemotoksilen eozin 20x büyütme)          | 88 |
| <b>Resim 33.</b> PRF grubunda görülen orta seviye OPG boyanma ile osteoblastların immunohistolojik görünümü (OPG boyama 20x büyütme)      | 89 |
| <b>Resim 34.</b> EMD grubunda görülen orta seviye OPG boyaması ile osteoblastların immunohistolojik görünümü (OPG boyama 20x büyütme)     | 89 |
| <b>Resim 35.</b> PRF+KG grubunda görülen yoğun seviye OPG boyaması ile osteoblastların immunohistolojik görünümü (OPG boyama 20x büyütme) | 90 |

**Resim 36.** Kontrol grubunda görülen orta seviye RANKL boyanması ile osteoklastların immunohistolojik görünümü (RANKL boyama 40x büyütme) 90

**Resim 37.** KG grubunda görülen yoğun seviye RANKL boyaması ile osteoklastların immunohistolojik görünümü (RANKL boyama 40x büyütme) 91



## ŞEKİL LİSTESİ

|                  |                                                                                                                                          |    |
|------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Şekil 1.</b>  | Periodonsiyum                                                                                                                            | 8  |
| <b>Şekil 2.</b>  | Kemik dokusu hücreleri                                                                                                                   | 15 |
| <b>Şekil 3.</b>  | YDR'nin temel elemanları.                                                                                                                | 21 |
| <b>Şekil 4.</b>  | Kemik dokusu oluşum ve rezorpsiyon mekanizması                                                                                           | 22 |
| <b>Şekil 5.</b>  | Alınan kanın santrifüj edilmesi                                                                                                          | 31 |
| <b>Şekil 6.</b>  | Santrifüj edildikten sonra tüpte oluşan tabakalar ve PRF tabakası                                                                        | 32 |
| <b>Şekil 7.</b>  | Allogreftlerin (DKKA) işlenerek elde edilmesi                                                                                            | 51 |
| <b>Şekil 8.</b>  | YDR' de bariyer membran kullanımı                                                                                                        | 57 |
| <b>Şekil 9.</b>  | Bariyer membranların etki mekanizmaları                                                                                                  | 58 |
| <b>Şekil 10.</b> | Yumuşak doku hücre göçünün önlenmesi ve kemik rejenerasyonunun desteklenmesi için fiziksel bariyer olarak titanyum ağ(mesh) kullanılması | 60 |
| <b>Şekil 11.</b> | DeneySEL çalışma düzeneği                                                                                                                | 66 |
| <b>Şekil 12.</b> | Gruplarda yeni kemik oluşumunun grafik şeklinde gösterilmesi                                                                             | 78 |
| <b>Şekil 13.</b> | Gruplarda osteoblast düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi                                                                           | 79 |
| <b>Şekil 14.</b> | Grupların osteoklast düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi                                                                           | 80 |
| <b>Şekil 15.</b> | Gruplarda fibrozis düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi                                                                             | 81 |
| <b>Şekil 16.</b> | Gruplarda anjiogenezis düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi                                                                         | 82 |
| <b>Şekil 17.</b> | Gruplarda OPG düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi                                                                                  | 83 |
| <b>Şekil 18.</b> | Gruplarda RANKL düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi                                                                                | 84 |
| <b>Şekil 19.</b> | Gruplarda OPG/ RANKL oranlarının grafik şeklinde gösterilmesi                                                                            | 85 |

## KISALTMALAR

|                                |                                                                                       |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>ALP</b>                     | : Alkalen fosfotaz                                                                    |
| <b>A-PRF</b>                   | : Gelişmiş trombositten zengin fibrin (Advanced platelete rich fibirn)                |
| <b>avb3</b>                    | : İntegrin alfa v beta 3 proteini                                                     |
| <b>BMP</b>                     | : Kemik morfojenik proteini (Bone morfogenic protein)                                 |
| <b>c AMP</b>                   | : Siklik adenozin monofosfat                                                          |
| <b>°C</b>                      | : Santigrat derece                                                                    |
| <b>CaP</b>                     | : Kalsiyum fosfat                                                                     |
| <b>CaSO<sub>4</sub></b>        | : Kalsiyum sülfat                                                                     |
| <b>Cc</b>                      | : Santimetreküp                                                                       |
| <b>CGF</b>                     | : Konsantre büyüme faktörü                                                            |
| <b>CO<sub>2</sub></b>          | : Karbondioksit                                                                       |
| <b>d- PTFE</b>                 | : Yüksek yoğunluklu politetrafloretillen                                              |
| <b>DDKKA</b>                   | : Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti                                |
| <b>DFKH</b>                    | : Dental folikül kök hücreleri                                                        |
| <b>DKKA</b>                    | : Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti                                             |
| <b>DKM</b>                     | : Demineralize kemik matriksi                                                         |
| <b>e- PTFE</b>                 | : Genişletilmiş politetrafloretillen                                                  |
| <b>EGF</b>                     | : Endotelyal büyüme faktörü                                                           |
| <b>EMD</b>                     | : Mine matris türevi (Emdogain)                                                       |
| <b>FDA</b>                     | : Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (The Food and Drug Administration) |
| <b>FGF- <math>\beta</math></b> | : Fibroblastik büyüme faktörü beta                                                    |
| <b>G</b>                       | : Gram                                                                                |
| <b>GF</b>                      | : Büyüme faktörü                                                                      |
| <b>HA</b>                      | : Hidroksiapatit                                                                      |
| <b>HIV</b>                     | : İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü                                                  |
| <b>Ig G</b>                    | : İmmunoglobulin G antikoru                                                           |
| <b>IGF</b>                     | : İnsülin benzeri büyüme faktörü                                                      |
| <b>IL- 1</b>                   | : İnterlökin 1                                                                        |

|                        |                                                                                 |
|------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <b>IL- 6</b>           | : İnterlökin 6                                                                  |
| <b>I-PRF</b>           | : Enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (Injectable platelete rich fibrin) |
| <b>KG</b>              | : Kemik grefti                                                                  |
| <b>Kg</b>              | : Kilogram                                                                      |
| <b>L- PRF</b>          | : Lökosit ve trombosit zengin fibrin (Leukocyte and platelete rich fibrin)      |
| <b>L</b>               | : Litre                                                                         |
| <b>m- RNA</b>          | : Mesajcı ribonükleik asit                                                      |
| <b>M-CSF</b>           | : Makrofaj koloni uyarıcı faktör                                                |
| <b>Mg</b>              | : Miligram                                                                      |
| <b>Mikro-BT</b>        | : Mikro Bilgisayarlı Tomografi                                                  |
| <b>ml</b>              | : Mililitre                                                                     |
| <b>mm</b>              | : Milimetre                                                                     |
| <b>µm</b>              | : Mikrometre                                                                    |
| <b>ODKG</b>            | : Otojenik diş kemik grefti                                                     |
| <b>OPG</b>             | : Osteoprotegrin                                                                |
| <b>P- PRF</b>          | : Saf trombosit zengin fibrin                                                   |
| <b>PDGF</b>            | : Trombosit dönüştürücü büyüme faktörü                                          |
| <b>PDL</b>             | : Periodontal ligament                                                          |
| <b>PGE- 2</b>          | : Prostaglandin E2                                                              |
| <b>Ph</b>              | : Asitlik bazlık değeri                                                         |
| <b>PLA</b>             | : Polilaktik asit                                                               |
| <b>PLGA</b>            | : Poliglikolidkolaktit                                                          |
| <b>PRF</b>             | : Trombosit zengin fibrin (Platelete rich fibrin)                               |
| <b>PRP</b>             | : Trombosit zengin plazma (Platelete rich plasma)                               |
| <b>PTFE</b>            | : Politetrafloretillen                                                          |
| <b>RANK</b>            | : Nükleer faktör kappa                                                          |
| <b>RANKL</b>           | : Nükleer faktör kappa ligandı                                                  |
| <b>rpm</b>             | : 1 dakikada olan dönüş sayısı                                                  |
| <b>SiO<sub>2</sub></b> | : Silikon dioksit (Silika)                                                      |
| <b>T- PRF</b>          | : Titanyum tüpte oluşturulan trombosit zengin fibrin                            |

|                                |                                      |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| <b>TGF- <math>\beta</math></b> | : Dönüştürücü büyüme faktörü beta    |
| <b>TGF-2</b>                   | : Dönüştürücü büyüme faktörü 2       |
| <b>TNF</b>                     | : Tümör nekrotizan faktör            |
| <b>TNFR</b>                    | : Tümör nekrotizan faktör reseptörü  |
| <b>VEGF</b>                    | : Vasküler endotelyal büyüme faktörü |
| <b>YDR</b>                     | : Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu  |
| <b>YKR</b>                     | : Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu |
| <b><math>\alpha</math>-TKF</b> | : Alfa trikalsiyum fosfat            |
| <b><math>\beta</math>-TKF</b>  | : Beta trikalsiyum fosfat            |





## 1. ÖZET

Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR), kaybedilen dokuların yenilenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir. Sement, periodontal ligament (PDL) ve kemik gibi periodontal dokuların yeniden oluşturulması amacıyla çeşitli materyaller kullanılmaktadır.

Çalışmamızda trombosit (platelet) zengin fibrin (PRF), mine matriks türevi protein ve kemik greftinin kullanılıp etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan YDR’de yeni kemik oluşumu incelendi. Denekler rastgele olacak şekilde, Kontrol grubu (n=13), PRF grubu (n=13), PRF ve Kemik Grefti grubu (KG) (n=13), Emdogain (EMD) (n=13), Emdogain ve Kemik Grefti grubu (n=13), Kemik Grefti grubu (n=13) ve PRF, Emdogain ve Kemik Greftinin uygulandığı grup (n=13) olmak üzere 7 gruba ayrıldı. PRF elde edilmek üzere ayrıca (n=36) bir grup oluşturuldu. Deneklerin kalvaryum kemiklerine titanyum kubbeler yerleştirilerek üç ay sonrasında sakrifiye edildi. Deneklerden alınan kemik örnekleri yeni oluşan kemik miktarı, osteoblast- osteoklast miktarı, anjiogenezis ve fibrozis açısından histopatolojik, OPG-RANKL boyama kitleriyle kemik oluşumu immuno histokimyasal olarak incelendi. Çalışmamızda istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı.

PRF grubu, orta düzeyde yeni kemik oluşumu açısından PRF ve KG, EMD ve KG, PRF, EMD ve KG gruplarına göre istatistiksel olarak daha yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). EMD grubu orta düzeyde kemik oluşumu açısından PRF, EMD ve KG grubuna göre istatistiksel olarak daha yüksekti ( $p<0.05$ ). Gruplar arasında yüksek düzey kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark

bulunmadı. Osteoblast ve osteoklast düzeyleri, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). Fibrozis ve anjiogenezis incelendiğinde gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ). OPG-RANKL ile OPG/RANKL düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0.05$ ).

Çalışmanın verilerine bakılarak YDR’de kemik oluşumunu artırılmasında, PRF, Emdogain ve kemik grefti kullanımı olumlu sonuçlar verdiği söylenebilir.

**Anahtar Kelimeler:** PRF, emdogain, ksenogreft, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu.

## **2. ABSTRACT**

### **THE INVESTIGATION OF THE EFFECT OF MINE MATRIX PROTEIN, PLATELET RICH FIBRIN (PRF) AND BONE GRAFT ON NEW BONE FORMATION IN GUIDED TISSUE REGENERATION IN RATS OF CALVARIUM**

Guided tissue regeneration (GTR) is an important technique used to regenerate lost tissues. Various materials are used to reconstruct periodontal tissues such as cement, periodontal ligament (PDL), and bone.

In our study, new bone formation in GTR, which was performed to evaluate the effects of platelet-rich fibrin (PRF), enamel matrix-derived protein and bone graft, was examined. For this purpose, the subjects were randomized, Control group (n=13), PRF group (n=13), PRF and Bone Graft group (n=13), Emdogain (EMD) (n=13), Emdogain and Bone Graft group (BG) (n=13), Bone Graft group (n=13) and the group in which PRF, Emdogain and Bone Graft were applied (n=13). A group (n=36) was also formed to obtain PRF. Titanium domes were placed on the calvarial bones of the subjects and they were sacrificed after 3 months. Bone samples taken from the subjects were evaluated histologically in terms of newly formed bone amount, osteoblast-osteoclast amount, angiogenesis and fibrosis, and bone formation was examined immunohistochemically with OPG-RANKL staining kits. In our study, IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Turkey) program was used for statistical analysis.

PRF group was found to be statistically higher than PRF and BG, EMD and BG, PRF, EMD and BG groups in terms of moderate new bone formation ( $p<0.05$ ). In terms of moderate bone formation, the EMD group was statistically higher than the PRF, EMD and BG groups ( $p<0.05$ ). There was no statistically significant

difference between the groups in terms of high level bone formation ( $p>0.05$ ). The amounts of osteoblasts and osteoclasts were not statistically different between the groups ( $p>0.05$ ). When fibrosis and angiogenesis were examined, no significant difference was found between the groups ( $p>0.05$ ). There was no statistically significant difference between the OPG-RANKL staining and OPG/RANKL ratio groups ( $p>0.05$ ).

In our study, it can be said that the use of PRF, Emdogain and bone grafts to increase bone formation in directed tissue regeneration gives positive results.

**Key words:** PRF, emdogain, xenograft, guided tissue regeneration.

### 3. GİRİŞ

Rejeneratif tedavi, hastalık veya yaralanma sonucu hasar gören ağız dokularının değiştirilmesini ya da yenilenmesini içermektedir (1). Periodontal hastalık, ağız sağlığı üzerinde ciddi hasarlar yaratma potansiyeli olan, dişeti, alveolar kemik, periodontal ligament (PDL) ve sement gibi dişin destekleyici dokularını olumsuz etkileyen bir durumdur. Patojen nitelikte olan mikroorganizmaların kombinasyonunu ve predispozan bir konakçı yanıtını içeren karmaşık bir patogeneze sahiptir (2). Periodontal hastalıklarla kaybedilen dokuların yenilenmesi, periodontal tedavinin amacı haline gelmiştir (3).

Periodontal tedavi sonrası yara iyileşmesi histolojik açıdan, uzun bağlantı epitel ataçmanı, yeni ataçman ve periodontal rejenerasyon oluşması şeklinde sonuçlanabilmektedir (4). Rejeneratif periodontal tedavi, periodontal inflamasyonun ağırlaşması nedeniyle kaybedilen dokuların yerine, yeni sement, PDL ve alveolar kemik oluşturulması ile karakterizedir (5).

2017 Periodontal ve Peri-İmplant Hastalıklarının ve Koşullarının Sınıflandırılması Dünya Çalıştayı, periodontitisi, disbiyotik plak biyofilmleriyle ilişkili ve diş destek dokularının aşamalı olarak yıkıma uğraması ile karakterize, kronik çok faktörlü inflamatuvar bir hastalık olarak tanımlamıştır (6). Periodontitis tedavisi, aktif tedavi ile iltihaplanmayı en aza indirerek hastalığın daha fazla ilerlemesini önlemeyi ve sağlıklı periodonsiyumun desteklenmesini amaçlamaktadır (7). Diştaşı temizliği, kök yüzeyi düzleştirme ve dişeti küretajı gibi geleneksel tedaviler, hastalığa bağlı kusurların giderilmesinde ve periodontitisin ilerlemesinin durdurulmasında oldukça etkili olmasına rağmen, kaybedilen periodontal yapıların rejenerasyonunu sağlamada daha az etkilidirler. Tedavide, kayıp periodontal dokuları

rejenere etme yeteneğini artıran etkili teknikler ile fonksiyonel dokuların yeniden oluşturulması sağlanmalıdır (8).

Tedavi edilmeyen periodontal hastalığın sonuçlarının, bireyin yaşam kalitesi üzerinde ve ekonomik maliyette geniş kapsamlı etkileri vardır. Periodontal tedavi, dişeti bağ dokusu, sement, alveolar kemik ve PDL rekonstrüksiyonunu gerektirir. PDL'nin görevi hem sementi hem de alveolar kemiğe gömülü kısmı olan sharpey liflerini oluşturmak, diş ve destek dokuları arasındaki bağlantıları geri kazandırmaktır (9).

Periodontitis, genellikle kemik içi defektlerin oluşumu ile karakterizedir. Kemik içi defektler, bir, iki veya üç kemik duvarı ile çevrili, periodontal hastalığın ilerlemesinin sonucudur (10). Kemik içi defektleri tedavi etmek için uygulanan çoklu cerrahi yaklaşımlar klinik, radyografik parametrelerin, klinik ataçman seviyesinin ve defektin iyileştirildiği gösterilmiştir. Kemik içi defektleri rejenere etmek için kemik greftleri, YDR ve biyolojik ajanların kullanımı gibi birçok cerrahi teknik kullanılmıştır (11). Kaybedilen periodontal dokuların tedavisinde, bariyer membran kullanılarak istenmeyen dokuların defekt alanına ilerlemesinin engellenmesi prensibinden yola çıkılarak oluşturulan YDR, periodontitisin oluşturduğu doku tahribatının tedavisinde umut verici bir teknik olarak görülmektedir (12).

Basit onarım ile karşılaştırıldığında, periodontal rejenerasyon, periodontal dokuların rekonstrüksiyonu yoluyla ortaya çıkan ideal bir iyileşme sürecidir. Çalışmalar, periodontal rejenerasyon tedavisinin geleneksel tedavilere göre daha fazla klinik gelişme gösterdiğini kanıtlamıştır. Rejeneratif periodontal tedavi, PDL'nin rejenerasyonuna, yeni ataçmanlar, sement ve alveolar kemik oluşumuna yol açan biyomateryaller gerektirir (13). Bariyer membranlar, kemik greftleri, büyüme

faktörleri ve bu tedavilerin kombinasyonunun kullanımı gibi çeşitli rejeneratif periodontal tedavi yöntemleri araştırılmıştır (14).

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR), YDR ile aynı prensibe dayanan tedavi yöntemidir. YKR tedavisi, yumuşak dokuları mekanik olarak engelleyerek, kemikten kaynaklanan osteojenik hücre popülasyonlarının oluşturulması ile kemik defektlerinin rejenerasyonunu sağlar. YKR, kritik boyuttaki maksillofasiyal defektlerin rejenerasyonunu, osteogenez potansiyelini ve implantların yerleştirilmesi ile bağlantılı olarak atrofik alveolar rekonstrüksiyonu artırır (15).

YDR, ‘sihirli dolgu materyali’ arayışına odaklanmıştır. Bu arayış ile, otolog kemik ve kemik iliği, allogreftler, ksenogreftler ve çeşitli kemik greftleri kullanılan tedaviler gündeme gelmiştir (16). YDR, fiziksel olarak korunan bir cerrahi bölge elde etmek için, polimer membran kullanır (12). YDR/YKR, bariyer membranlarla, insan, hayvan ve sentetik kaynaklı kemik grefti materyallerinin yanı sıra kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler) ve mine matriks proteini gibi biyoaktif büyüme faktörlerini kullanmayı içermektedir. Bazı araştırmacılar, hastanın kendi periferik kanından üretilen üç boyutlu iskeletlerin kullanılabileceğini göstermişlerdir (17). Bu yaklaşım, antikoagülan kullanılmadan trombosit konsantrasyonundan oluşturulan materyallerin keşfedilmesine dayanmaktadır. PRF, daha önce kullanılan trombosit (platelet) açısından zengin plazmanın (PRP) geliştirilmiş bir formülasyonudur (1).

YDR ile tedavide, rezorbe olan veya rezorbe olmayan bariyer membran kullanılması çok önemlidir. Periodontal defektler veya hasarlanmış kök yüzeylerinde bariyer membranlar, PDL ve kemik hücrelerinin izole edilmiş alanları yeniden doldurmasına izin verir (18). Dental implantolojide, YKR membranları, mekanik destek sağlamak ve implant yerleştirilmesinde gerekli bölgelerde kemik artırımını

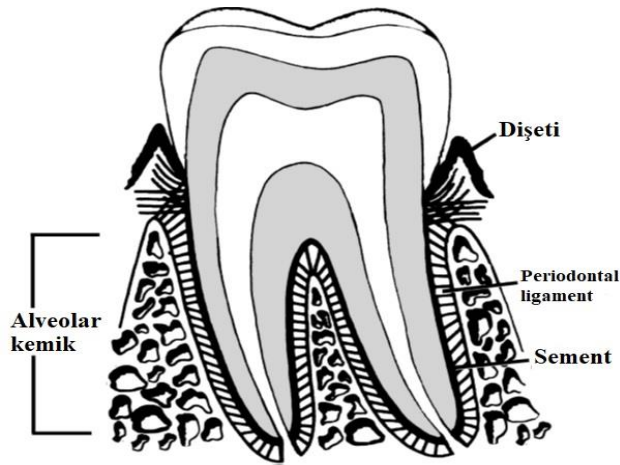
sağlamak için kullanılır (16). Farklı periodontal dokuların sağlığının ve işlevinin yeniden sağlanmasına yardımcı olmak amacıyla, yeni biyomateryaller, özellikle biyoaktif membranlar veya greftler bulmak son derece önemlidir (12).

Bu çalışma, ratların kalvaryum kemiklerinde oluşturulan kemik defektlerinde PRF, EMD ve kemik grefti kullanılarak gerçekleştirilen YDR'nin, oluşan kemik yüzeylerinde karşılaştırılması ve yeni kemik oluşumuna etkilerinin histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesini içermektedir.

### 3.1. Genel Bilgiler

#### 3.1.1. Periodonsiyum

Periodonsiyum; dişeti ve PDL gibi iki yumuşak; sement ve alveolar kemik gibi iki sert bağ dokusundan oluşur (19). Periodonsiyum, dişe gelen çiğneme kuvvetlerine dayanabilen, çene kemiğine bağlantı sağlayan fonksiyonel bir birimdir. Ağız boşluğunda homeosteziyi sağlayan önemli bir organdır (20). Bu bileşenler arasında PDL, sement ile alveolar kemik arasında köprü görevi gören, temel yapısal oluşumdur. Fibrillerden oluşan PDL, diş kökünün yüzeyini diş soketine bağlayan özel bir bağ dokusudur (14).



Şekil 1. Periodonsiyum (14)



#### **3.1.1.1. Periodontal Ligament**

PDL, zengin arteriyolar pleksus içeren vasküler bir dokudur, ayrıca duyuşal stimölasyona cevap veren sinir reseptörleri bakımından zengindir. Tüm diğler bağ dokuları gibi, PDL, hücrelerden, kollajen fibrillerin hücre dışı bir bileşeninden ve kollajen olmayan hücre dışı matriksten oluşur (21). PDL’de, sementoblastlar, osteoblastlar, fibroblastlar, miyofibroblastlar, endotelyal hücreler, sinir hücreleri, epitelyal hücreler ve farklılaşmamış mezenkimal hücreler dahil olmak üzere birçok hücre vardır. Bunlarla birlikte, in vivo çalışmalarda daha az sayıda “kök hücre” tanımlanmıştır (22). Hücre dışı matriks, kollajen ve kollajen olmayan proteinlerden oluşur (23). PDL fibrilleri esas olarak tip I kollajenden oluşur, ancak tip III kollajen de yapısında bulunur (14).

İnsanda PDL, yaklaşık 0.2 mm genişliğindedir ve diş üzerindeki çığneme kuvvetlerinin, yoğun kollajen fibrilleriyle absorbe edilmesi için mekanik direnç sağlar (9). PDL’in, dişleri kemiğe bağlamak, dişeti dokularını korumak, oklüzal kuvvetleri kemiğe iletmek ve bu kuvvetlerin etkisine direnmek gibi görevleri vardır. PDL rejenerasyonu, periodontal tedavi için önemli bir gereksinimdir (24). PDL liflerine bir kez zarar geldiğinde bunu onarmak için kullanılabilecek sentetik hiçbir biyomateryal yoktur. Rejenerasyon, periodontal hasarlardan sonra PDL’yi geri oluşturmak için tek tedavi yaklaşımını sunar (14).

#### **3.1.1.2. Sement**

Dişin kök yüzeyini kaplayan, özel bir mineralize doku olan sement, periodonsiyumun önemli bir bileşenidir (25). Sement, damar içermemesine, yeniden şekillenmemesine rağmen, kemiğe benzer bir yapıya ve bileşime sahip mineralize bir

dokudur (21). Sement, anatomik olarak dişin ayrılmaz bir parçası olmasının yanında, fonksiyonel olarak, periodonsiyumun bir bileşenidir ve asıl rolü, sharpey lifleri için bağlanma yeridir. Sement, dişin kökü içinde sementoblast adı verilen hücreler tarafından oluşturulur. Rengi sarımsıdır, daha az mineralleşmesi nedeniyle mine ve dentinden daha yumuşaktır (26).

Sementin yaklaşık %45 ile %50'si inorganik olan hidroksiapatitten (HA) oluşur, geri kalan %50'sini ise organik olarak kollajen ve kollajen olmayan matriks proteinleri oluşturur. Tip III ve XII kollajen, sementteki organik bileşenin %90'ını oluşturur. Yapısında tip I kollajen de bulunur. Sement, kollajen olmayan, kemikle ilişkili proteinler olan sialoprotein, osteopontin, osteokalsin ve osteonektin içerir (9).

Sement yapısına göre hücresiz ve hücreli sement olmak üzere ikiye ayrılır. Hücresiz sement (primer sement), sharpey lifleri içerir ve kökü PDL'ye sabitlemeye yarar. Hücreli sement (sekonder sement), diş, oklüzal düzleme ulaştıktan sonra oluşur ve hücresiz sement ile karşılaştırıldığında, bileşim olarak daha düzensizdir (14). Periodontal rejenerasyonda, hücresiz sementin rejenerasyonunun altın standart olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, yeni hücreli sement oluşumu ve bu sementle bağ dokusunun bağlanması mekanizması henüz açıklanamamıştır (27). Sement rejenerasyonunun meydana gelmesi için ortamın, yeni hücrelerin alınımına elverişli olması ve yaranın bu dokunun yenilenmesi için uygun olması gerekmektedir (28).

### **3.1.1.3. Dişeti**

Dişeti, kemiğe sıkıca bağlıdır. Altta bir bağ dokusu olan lamina propriaya ve skuamöz epitele sahiptir. Dış epitel, normal ağız fonksiyonu sırasında çiğneme ve travmatik kuvvetlere dayanacak şekilde keratinize olmuştur. Epitel olgunlaşması

(turn-over'ı), bazal tabakadaki hücrelerin mitoz geçirerek, supra-bazal tabakalardaki hücelere farklılaşmasını belirtir. Oral epitelin ana hücresele bileşeni keratinositlerdir. Oral epitelde bulunan keratinositler arasında langerhans hücreleri, merkel hücreleri, melanositler ve lenfositler gibi inflamatuvar hücreler bulunur. Ağız epitelinin altındaki bağ dokusu tabakası, fibroblastlar, immun hücreler, endotel hücreler, kan ve lenfatik damarlar, nöral yapıların yanı sıra kollajen ve kollajen olmayan proteinlerden oluşur (23).

#### **3.1.1.4. Alveolar Kemik**

Alveolar kemik, diş soketlerini içeren, kalınlaşmış kemik yapısıdır. Fetal büyüme sırasında, intramembranöz kemikleşme ile oluşur ve osteoblast-osteoklast aktivitesi ile sürekli olarak yeniden şekillenir Alveolar kemiğin mineral içeriği çoğunlukla hidroksiapatittir (HA) (14). Alveolar kemik, dışta kalın kortikal kemik plakasından ve kompakt kemiğin içinde bulunan süngerimsi trabeküllerden oluşur (9, 25).

Alveolar kemiğin dış yüzeyleri periosteum ile iç yüzeyleri endosteum ile kaplıdır (14). Alveolar kemiğin iç yüzü, demet kemik olarak adlandırılır. Bu kemiğin içinde PDL'nin kollajen lifleri (sharpey lifleri) bulunur. Demet kemik, genellikle diğer kemik türlerine göre daha az kollajen lif içerir. Alveolar kemik, normal fonksiyon ve artan mekanik yükleme sırasında yeniden şekillenir (9). Kemiğin konturu köklerin topografisini takip eder (14).

##### **3.1.1.4.1. Kemik Yapısı**

Kemik dokusu, mineral ve organik yapının bileşiminden oluşan özelleşmiş bir bağ dokusudur. Osteoblastlar, osteositler, kemik örtü hücreleri ve osteoklastlar gibi

hücresel elemanlara sahiptir. Morfolojik olarak, kansellöz (süngerimsi) ve kortikal (lameller) kemikten meydana gelmektedir (29).

Kemik ağırlığının %30-35'ini oluşturan kemik organik matriksi, %90 tip I kollajen ve %10 kollajen olmayan proteinler, proteoglikanlar, glikoproteinler karbonhidratlar ve lipitlerden oluşur. Osteoblastlar tarafından sentezlenir ve mineralize olmamış haline 'osteoid' adı verilir. Kollajen lifler içerisinde kalsiyum-fosfat iyonlarının birikmesiyle hidroksiapatit kristalleri oluşur. Kollajen olmayan proteinler ise mineralin yayılımına ve matriksin bir bütün olarak mineralizasyonuna yardımcı olmaktadır (30).

#### **3.1.1.4.2. Kemiğin Tabakaları**

Kemik dışta periosteum, içte endosteum tabakalarıyla örtülüdür. Periosteum, eklem yüzeyleri dışında tüm kemiği dıştan çevreleyen vasküler, konnektif bağ dokusudur. Kemiğe destek sağlayarak, kemiğin beslenmesi, gelişimi ve tamirinde önemli rolü vardır. Periosteum, içeriğindeki sharpey lifleri adı verilen kollajen uzantılar ile kemiğe sıkıca bağlanır (24).

Periosteum, dışta fibröz tabaka ve içte osteojenik tabaka olmak üzere iki tabakadan oluşur. Dış tabaka, kan damarları ve lenfatikleri içerir. Gevşek bağ dokusunda olan iç tabaka ise, yeni kemik oluşumunu sağlayan hücreleri içerir. Periosteumdan daha ince olan endosteum tek tabaka osteojenik hücre içerir. Bu tabakanın aynı zamanda hematopoetik hücreleri üretebilme özelliği vardır. Kemik içinde, farklı hücresel bileşenler tanımlanabilir. Bunlar, osteojenik öncü hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve kemik iliğinin hemapoetik hücreleridir. (31).

### **3.1.1.4.3. Kemik Hücresel Bileşenleri**

#### **3.1.1.4.3.1. Osteoprogenitör (Osteojenik) Hücreler**

Osteoprogenitör hücreler, mezenkim dokudan köken alan, olgun hücrelere farklılaşmadan kök hücre şeklinde kalabilen topluluklardır. Yaşamları boyunca çoğalabilme özelliğine sahiptirler. Periosteum ve endosteumun içinde bulunmaktadır. Bu hücreler, kemik dokusunda herhangi bir travma veya hastalık durumu görüldüğünde, kemik morfojenik proteini (BMP) aracılığıyla osteoblastlara dönüşürler, bu nedenle kemiğin tamir mekanizmasında önemli rol oynamaktadırlar (32).

#### **3.1.1.4.3.2. Osteoblastlar**

Osteoblastlar, mezenkimal kökenlidir ve kemik yapımından sorumlu olup kemikteki en aktif hücrelerdir (32). Osteoblastlar, %90 tip I kollajen ve mineralizasyonda aktif olan glikoproteinler, proteoglikanlar, osteoprotegrin (OPG), osteonektin, osteokalsin, osteopontin gibi proteinleri içerisinde bulundururlar. Tamir mekanizmasında önemli rolleri olan BMP, dönüştürücü büyüme faktörü- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2), interlökin-1 (IL-1) gibi sinyal moleküllerini salgılamaktadırlar (33).

#### **3.1.1.4.3.3. Osteositler**

Mineralize kemik matriksi içine gömülmüş, yıldız şeklinde olan osteositler, kemikte laküna olarak bilinen boşluklarda yer almaktadırlar (33). Osteositler, diğer

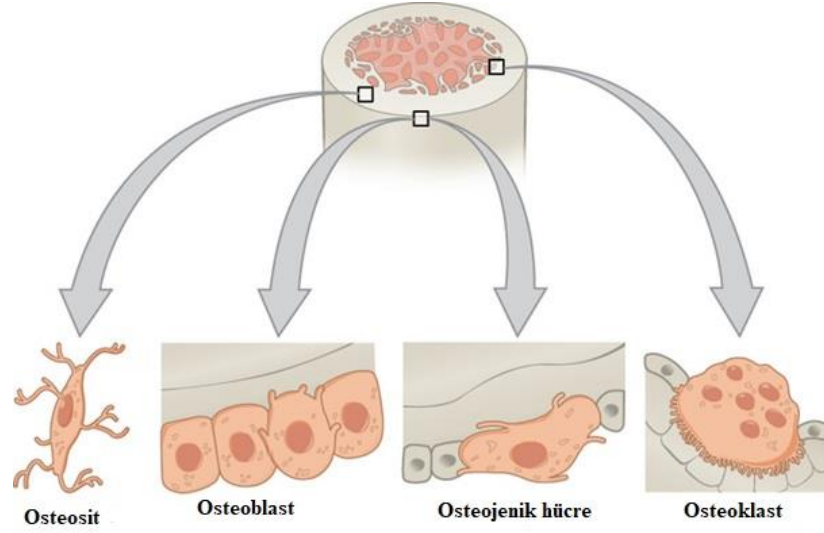
osteositlerle, osteoblastlarla veya kemik yüzeyinde bulunan kemik örtü hücreleriyle gap junction aracılığıyla bağlantı kurmaktadır (34).

#### **3.1.1.4.3.4. Kemik Örtü Hücreleri**

Bölünme özelliğini yitiren osteoblastların sitoplazmalarını kaybederek farklılaşmaları ile meydana gelmektedirler. Kemik örtü hücreleri, olgun kemik yüzeyinde bulunmaktadır. Hücreler arası sinyal mekanizmasında görev almaktadırlar (35).

#### **3.1.1.4.3.5. Osteoklastlar**

Granülositik makrofaj hücrelerinden köken alan, monosit hücrelerinin birleşmesiyle oluşan çok çekirdekli ve hareketli hücrelerdir. Kemik yüzeyinde oluşturdukları howsip lakünaları adı verilen yüzeylerde bulunmaktadır. Osteoklastlar, kemiğin fizyolojik şekillenmesinde, yeniden yapılanmasında, kemik iyileşmesinde görev alırlar ve kemik rezorpsiyonundan sorumludurlar. Farklılaşma süreci, başlangıçta transkripsiyon faktörü PU-1 oluşumu ile çalışır. Makrofaj koloni uyarıcı faktör (M-CSF), osteoklastlara, metabolik farklılaşma sırasında bağlanır ve nüklear faktör kappa B ligandı (RANKL) oluşumunu artırır. Bu aşamada, RANKL oluşturan hücreler öncül osteoklastlarla etkileşime girer ve onları farklılaşmaya yönlendirir (30).



**Şekil 2.** Kemik dokusu hücreleri (36)

#### **3.1.1.4.4. Kemik İliği**

Kemik iliği, trabeküler kemikte bulunan ana hematopoetik organdır, birincil lenfoid doku ve kök hücre kaynağıdır. Kemik iliğini oluşturan hücreler; mezenkimal kök hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar, adipositler, osteoblastlar, osteoklastlar ve endotel hücreleridir (30).

#### **3.1.1.4.5. Kemik Dokusunun Oluşumu**

Kemik, intramembranöz veya endokondral olmak üzere iki yolla oluşmaktadır. Görülen iki kemikleşme türünde, öncelikle örgü kemik oluşur ve daha sonra örgü kemik yerini olgun kemiğe bırakır (37).

##### **3.1.1.4.5.1. İntramembranöz Kemikleşme**

Bu kemikleşme tipi, kök hücrelerin, osteoblastlara farklılaşması ve bu oluşan osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan kemikleşmesiyle gerçekleşmektedir. Kafatasının yassı kemiklerinde (frontal, pariyetal, oksipital, temporal), maksilla, ve

madibulanın bazı bölgeleri ile klavikulanın bir kısmında bu tip kemikleşme gözlenmektedir (38).

#### **3.1.1.4.5.2. Endokondral Kemikleşme**

Bu kemikleşme türünde, kök hücreler ilk olarak kondrositlere farklılaşmaktadırlar (37). Kondrositler çoğalarak, kemiğin son şeklini ve pozisyonunu belirlemek için kıkırdak matriksini salgılamaktadırlar. Oluşan kıkırdak yapı, kemik kök hücrelerinden farklılaşan osteoblastlar aracılığıyla sonradan kemikleşmektedir. Uzun kemiklerin formasyonunda, epifizyel büyüme plaklarının oluşumunda ve doğal kemiklerin iyileşmesinde bu kemikleşme türü görülmektedir (29).

#### **3.1.1.4.6. Kemik Dokusunun Sınıflandırılması**

##### **3.1.1.4.6.1.Örgü (Birincil) Kemik**

Örgü kemik, yetişkinlerde kafadaki yassı kemikler, alveolar kemik ve tendonların kemiğe yapıştığı yerler gibi birkaç yer dışında yerini ikincil kemiğe bırakmaktadır. Örgü kemik dokusu, olgun kemik dokusuna göre, dağınık dizilmiş kollajen liflerini bulundurmasının yanı sıra daha az mineral ve daha fazla osteosit içermektedir. Örgü kemik, embriyonik iskeleti oluşturduktan sonra farklılaşarak olgun kemik ile yer değiştirmektedir (29).

##### **3.1.1.4.6.2.Olgun (İkincil) Kemik**

Olgun kemik dokusu, yetişkinlerde kortikal ve spongiyoz kemikte bulunmaktadır (39). Bu dokuda bulunan kollajen lifler, birbirine paraleldir ve matriks



içinde farklı tabakalar oluşturmaktadır. Kortikal kemiğe radyografide homojen görünüm veren bu kollajen liflerin dağılımıdır (30).

#### **3.1.1.4.6.3. Kortikal ve Kansellöz Kemik**

Kortikal (lameller) ve spongiyoz (süngerimsi) kemik olarak sınıflandırılan kemikler birincil ve ikincil kemik dokusunu içermektedirler. Bu iki tip kemik, yapı ve matriks bileşeni olarak benzerdir, ancak kortikal kemik spongiyoz kemiğe göre daha büyük kütle/hacim oranına sahiptir. Kortikal kemik, uzun kemiklerin diyafizini, ilik boşluğunu, spongiyoz kemik plaklarının etrafını ve tüm kemiklerin dış kısmını çevrelemektedir. Olgun iskeletin %80'ini oluşturmaktadır. Kortikal kemik, kemiğin uzun aksına paralel seyreden, osteon adı verilen, merkezinde damar ve sinir paketi bulunan silindirik ünitelerden oluşmaktadır (29).

#### **3.1.2. Peridontal Dokularda Hastalık ve Tedavi**

Periodontal dokuların yıkımı, periodontal hastalığın önemli bir işaretidir. Enfeksiyonlar, travma, ortodontik diş hareketi, sistemik ve genetik hastalıklar gibi birçok faktör bu yıkıma neden olabilmektedir. Periodontal hastalıkta, dişlerin yüzeyindeki bakteriler, dişetinde kronik iltihap oluşturmaktadır. Oluşan iltihap sonucunda, kök yüzeyindeki hücreler ve kökü kaplayan sement yok olmaktadır (40).

Periodontolojideki bilimsel ilerlemeler, klinisyenlerin periodontal hastalıkları saptama ve tedavi etme şeklini değiştirmiştir. Bununla birlikte, günümüzde periodontitis tedavisinde, öngörülebilir ve uygun periodontal doku rejenerasyonu elde etmek için ideal bir terapötik yaklaşım yoktur (41). Kronik periodontal hastalığın tedavisi, farklı terapötik adımların kombinasyonunu içermektedir (42).

Cerrahi ve cerrahi olmayan periodontal tedaviler, periodontal tedavi kavramlarının temeli olmuştur (43). Cerrahi ve cerrahi olmayan yaklaşımlar, periodontal doku onarımına odaklanmaktadır, diş yüzeyi temizliği, kök yüzeyi düzleştirilmesini, flep ve rezektif cerrahi yöntemlerini içermektedirler (43).

1970 ve 1980'lerde yapılan çalışmalarda, cerrahi olmayan periodontal tedavinin, derin ceplerin eliminasyonunda ve klinik ataçman seviyelerinin iyileştirilmesinde etkili olduğu gösterilmiştir (44). İnflamasyon belirtilerinin devam ettiği durumlarda, cerrahi tedavinin endike olabileceği kabul edilmiştir (43). Cerrahi periodontal tedavinin amacı, periodontal inflamasyon nedeniyle kaybedilen sement, PDL ve alveolar kemik gibi dişin destekleyici yapılarının her birini yeniden inşa etmektir (42). Hem dişeti çekilmesi hem de periodontitis vakalarında, hasar gören periodontal dokuların rejenere edilmesi için farklı tedavi yöntemleri önerilmiştir. Bariyer membranlar, kemik grefti ile birlikte veya greft olmadan kullanılarak periodonsiyumun işlevini geri kazanmada büyük etki göstermişlerdir (45).

### **3.1.3. Yara İyileşmesi ve Rejenaratif Periodontal Tedavi**

Yara iyileşmesi, herhangi bir travma sonrasında doku bütünlüğünün yerine konması için vücudun temel mekanizmasıdır. Eğer yara iyileşmesi doğru şekilde gerçekleşmez ise, fizyolojik, immünolojik ve metabolik anomalilere yol açabilmektedir. Temel olarak yara iyileşmesi, çeşitli hücre tiplerinin ve biyolojik mediyatörlerin görev aldığı bir süreçtir. Periodontal yara iyileşmesinde, hücre toplulukları göç eder, farklılaşır ve çoğalır. Epitel ve bağ dokusu birbirleri ile etkileşime girer. Sitokinler ile hücre dışı matriks molekülleri iç içe geçen safhalar halinde organize olurlar (30).

Epitel ve çevresindeki bağ dokusu, geleneksel periodontal tedaviden sonra fonksiyonel olmayan skar dokusuna dönüşür. Bu durum iyileşme sürecinin 'onarım' kısmı olarak kabul edilir. Geleneksel periodontal tedavinin bu etkileri, periodontal doku kaybını düzeltmek için rejeneratif prosedürler uygulanarak önlenabilir (46). Rejeneratif tedavi, diş destek yapılarının kaybolan kısımlarını restore etmek için geliştirilmiştir. Literatür, rejeneratif periodontal tedavilerin geleneksel periodontal tedavilere kıyasla daha olumlu sonuçlar verdiğini göstermiştir (47).

Dişeti epiteli ve bağ dokusunun iyileşmesi birkaç hafta içerisinde sonuçlanırken, PDL, sement ve alveolar kemiğin rejenerasyonu genellikle haftalar veya aylar içerisinde oluşmaktadır. Yara yerine ilk ulaşan epitel hücresi olursa iyileşme uzun bağlantı epiteli şeklinde olur, dişeti bağ dokusundan kaynaklanan mezenkimal hücreler olursa, kemik kök hücrelerine dönüşümünü takiben alveolar kemik oluşur (30).

Rejeneratif tedavinin başarısı birçok faktöre bağlıdır. Rejeneratif cerrahi tedavinin temel amacı yarada tam kapanmasının sağlanmasıdır (48). Bu durum cerrahi sonrası ilk haftalarda yara stabilitesinin korunmasına bağlıdır (49). İyileşme sırasında greftin ve membranın açığa çıkması sonrasında oluşan bakteriyel kontaminasyon, periodontal rejeneratif işlemlerin başlıca komplikasyonudur (50). YDR'nin, klinik sınırlamalarına rağmen, rejeneratif periodontal tedavi alanında önemli bir gelişme olduğu düşünülmektedir. Geleneksel flep cerrahisinde YDR kullanmanın yararları literatürde yer almaktadır (22).

#### **3.1.4. Yönlendirilmiş Doku Rejenarasyonu (YDR)**

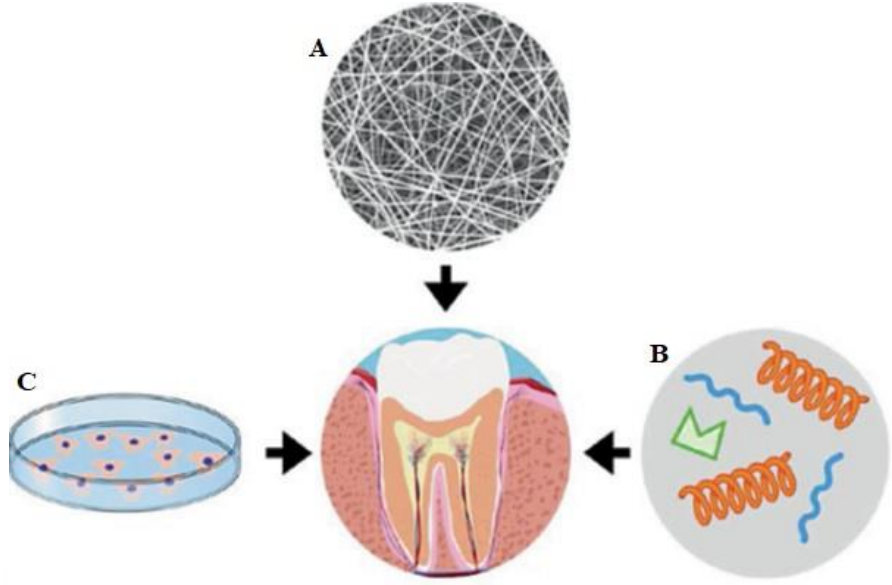
YDR, kemik defektlerinde, PDL ve perivasküler hücrelerin oluşumunu seçici olarak artırmak için mekanik bir bariyer kullanır (16). Bu tedavinin amacı, epitelin

defekt içine göçünün önlenmesi ve kemik gibi diğer dokuların iyileşmesi için zaman tanınmasıdır (51). Bu rejeneratif potansiyel, kök hücrelerinden salgılanan büyüme ve farklılaşma faktörleri ile birlikte yeni sement, bağ dokusu ve kemik oluşumunu içerir (52).

YDR tedavisinde, kemik grefti, mine matriks türevi veya bunların kombinasyonu gibi çeşitli biyomateryaller ve büyüme faktörleri, dişin destek dokularını yenilemek için kullanılmıştır (53). Mevcut greftleme prosedürleri ile ilgili yapılan klinik çalışmalar, periodontal dokuların tam ve öngörülebilir rekonstrüksiyonunu elde etmenin zor olduğunu göstermiştir. Bunun nedeni, bir kez hasar gören periodonsiyumun rejenerasyon için sınırlı bir kapasiteye sahip olmasıdır (20). Periodontal rejenerasyon tedavilerinde en olumlu sonuç, kemikiçi defektlerde kemik grefti ve YDR'nin kullanımı ile elde edilmiştir (54).

YDR'de başarı için gerekli üç temel yapı vardır:

- ✓ Doku rejenerasyonu için bir çerçeve,
- ✓ Kök hücre farklılaşması ve hücre göçünü teşvik etmek için hücre sinyali,
- ✓ Rejeneratif/ kök hücreler (55).



**Şekil 3.** YDR'nin temel elemanları. A: Bariyer membran yapısı, B: Hücre sinyali molekülleri (büyüme faktörleri, mine matriks türevi protein, PRP yapıları), C: Kök hücreler (12)

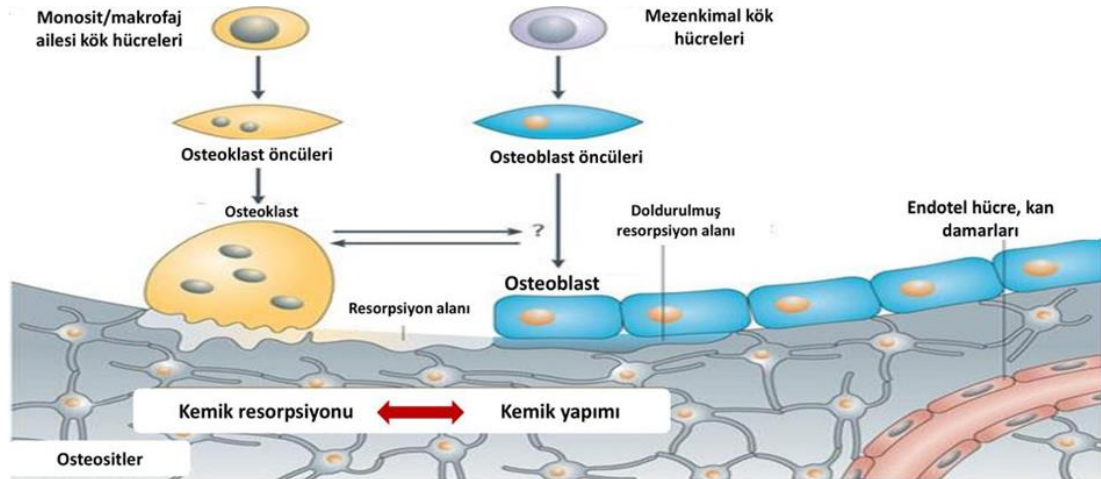
Bariyer membran kullanımı, rejenerasyonda yara bölgesine ilk olarak epitel göçünün engellenmesi esasına dayanır. Genel olarak, sement birikimi ve PDL oluşumunun, epitelin iyileşmesinden daha yavaş olması, rejenerasyonu sınırlar. Bunun sonucunda iyileşme onarım veya uzun bir bağlantı epiteli ile sonuçlanır. Epitel göçünün engellenmesi ile yara iyileşmesi PDL tarafından sağlanır (13). PDL'nin en yüksek mitotik aktivitesi yaklaşık 3 haftada ortaya çıkar (56).

YDR'nin başarısı periodontal defekt morfolojisine, kalan periodonsiyuma ve hekimin yeteneğine bağlıdır (13). Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonu, ağız boşluğunun polimikrobiyal ortamı ile ilişkili yüksek bir enfeksiyon riski taşıması ve bunu çevreleyen yumuşak dokunun hacminin yetersiz olması gibi birçok zorlukla ilişkilidir (57). Periodontal rejenerasyonda vaskülarizasyonu sağlamak önemlidir. Yapılan rejeneratif çalışmalarda, yüksek anjiyojenik ve osteojenik aktivite ve kemik matriks mineralizasyonu elde edildiği gözlenmiştir (58, 59). Periodontal

rejenerasyonun başarısı ve değerlendirilmesi, sondlama ölçümleri, radyografik analizler, yeni kemiğin direkt ölçümleri ve histoloji ile belirlenmelidir (30).

### 3.1.5. Kemik İyileşme Mekanizması ve Rejenerasyonu

Kemiğin hücresel aktiviteleri, kemik oluşturan osteoblast ve kemiği rezorbe eden osteoklast arasındaki etkileşimle ilgilidir. Osteoblast-osteoklast etkileşimi, yetişkin iskeletin büyümesi, iyileşmesi ve yeniden şekillenmesinde rol oynadığından, kemik homeostazı için temeldir (60). Kemik dokusunun iyileşmesi hem rejenerasyon hem de tamir olaylarını içermektedir. Kemik hasar gördüğünde, tamiri kolaylaştırmak için kompleks ve çok aşamalı bir iyileşme süreci başlar. Doku ve hücre çoğalmasına, büyüme faktörleri, sitokinler ve sinyal molekülleri aracılık eder (30). Yaralanan kemiğin iyileşmesinde histolojik olarak üç aşama gözlenmiştir: inflamatuvar; proliferatif ve şekillenme/yeniden şekillenme.



**Şekil 4.** Kemik dokusu oluşum ve rezorpsiyon mekanizması (61)

**İnflamatuvar fazda;** kan pıhtısı oluşumu ve inflamatuvar hücre göçü gözlenir. Doku hasarından hemen sonra başlar ve yaklaşık iki hafta sürer. Kanama meydana gelir ve pıhtı oluşur. Yaralı hücrelerin sitokin salınımı ardından, makrofajların hasar

gören doku ve hücrelerin fagositozuna başladığı bölgede inflamatuvar hücreler toplanır. 2-3 gün içinde, bölgeyi temizlemek için çok sayıda inflamatuvar hücre göç eder. İnflamatuvar hücreler, vasküler hücreler ve olgunlaşmamış fibroblastlar granülasyon dokusunu oluşturur. Bölge temizlendikçe, granülasyon dokusu bağ dokusu matriksi ile yer değiştirir ve yara iyileşme sürecinin proliferatif fazı başlar (30).

**Proliferatif (tamir) fazı;** fibrozis ve kemik oluşumu, hızlı doku oluşumu ile karakterize edilir. Fibrozis geçici bir matriksin hızlı biriktirilmesini içerir. Geçici matrikste damar, kemik oluşturan hücreler bulunur ve örgü kemik oluşur. Örgü kemik, kemiğin ilk oluşan türüdür (30).

Yeni kemik matriksi ve kırıkta iskeletin oluşmaya başlaması, yumuşak bir kallus oluşumu ile karakterizedir. Osteoblastlar ve kondroblastlar, sert bir kallus oluşturmak için yavaşça mineralize olurlar. Sert kallus, olgunlaşmamış örgü kemikten oluşur. Kırıkta ve periosteal örgü kemik oluşumunun başlangıcı, interlökin 6 (IL-6), OPG, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve BMP'lerin erken düzenlenmesi yoluyla sağlanır. Yumuşak-sert kallus oluşumu süreci, kemik kırığı oluşumundan yaklaşık 6-12 hafta sonra gerçekleşir. Olgunlaşmamış kemik, birkaç hafta boyunca yara bölgesinde kalır. Olgunlaşmamış kemik, herhangi bir yük taşıma kapasitesi olmayan geçici bir kemik türüdür ve bu nedenle olgun kemik türleriyle (lamelli kemik ve kemik iliği) değiştirilmesi gerekir (62).

**Şekillenme/Yeniden Şekillenme;** kemiğin şekli ve mimarisindeki bir değişiklik şekillenme olarak tanımlanırken, kemiğin şekil ve yapısında bir değişiklik olmadan gelişen süreç yeniden şekillenme olarak tanımlanır. Olgunlaşmamış kemiğin, lamelli kemik veya kemik iliği ile değiştirilmesi kemiğin yeniden

şekillenmesidir. Kemik matriksi ve kıkırdak, olgun kemiğe dönüşür. Örgü kemik osteoblast-osteoklast bağlantısıyla normal kemik döngüsünde olgun lameller kemiğe dönüşür (62).

Yeterli D vitamini ve kalsiyum, uygun kemik onarımı için önemlidir ve seviyeleri tamir oranını kısmen belirleyebilmektedir. Yeniden şekillenme safhasının zamanı, bireysel kemik metabolizmasına bağlı olarak değişir. İnsanlarda, kemiğin yeniden şekillenmesi birkaç ay sürebilir (62). Postmenopozal osteoporoz, hiperparatiroidizm ve romatoid artrit dahil olmak üzere iskeleti etkileyen çeşitli patolojik durumlarda kemiğin yeniden şekillenme hızı değişir (63).

#### **3.1.5.1. OPG-RANKL Biyolojik Belirteçleri**

Osteoprotegrin (OPG) ve nüklear faktör- kappa B ligandı (RANKL), kemiğin yeniden şekillenmesinin hücrel yanıtları sırasında oluşan tümör nekroz faktör (TNF) ailesinin üyeleridir (64). OPG'nin RANKL'a oranı, doku yanıtının OPG baskınlığı ile kemik oluşumuna mı yoksa RANKL artışıyla kemik rezorpsiyonuna mı eğilimli olduğuna dair bilgi verir (65).

OPG, olgun osteoklastların işlevini ve hayatta kalmasını etkileyen, kemik rezorpsiyonunun fizyolojik düzenleyicisidir. OPG, salgılanan tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ile ilişkili bir protein olarak, osteoklast olgunlaşmasını azaltarak, lokal ve sistemik olarak hareket edebilen, kemik yoğunluğunun bir düzenleyicisi gibi işlev görmektedir. RANKL için tuzak reseptör olan OPG, RANK/RANKL'ın keşfinden önce tanımlanmıştır. Osteoblastlar ve osteositler tarafından salgılanır. RANKL'a bağlanarak ve RANKL'ın RANK'a bağlanmasını önleyerek osteoklastik kemik rezorpsiyonunu inhibe edebilir. Bu nedenle, RANKL/OPG oranı kemik rezorpsiyonu, kemik kütlesi ve iskeletsel bütünlük gibi bir dizi sistemik faktörü



düzenler. Hormonlar ve sitokinler tarafından uyarılan osteoklast oluşumunun inhibisyonu ile kemik mineral yoğunluğunda belirgin bir artışa neden olur (66).

RANK, TNF reseptör ailesinin bir üyesidir. RANKL'dan daha az dokuda olduğu görülmektedir. Osteoklastik öncü hücreler, olgun osteoklastlar ve dendritik hücrelere ilave olarak, meme bezlerinde (67), meme ve prostat kanserleri gibi bazı kanser hücrelerinde üretilir (68).

RANKL, TNFR ailesine aittir. Çözünür ve membrana bağlı formda bulunur. RANKL, osteoblastik kök hücreler, osteoblastlar, osteositler, kondrositler tarafından oluşturulur ve osteoklastik ajanların (vitamin D3, IL-1, PGE-2 gibi) varlığında artar (69). RANKL, osteoklastik aktiviteyi uyarır ve osteoklast apoptozunu inhibe eder (70).

#### **3.1.5.2. Kemik Defektleri ve Sınıflandırılması**

Kemik defektleri, kemiğin bir kısmının travma, periodontal hastalık, kronik enfeksiyon, malignite gibi nedenlerle hasar gördüğü ve kemik grefti gibi girişimsel tekniklerle onarılması gereken ciddi durumlardır. Özellikle, periodontal enfeksiyonların şiddetlenmesi ile kemik defektlerinin görülme sıklığı artar. Periodontitis, kemikiçi defektlerin oluşumu ile karakterize bir hastalıktır. Periodontal enfeksiyonlar sonucu görülen kemik defektlerinin ilerlemesi, dişlerin kaybına ve alveol kemik rezorpsiyonuna neden olabilir. Bu nedenle periodontal olarak, defektlerin morfolojisi, yaygınlığı ve defektin oluşmasına yardım eden faktörlerin tespiti önemlidir. Buna göre tedavi planlaması ve prognoz belirlenir (30).

Radyolojik olarak kemik defektleri şu şekilde sınıflanmaktadır (30);

**Horizantal defektler;** kemik kaybı mine-sement sınırına veya alveol kemiğine paralel seyreden defektlerdir.

**Açısal/Vertikal defektler;** kemik kaybı düzensiz ve obliktir.

**İnterdental krater defektleri;** bu tarz defektler genellikle iki diş arasındaki krette meydana gelmektedir. Bukkal ve lingual kemiğin korunduğu iki duvarlı defektlerdir.

**Kemik içi defektler;** kemik kaybının kök boyunca ilerleyerek kret tepesinden daha apikale uzandığı kemik kayıplarıdır.

✓ **Üç duvarlı defektler,** bukkal ve lingual duvarların her ikisi de korunmuştur.

✓ **İki duvarlı defektler,** bukkal ve lingual duvarların birisi yıkılmıştır.

✓ **Tek duvarlı defektler,** bukkal ve lingual duvarların her ikisi de yıkılmıştır.

**Furkasyon defektleri;** furkasyon bölgesinde meydana gelen defekt tipidir. Radyolojik olarak PDL boşluğunda genişleme gözlenebilir.

YDR; kemik içi defektleri, furkasyon tutulumları ve lokalize dişeti çekilmeleri gibi çeşitli periodontal defektlerin tedavisinde kullanılan bir yöntem haline gelmiştir (30). Başarılı rejeneratif tedavi ile tutarlı olan klinik sonuç parametreleri arasında, düşük klinik sondlama derinliği, artan klinik ataçman seviyesi ve kemik oluşumunun gözlemlendiği radyografi bulunur (71). YDR’de, ataçman kazanımı, azaltılmış cep derinliği, dişeti çekilmesinde azalma olması açısından, flep cerrahisi ile karşılaştırıldığında, iyileşmenin daha fazla olduğu kaydedilmiştir (72).

### **3.1.5.3. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu**

Yöntem olarak YDR temeline dayanan yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR), istenmeyen yumuşak dokuların kemik defekti içine büyümesinin mekanik olarak engellenmesini savunur. YKR tedavi protokolü, rejenerasyona ihtiyaç duyan

defekt bölgesini fiziksel olarak kapatmak için, kemik yüzeyine bakan hücre engelleyici bir membranın cerrahi olarak yerleştirilmesini içerir (73). Bariyer membran, boş bir alan yaratır ve bu alanı korur. Kemik kök hücrelerine, bu hücrelerin toplanması, proliferasyonu, osteoblastik kök hücre boyunca farklılaşması ve osteojenik aktivitenin oluşumu için izin veren bir ortam sağlar (74).

Osteogenezin belirli aşamaları boyunca kemik oluşumu ve olgunlaşması için yeterli kan temini zorunludur. Başarılı YKR sağlamak için Wang ve ark.'ları tarafından açıklanan "PASS" ilkeleri her zaman karşılanmalıdır: birincil yara kapatma (P), anjiyogenez (A), bölgenin temizliği (S) ve biyomateryalin stabilitesi (S). Yeni oluşan kan damarları ile kemik oluşumu arasında güçlü bir ilişki vardır. Kortikal kemik perforasyonu ve kemik dekortikasyonu YKR'nin temel işlemleridir. Bunlar, kemik iliği boşluğu ile iletişimi ve defekt bölgesine kan akımını sağlar. Böylelikle hem kanamayı teşvik ederek hem de kök hücrelerin ve kan damarlarının kemik defekti bölgesine daha kolay ulaşmasını sağlayarak iyileşmeyi artırır (75).

Mevcut kemik miktarına ve defektin tipine bağlı olarak tedavi stratejisi belirlenmelidir. YKR nin başarısı bu sınıflandırmaların prognozuna bağlıdır. YKR' de prognozu belirleyen en önemli faktör, bariyer membran altında krestal defektin rejenerasyonunun sağlanabileceği yeterli boşluğun bulunmasıdır. Defektin morfolojisine bağlı olarak bu boşluk partiküler ya da blok kemik greftleriyle doldurulur (30).

YDR temeline dayanan YKR;

- ✓ Maksillofasiyal defektlerde
- ✓ Osteogenezde
- ✓ Diş çekiminden sonra soket korumada

- ✓ İmplant yerleşiminden önce alveolar kret artırımlarında
- ✓ Diş çekiminden hemen sonra yapılan immediat implant uygulamalarında
- ✓ İmplant yerleşimi ile kombine yapılan alveolar kret artırımlarında
- ✓ Alveolar kemiğin vertikal olarak artırılmasında (15)
- ✓ Sinüs yükseltme uygulamalarında (76) kullanılmaktadır.

### **3.1.6. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonunda Kullanılan Biyomateryaller**

#### **3.1.6.1. Trombosit Konsantreleri Kullanımı**

##### **3.1.6.1.1. Trombositler**

Kemik iliğinde megakaryositlerden oluşan trombositler, çekirdeksiz yapılardır. Ömürleri 8 ile 10 gündür ve sitoplazmasında aktivasyon sırasında salgılanan birçok granül içerir. A-granüller yapılarında, trombosit özgü (örneğin,  $\beta$ -tromboglobulin) veya trombosit özgü olmayan (fibronektin, trombospondin, fibrinojen ve diğer pıhtılaşma faktörleri, büyüme destekleyicileri, fibrinoliz inhibitörleri, immünoglobülinler vb.) olmak üzere birçok protein bulundurulur. Yoğun granüller kalsiyum, serotonin gibi yapıları içerir. Ayrıca trombosit zarı kollajen, trombin gibi moleküller için reseptörler bulunduran, fosfolipid yapısındadır ve çift katmanlıdır (77).

Fibrinojen adı verilen plazma molekülünün aktive formu olan fibrin, çözünür bir moleküldür ve sadece plazmada değil, aynı zamanda trombosit  $\alpha$  granüllerinde de yoğun olarak bulunur. Hemostaz sırasında, trombosit agregasyonunda ve anjiyogenez oluşumunda önemli bir rol oynar (78). Ayrıca, fibrinojen, tüm pıhtılaşma reaksiyonlarının son ürünüdür. Bu protein trombin tarafından çözünmez ve polimerize edilmiş lifli jel, yaralanan bölgenin ilk skatrik matriksini oluşturur (79).

Trombosit konsantreleri, esas olarak trombositlerin fizyolojik konsantrasyonlarından ve büyüme faktörlerinden (GF'ler) oluşan, hastanın kanından elde edilen biyolojik ürünlerdir (80).

#### **3.1.6.1.2. Trombositten Zengin Fibrin (PRF)**

PRF, plazmadaki otolog trombosit konsantrasyonudur. İkinci nesil bir trombosit konsantresi olan PRF, Choukroun ve ark.'ları tarafından tanıtılmıştır. 2001 yılında, bunun PRP'ye göre birçok avantajı olduğu kanıtlanmıştır (81). Biyoaktif cerrahi materyali olarak trombosit konsantresinin geliştirilmesi, fibrin yapıştırıcılarının kullanımından kaynaklanmaktadır (82).

Fibrin yapıştırıcıların farklı alanlarda kullanımı, geçtiğimiz 30 yıldan beri belgelenmiştir. Uzun üretim protokolleri ve diğer dokularla arasında çapraz enfeksiyon oluşturma riski gibi durumlar nedeniyle kullanımı tartışmalıdır. Trombosit konsantreleri elde etmeye yönelik teknolojilerin geliştirilmesi, yeni tür fibrin yapıştırıcısı olan konsantre trombosit açısından zengin plazma oluşumuna yol açmıştır. Ancak kan işleme prosedürleri üzerindeki yasal kısıtlamalar nedeniyle, trombosit zengin fibrin (PRF) denilen başka bir trombosit konsantresi ailesi ortaya çıkmıştır. PRF, bir fibrin biyomateryali olarak düşünülmelidir. Bu yeni biyomateryal, fibrin yapıştırıcı ve klasik trombosit konsantresine benzeyen otolog skatrik bir matriks gibi değildir, tüplere herhangi bir madde eklemesi yapılmadan santrifüj edilen kandır (83).

##### **3.1.6.1.2.1. PRF Yapısı ve Etki Mekanizmaları**

Fibrin matriksi, epitel hücrelerinin ve fibroblastların metabolizmasını etkileyerek, yaralanan dokuların iyileşmesine rehberlik eder. Hücreler, fibrinojen,

fibronektin, tenasin ve vitronektin gibi proteinler tarafından yapılan geçici matriks üzerinde göç eder. Bu göç, basit bir dönüşümden çok gerçek bir matriks bozulması şeklindedir (78).

PRF, iyileşme ve bağışıklık için uygun olan bir kan örneğinin tüm bileşenlerini içeren ve tek bir fibrin zar üzerinde toplayan trombosit konsantresidir (84). PRF, trombositler, lökositler, sitokinler ve dolaşımdaki kök hücrelerin bir araya gelmesiyle, tetra moleküler yapıda, polimerize edilmiş bir fibrin matriksinden oluşur (85). PRF, hedef doku oluşumunda kritik hücrelerin göçüne, farklılaşmasına ve çoğalmasına izin vererek rejeneratif yapıya benzer şekilde davranabilir (86).



**Resim 1.** PRF oluşturulması (87)

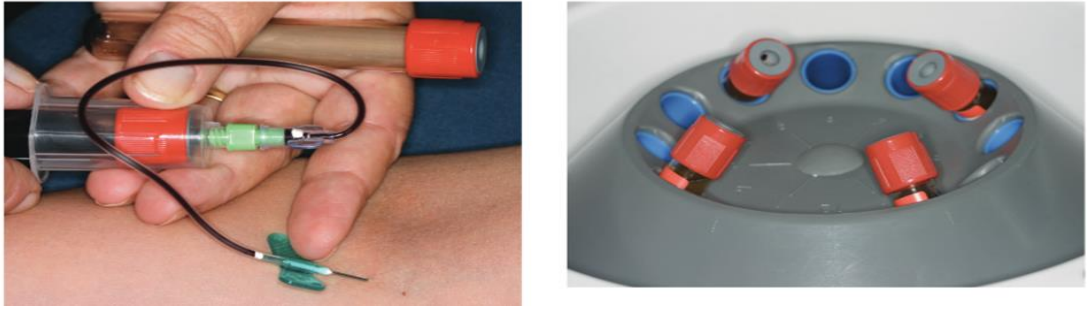
Anjiyogenez, yaranın içinde yeni kan damarlarının oluşumu ile gerçekleşir. Fibrin matriksinin doğrudan anjiyogeneze yol açtığı açıkça gösterilmiştir. Bu matriksin anjiyogenez özelliği, fibrin jelin üç boyutlu yapısı ve fibrin ağlarında varolan sitokinlerin etkisi ile açıklanmaktadır. Ayrıca, fibrin jelde FGFb, VEGF, anjiyopontin ve PDGF gibi anjiyogeneze ana rolü olan çözünür faktörler yer almaktadır (88).

PRF'in düşük trombin konsantrasyonuna sahip moleküler yapısı, endotel hücrelerinin göçü için ideal bir matriks olmasını sağlar. Bağ dokusunun direncini artırarak, hızlı bir anjiyogeneze ve fibrinin daha kolay şekillenmesine izin verir. Bu

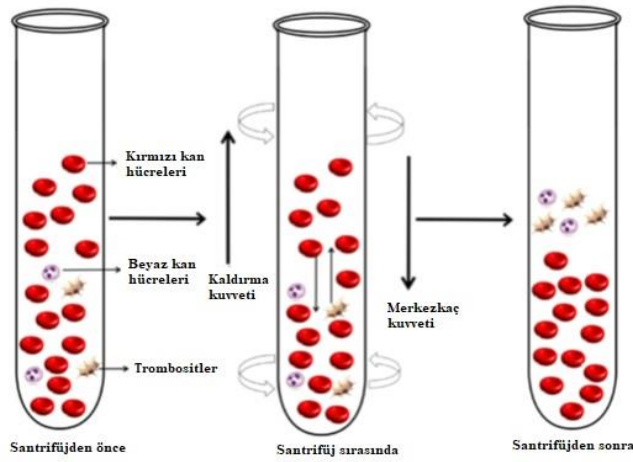
nedenle, PRF membranları her tür yüzeysel deri ve mukoza iyileşmesi için kullanılabilir. PRF, proteazlar tarafından bir ile iki hafta içerisinde rezorbe olur (78).

#### 3.1.6.1.2.2. PRF Elde Edilmesi ve İşlem Protokolü

PRF, kan toplama sırasında antikoagülan, trombosit aktivasyonu, fibrin polimerizasyonu için sığır trombin ve kalsiyum klorür kullanılmadan tamamen doğal bir şekilde üretilir. Antikoagülanın yokluğu, tüp duvarları ile temas halindeki kan örneğinde birkaç dakika içinde aktivasyon oluşturmaları ve pıhtılaşma kaskadlarının salınması anlamına gelir. Protokol çok basit ve düşük maliyetlidir (89).



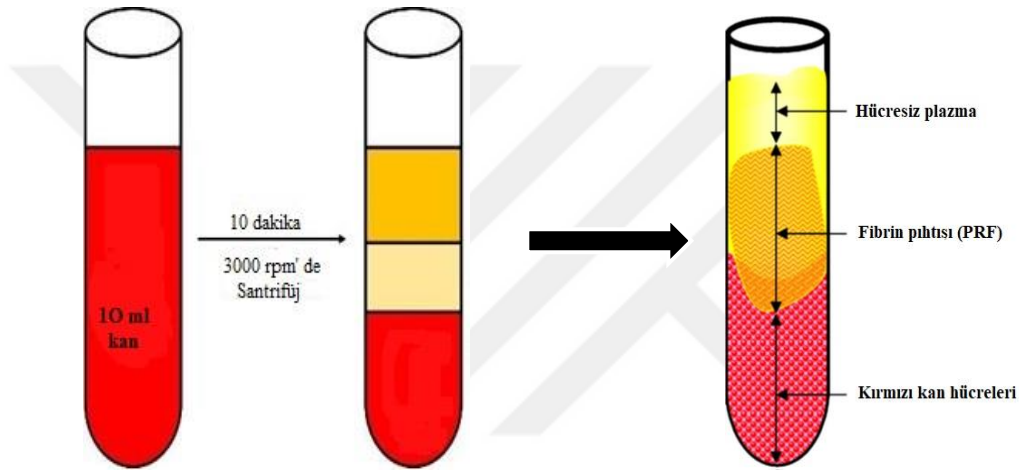
**Resim 2.** Hastadan kan alımı ve alınan kanın santrifüj cihazına yerleştirilmesi (87)



**Şekil 5.** Alınan kanın santrifüj edilmesi (90)

Antikoagülan içermeyen, 10 ml kapasiteli iki steril vakumlu tüpün her birinde yaklaşık 5 ml venöz kan toplanır. Vakumlu tüpler daha sonra 10 dakika boyunca dakikada 3000 devirde (rpm) santrifüj yapılan bir makineye yerleştirilir ve ardından aşağıdaki katmanlar tüpte oluşur:

- ✓ Kırmızı kan hücrelerini içeren kırmızı alt kısım,
- ✓ Fibrin pıhtısı içeren orta kısım ve
- ✓ Üst saman renkli hücresiz plazma



**Şekil 6.** Santrifüj edildikten sonra tüpte oluşan tabakalar ve PRF tabakası (83)

Üstteki renksiz katman çıkarılır ve PRF tabakası olan orta kısım, alt bölme çizgisinin 2 mm altında toplanır. Burada izlenen mekanizma, başlangıçta tüpün üst kısmında yoğunlaşan fibrinojenin, fibrin oluşturmak için santrifüj edilmesiyle dolaşımdaki trombin ile birleşmesidir. Daha sonra tüpün ortasında, alttaki kırmızı kan hücreleri ile üstteki hücresiz plazma arasında bir fibrin pıhtısı elde edilir. Trombositler, fibrin ağlarında büyük ölçüde bulunur (91).

Bu tekniğin başarısı, kan alma ve santrifüj edilmesine hazır olma hızına bağlıdır. Antikoagülan olmadan, kan numunesi tüp camı ile temas eder etmez hemen pıhtılaşmaya başlamaktadır. Fibrinojeni tüpün orta ve üst kısmında yoğunlaştırmak için minimum birkaç dakika santrifüj edilmesi gerekir (92).



#### **3.1.6.1.2.3. Saf Trombositten Zengin Fibrin (P- PRF)**

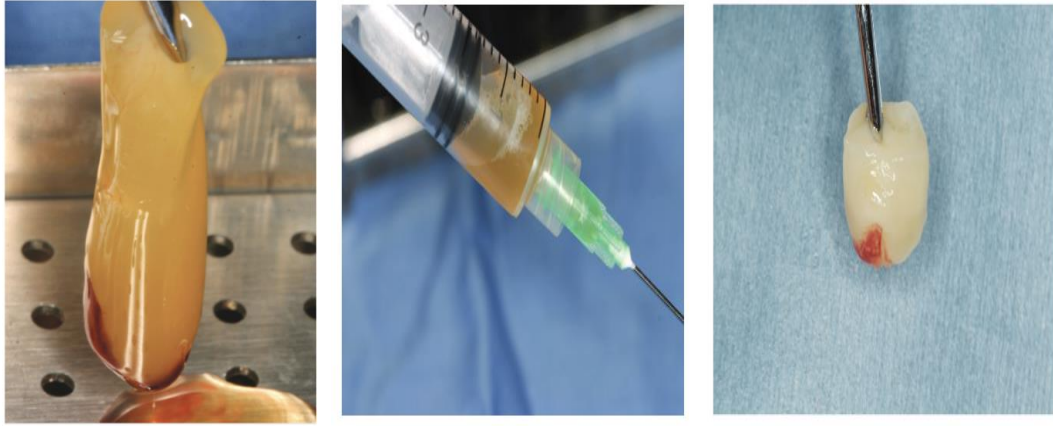
P-PRF, yüksek yoğunlukta fibrin matriks içermektedir. Bu nedenle, doku içerisine enjekte edilemezler ve sadece jel formunda bulunurlar. Santrifüj işleminden sonra alınan kısma lökosit tabakası dâhil edilmez. Yalnız manuel protokolleri mevcuttur. Diğer PRF grubu olan L-PRF'e göre daha karmaşık ve daha maliyetlidir (93).

#### **3.1.6.1.2.4. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (L-PRF)**

L-PRF'ler yüksek yoğunluklu fibrin matrikse sahiptir. P-PRF den farklı olarak lökosit barındırmaktadırlar. P-PRF'ler gibi yalnızca jel formları bulunduğu için doku içerisine enjekte edilemezler (93).

Fujioka-Kobayashi ve ark.'ları yapmış oldukları çalışmalarla, A-PRF'i modifiye ederek (1300 rpm, 8 dakika santrifüj edilmesi ile) A-PRF+'yı sunmuşlardır. Düşük santrifüj hızı sayesinde lökositlerin ve trombositlerin fibrin matriksten uzaklaşmasını önlemek amacıyla oluşturulmuşlardır (94). L-PRF, steril cam bazlı plastik tüplerde, 10 dakika 3000 rpm hızda üretilir (95). A-PRF oluşumu için steril düz cam bazlı vakum tüpleri (A-PRF tüpleri), daha yavaş hızda (1500 rpm) ve daha uzun sürede (14 dakika) kullanılır. Araştırmacılar, böyle bir protokolün gelişmiş B ve T lenfosit hücrelerinin, trombositlerin ve nötrofillerin daha eşit dağılımına yol açtığını öne sürmüşlerdir. Trombositler ve lökositler gibi canlı hücre sayılarının A-PRF'de çok daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Klinik olarak artan miktarda büyüme faktörü ve sitokin salınımının anlamı, PRF çeşitlerinin iyileşme üzerindeki etkinliğinin artmasıdır (96).

Son zamanlarda, enjekte edilebilir PRF çeşidi geliştirilmiştir. I-PRF olarak adlandırılan PRF'i üretmek için kan, plastik tüplere antikoagülan olmadan alınır ve yaklaşık 700 rpm'de 3 dakikada santrifüj edilir (96). I-PRF'nin, diz artroplastisi, yüz germe ameliyatlari, kalp ameliyatlari sonrası sternal enfeksiyon insidansının azaltılması, spor yaralanmaları, tendon/bağ yaralanmaları, osteoartrit, menisküs iyileşmesi, alopesi, kas-iskelet rejeneratif prosedürler, akne gibi çeşitli uygulama alanları vardır (97).



**Resim 3.** PRF çeşitleri (L-PRF, I- PRF ve A- PRF) (87)

PRF içerikli ürünlerin daha yeni bir uygulaması PRF Lizat'dır. PRF hazırlanmasından sonra, %5 CO<sub>2</sub> ve %95 hava içeren nemlendirilmiş bir atmosferde 37 °C'de bekletilir ve bu şekilde toplanan yapı, PRF lizatı olarak adlandırılır. PDGF, TGF, VEGF ve EGF dahil olmak üzere çeşitli büyüme faktörlerini içermesi açısından iyi bir kaynak olduğu belirtilmiştir (98).

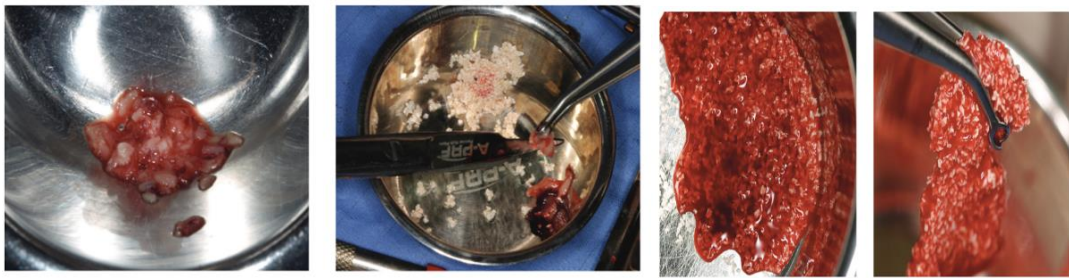
Yoğun bir fibrin matriks ve konsantre trombosit elde etmek amacıyla 2006 yılında, Sacco tarafından santrifüj edilme hızı artırılarak (2400-2700rpm) üretilen madde “Konsantre büyüme faktörü (CGF)” olarak tanımlanmıştır (99). Araştırılan bir diğer yol, PRF hazırlığı sırasında, kan işlemede farklı materyallerin kullanılmasıdır. Tunali ve ark.'ları, PRF üretmek için tıbbi sınıf titanyum tüpler

kullanarak, bu tüplerden elde edilen PRF' lere T-PRF adını vermişlerdir. Yaptıkları çalışmada T-PRF, tıbbi sınıf titanyum tüplerde 20 ml kanın 2800 rpm'de 12 dakika süre santrifüj edilmesiyle elde edilmiştir (100).

#### 3.1.6.1.2.5. PRF Kullanım Yerleri

Choukroun'un PRF'si, lökosit ve trombosit açısından zengin bir biyomateryaldir (83). Membran olarak kullanılan PRF, cerrahi bölgenin operasyon sonrası korunmasına izin verirken aynı zamanda biyomateryalin uyumunu ve yeniden şekillenmesini hızlandırır (78). Klinik uygulamalar, bu biyomateryalin, herhangi bir inflamatuvar cevap olmadan, sağlıklı bir iyileşmenin olması için uygun bir matriks olacağını ortaya koymaktadır (101).

Trombosit jeli şeklindeki PRF, yara iyileşmesini, kemik büyümesini ve olgunlaşmasını artırmak, yara geçirgenliğini azaltmak, hemostazı sağlamak ve greft materyallerine daha iyi kullanım özellikleri kazandırmaktadır. Birçok klinik çalışma, kemik yoğunluğunu artırmak için kemik grefti ve PRF'in beraber kullanımını önermektedir (101).



**Resim 4.** PRF'in kemik grefti ile karıştırılarak kemik artırımı için kombine kullanımı  
(87)



**Resim 5.** Gömülü üçüncü mandibular molar dişin enükleasyonu ve PRF kullanımı (95)

Trombosit konsantrasyonları, tek başına veya greft materyalleri ile sinüs yükseltme, implant cerrahisi, alveolar kret artırımı, çekim soketi koruma, periodontal cerrahi, endodontik cerrahi, çene kistleri, alveolar yarıklar, çene osteonekrozu, oroantral fistül, temporomandibular bozukluklar, yumuşak ve sert doku rejenerasyonunu artırmak için yardımcı bir tedavi yöntemi olarak kullanılmıştır (95).



**Resim 6.** Alveolar kret kemiği artırımında PRF kullanımı (95)

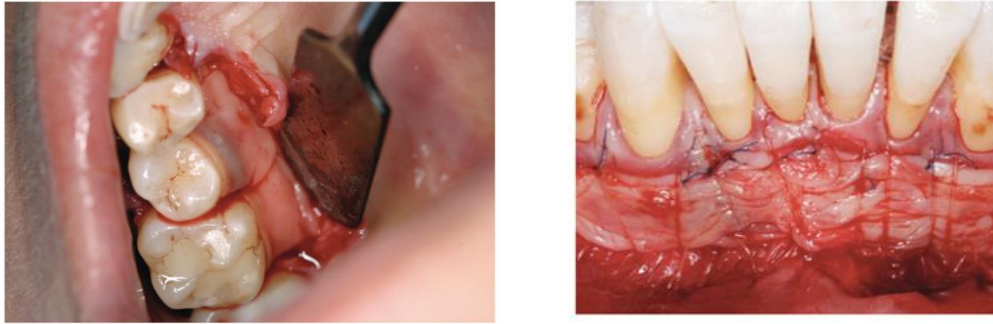


**Resim 7.** Diş çekiminden sonra görülen alveolitisin tedavisinde PRF kullanımı (95)



**Resim 8.** Alveolar soket korunmasında PRF kullanımı (95)

Bağ dokusu grefti prosedürleri sırasında karşılaşılan yaygın sorunlar, verici bölgenin kanaması, ağrı ve rahatsızlıktır (102). Epitel hücre göçü ve mikrovaskülarizasyon, PRF tarafından desteklenir. Bu özelliği, onu bağ dokusu greft verici bölgelerin iyileşmesi için etkili kılar. PRF, operasyon sonrası morbiditeyi azaltır ve yara iyileşmesini önemli ölçüde hızlandırır (103). Öncü ve ark.'ları yaptıkları çalışmada, implant yerleştirme sırasında PRF kullanıldığında, ameliyat sonrası, implant stabilite oranının ilk haftalarda PRF olmayan gruba göre daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (57, 103).



**Resim 9.** Graft verici bölgesinde yara iyileşmesinde ve yumuşak doku cerrahisinde PRF kullanımı (87)



#### **3.1.6.1.2.6. PRF Kullanımında Avantajlar**

PRF'nin avantajları (104):

- ✓ Hazırlanması basit ve verimli bir tekniktir.
- ✓ Otolog kan örneği ile elde edilir.
- ✓ İmmünolojik reaksiyona maruz kalma riski olmaz.
- ✓ Aktivitelerini uzun süre korur ve doku rejenerasyonunu etkin bir şekilde uyarabilen büyüme faktörleri içerir.
- ✓ Tek başına veya kemik greftleri ile birlikte kullanılabilir.
- ✓ Greftlenen kemiğin iyileşme hızını artırır.
- ✓ Kemik greftleri ile birlikte kullanıldığında, rekombinant büyüme faktörleri ile karşılaştırıldığında ekonomik ve hızlı bir seçenektir.

#### **3.1.6.1.2.7. PRF Kullanımında Dezavantajlar**

PRF'nin dezavantajları (104):

- ✓ Otolog kan olduğu için sınırlıdır.
- ✓ PRF protokolünün başarısı, kan alma süresi ve santrifüj için aktarımı ile ilgili işleme doğrudan bağlıdır.
- ✓ Pıhtı polimerizasyonu elde etmek için cam kaplı bir tüp kullanma ihtiyacı vardır.
- ✓ Kan alımı için gerekli olan işlem nedeniyle tedavinin hasta tarafından kabul edilmemesidir.

### **3.1.6.2. Mine Matriks Türevi Protein (Emdogain) Kullanımı**

#### **3.1.6.2.1. Mine Matriks Türevi Proteinin Gelişimi ve Rejenerasyon**

Diş gelişimi sırasında rolü olan özel bileşenlerin rejeneratif periodontal tedavide kullanımı yaygınlaşmaktadır. Bu bileşenlerden biri mine matriks türevi proteinlerdir. Mine matriks türevi proteinlerin, kemik dokusunu, PDL'yi oluşturmak için sinyal iletimini sağladığı ve sement oluşumunda öncülük ettiği gösterilmiştir (105).

Diş gelişim evresinde mine organının farklılaşmasından hemen sonra dentin ve mine oluşumu başlar. Mine organı büyümesi bu farklılaşmadan sonra devam ederek ilk evrede oluşacak kuronun minesine matriks oluşturur, sonra kök oluşumuna doğru servikal bölgede yeniden büyüme aktivitesi kazanarak bir epitel kılıf yapar. Mine organının bu parçası hertwig epitel kılıfı adını alır. Kök boyunca oluşan bu yapı, varlığını kök oluşumu sona erene kadar sürdürür (106).

Embriyolojik dönemde gelişen olayların düzenlenmesinde rolü olduğu bilinen moleküller arasında, mine matriks türevi proteinlerinin; mine ve mine benzeri yapıların gelişiminde üstlendikleri fonksiyonların yanında, kök bölgesindeki mezenkimal hücrelerin uyarılmasında, dentin, sement oluşumunda ve periodonsiyumun gelişiminde rol aldıkları bilinmektedir. Mine matriks türevi proteinlerinin uygulanması, dokuları meydana getiren, karmaşık yapıya ve işleve sahip olan hücre dışı matriksin oluşturulmasıyla, embriyolojik dönemdeki olayların klinikte taklit edilmesi esasına dayanır (106).

### **3.1.6.2.2. Mine Matriks Türevi Proteinin Yapısı**

Bu moleküllerin klinik olarak en yaygın test edileni, diş oluşumunda ilk yer alan, epitelyal mezenkimal etkileşimleri düzenlediği bilinen mine matriks türevidir (EMD). Bu proteinlerin etki mekanizması belirsizliğini korumaktadır. Hertwig epitel kılıfı tarafından üretildikleri, sementogenezde ve periodonsiyumun gelişiminde önemli bir rol oynadıkları bilinmektedir (105).

Mine matriks proteinleri, 1997'den beri Emdogain™ (Straumann AG, Basel, İsviçre), adı altında bir terapötik ajan olarak kullanılmaktadır. EMD, gelişmekte olan altı aylık domuz yavrularından, embriyonel mine oluşumu sırasında salgılanan amelogeninleri içerir. Mine matris türevi (Emdogain®, Biora AB, Malmö, İsveç) Amerika Birleşik Devletler Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) onayı almıştır ve periodontal defektlerin tedavisi için kullanılmaktadır. Emdogain™, TGF- $\beta$  ve BMP büyüme faktörlerini içerir. Bu proteinlerin kemikiçi defektlere eklenmesi, dişlerin tedavi edilmesinde periodontal rejenerasyonu artırabilmektedir (105).

EMD, bir mine matriks türevi proteinden, su ve propilen glikol, aljinat gibi bir taşıyıcı molekülden oluşur (107). Poliglikolik asit, antimikrobiyal bir taşıyıcıdır ve EMD'nin rejeneratif potansiyelini artırır (156). Mine matrikste bulunan proteinler; amelogenin, enamelin, ameloblastin (amelin veya sheathlin olarak da adlandırılır), amelotin, apin ve çeşitli proteinazlardır (108).

### **3.1.6.2.3. Mine Matriks Proteini (EMD) Etki Mekanizmaları**

EMD, hücre çoğalmasına, farklılaşmasına ve hücrenin hayatta kalmasına aracılık eder. Transkripsiyon faktörlerinin ortaya çıkmasını sağlayarak, büyüme faktörleri, sitokinler, hücre dışı matriks bileşenleri ve diğer moleküller ile hücre



metabolizması üzerinde önemli bir etkisi olduğu gösterilmiştir. PDL ve dental folikül hücrelerinde, artmış kollajen ve protein üretimi hakkında çeşitli in vitro çalışmalar bildirilmiştir. EMD'nin periodonsiyumda, yumuşak doku rejenerasyonunu ve anjiyogenezi destekleyerek, yara iyileşmesinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (109).

YDR'de, kemik içi defektler, fenestrasyonlar, furkasyon defektleri ve dişeti çekilmelerinin tedavisinde, EMD uygulanmasının, yeni sement, PDL oluşumu ve kemik oluşumuna önemli ölçüde katkı sağladığı gözlenmiştir (109). İn vitro çalışmalarda EMD'nin, cAMP seviyelerini yükselterek, PDL hücrelerinde ve dişeti fibroblastlarında, TGF- $\beta$  ve IL-6 sentezini, salgılanmasını artırır. Osteoblast öncü hücrelerinin proliferasyonunu uyararak, olgunlaşmamış osteoblastların farklılaşmasına neden olur (5, 110).

EMD'de, domuz ve insan dahil çeşitli türlerdeki genlerden elde edilen amelogeninler, yüksek oranda korunmuştur. Bu nedenle, EMD kullanımının yan etkileri olarak uyumsuzluk veya tedaviden sonra alerjik reaksiyonlar gibi belirtiler herhangi bir klinik çalışmada rapor edilmemiştir (111). Deneysel olarak kullanılan EMD, dentin onarımı, diş hareketi ve ciltte yara iyileşmesi için kullanılmıştır (107).

In vitro, EMD, PDL hücrelerini, PDGF salgılaması için uyarır. EMD, demineralize kemik grefti ile kombinasyon halinde kullanıldığında, kemik oluşumunu artırır. Deneysel olarak, farelerde, dondurularak kurutulmuş kemik allogrefti ile EMD'nin, alveolar kemik hücreleri üzerinde uyarıcı etkilerinin artırılabilceği kanıtlanmıştır (112).

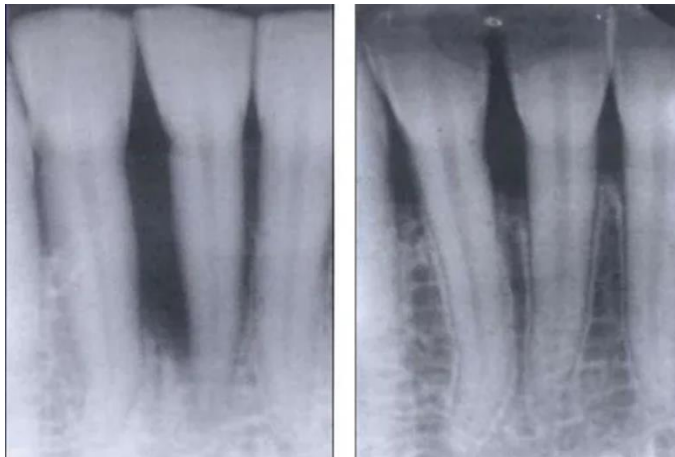
EMD'nin, fibroblast yapışmasını ve proliferasyonunu teşvik etmede önemli bir rol oynar, bu nedenle erken yara iyileşme sürecinde fibrozis oluşumunda etkilidir.

Mirastschijski ve ark.'ları, dermal fibroblastların ve mikrovasküler endotel hücrelerinin proliferasyonuna EMD'nin etkilerini araştırmışlardır. Sonuçlar, tedavinin granülasyon dokusu miktarını artırdığını ve tedavinin üçüncü gününde epitelizeasyonun tamamlanma süresini hızlandırdığını göstermiştir (113).

EMD'nin kemik sialoprotein benzeri maddeler içerdiği bildirilmiştir ve bu proteinin reseptörü aracılığıyla anjiyogenezi desteklediği bilinmektedir (114). Kemikiçi defektlerde, flep cerrahisi ve EMD ile tedavi, klinik ataçman kazanımları açısından tek başına flep cerrahisi tedavisine göre önemli ölçüde daha yüksek oranda iyileşme sağlamaktadır ve periodontal tedavilerin prognozunu etkilemektedir (115).



**Resim 10.** Emdogain'in kemik içi defektlerde ve yumuşak doku cerrahilerinde uygulanması (Straumann, İsveç)



**Resim 11.** Emdogain'in kemik defektinde uygulanmasından sonra oluşan kemiğin radyolojik olarak görüntülenmesi (Dr. Gunnar Heden, Straumann, İsveç)

### 3.1.6.3. Kemik Greftleri Kullanımı

Kemik dokusu, diş hekimliği ile ilgili en temel dokulardan biridir. Kemik dokusundaki değişimler, ağız sağlığını direkt ya da dolaylı olarak etkiler. İleri periodontal harabiyet, alveolar kretin uzun süre dişsiz kalması, önceden geçirilmiş cerrahi operasyonlar, uyumsuz protez kullanımı ve kemik yapısını etkileyen bazı sistemik hastalıklar, kemik dokusunda kayıplara neden olur. Bu durum alveolar kret yüksekliğinin veya genişliğinin azalmasına ya da bölgesel kemik defektlerini oluşturur (116).

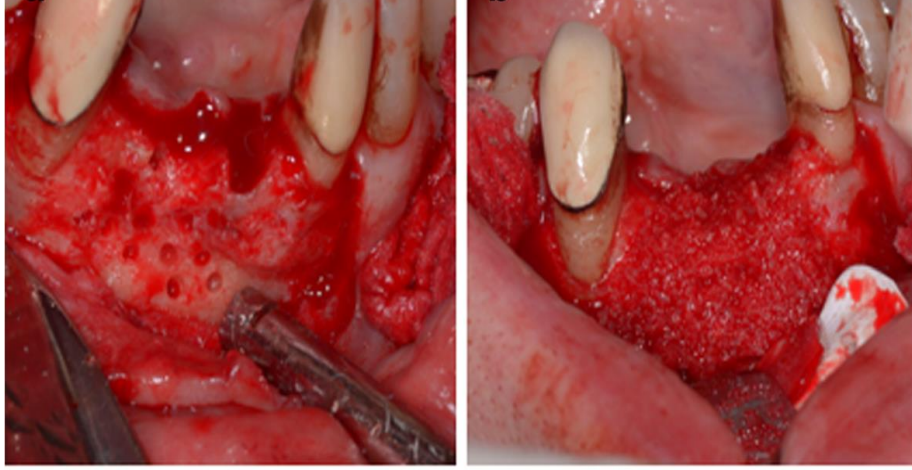
Kemik iyileşmesini uyarmak için kemik greftleri gerekmektedir (117). Kemik greftleri olarak kullanılan biyomateriyaller, yeni ve sağlıklı kemik dokusu oluşumuna katkıda bulunurlar (118). Kemik grefti materyalinin seçimi, diş defektlerinin karakteristiğine bağlı olmalıdır, çünkü her greft materyalinin kendine has özellikleri, kapasitesi ve kemik oluşturma mekanizması vardır (119). Kemik greftleri, kemik oluşumunu ve periodontal rejenerasyonu desteklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Kemik greft materyalleri, osteoblastların bağlanması, çoğalması için yapısal iskeleler ve matriksler olarak işlev görürler (71).

Alveol defektlerinin oluşumunun engellenmesi ya da onarımı, temporomandibular eklem operasyonları, kırık tedavisi gibi kraniofasial ameliyatlarda ve YDR'de kullanılan kemik greftlerinin bir takım özelliklere sahip olması gereklidir (118):

- ✓ Biyouyumlu olmalıdır.
- ✓ Yeterli gözenek boyutu, morfoloji ve bağlanabilirlik sağlayarak, kemik hücreleri, besinler ve atık ürünlerin değişimi için diffüzyona izin vermesi

gereklidir. Mikro gözeneklilik ve makro gözeneklilik gibi özelliklere sahip olması önemlidir.

- ✓ Yüzey özellikleri açısından incelendiğinde, protein absorpsiyonu, hücre dışı matriks birikimini, hücre yapışmasını, farklılaşmasını, göçünü ve son olarak kemik oluşumunu sağlamak için nano ve mikro düzeyde hem yüzey topografyası hem de yüzey fiziko-kimyasının uygun olması önemli özelliklerdir.
- ✓ İdeal kemik grefti materyalinin, doku hacmini kaybetmeden, iyileşme ve rejenerasyona müdahale etmeden, tahmin edilebilir bir absorpsiyon hızında, tamamen kemik ile yer değiştirmesi beklenir. Yavaş rezorpsiyona sahip biyomateryaller olması durumunda ise doku ile temas halinde yeterli hacimde yeni kemik oluşum sürecini sağlamalıdır.
- ✓ Doğal kemiğin rejenerasyon bölgesinde, basınç dayanımı ve elastikiyeti, çevredeki yükü karşılayacak kadar yüksek olmalıdır.
- ✓ Anjiogenezi desteklemelidir.
- ✓ Biyomateryal, yapışkan olmalıdır. Defektlere uyum sağlamak için kullanımda stabil ve kolay olmalıdır. Kraniomaksillofasiyal kemik rejenerasyonu için biyomateryaller genellikle granül veya blok şeklindedir. Klinik ihtiyaçlara bağlı olarak geniş bir boyut ve form değişkenliği (0,1 ila 2,0 mm arasında partikül formu) olmalıdır (120).
- ✓ Uygunluk sertifikası ve sterilizasyon süreçleri belirtilmeli, uzun raf süresine sahip ve daha az üretim maliyeti olan biyomateryal sağlanmalıdır.



**Resim 12.** Alveolar kret kemiği artırımında kemik grefti kullanılması (121)

Osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon kemik rejenerasyonunun üç temel unsurudur. Vericide yaşayan kemik kök hücreleri, greftin yerleştirilmesi sırasında prolifere olur, osteoblastlara ve sonunda osteositlere farklılaşır. Bu hücreler, greftin "osteojenik" potansiyelini temsil eder (122). Osteoindüksiyon, kemik oluşturan osteoblastlara farklılaşma sürecinde, çevredeki dokudan konakçı mezenkimal kök hücrelerin uyarılması ve aktivasyonudur. Bu sürece bir dizi sinyal ve aktivasyon molekülleri aracılık eder. En önemlileri, TGF- $\beta$  ailesine ait olan hücre dışı ve hücre içi reseptörden oluşur (122). Osteokondüksiyon, kan damarlarının yönlendirilmesini ve yeni Havers sistemlerinin kemik iskeletine dönüştürülmesini açıklar. Osteointegrasyon, konakçı kemik ile greft materyali arasındaki yüzey bağını tanımlar (123). Son olarak 'osteopromosiyon' özelliği ise, bir materyalin osteoindüktif özelliklere sahip olmadan, osteoindüksiyona katkı sağlamasıdır (124). Greft materyallerinin karakteristik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir (125):

**Tablo 1.** Kemik greft materyallerinin karakteristik özellikleri

| <b>Greft Materyali</b>                           | <b>Karakteri</b>   |
|--------------------------------------------------|--------------------|
| Otojen greftler                                  | Osteogenezis       |
| BMP                                              | Osteoindüksiyon    |
| Demineralize dondurulmuş kurutulmuş allogreftler |                    |
| Demineralize kemik matriksi                      |                    |
| Sığır kaynaklı ksenogreft                        | Osteokond(ü)ksiyon |
| Kalsiyum fosfat                                  |                    |
| Kalsiyum sülfat                                  |                    |
| Kollajen                                         |                    |
| Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti          |                    |
| Cam iyonomer                                     |                    |
| Hidroksiapatit                                   |                    |
| Nikel- titanyum partikülleri                     |                    |

#### **3.1.6.3.1. Kemik Greft Materyallerinin Mekanizması**

Kemik greftleri, defekt alanlarında kemik oluşumunu destekleyen pıhtı gelişimi, olgunlaşma ve yeniden şekillenme için yapısal bir çerçeve sağlar. Alıcı bölgeye greft materyali yerleştiği andan itibaren, kemik dokusu iyileşmesine benzer bir süreç başlar. Greftin vaskülerize olmaması, hemostazın sadece alıcı sahada oluşmasına neden olur. İnflamasyon safhası ise hem greftte hem de alıcı bölgede gerçekleşir. Alıcı sahadan gelen inflamatuvar hücreler, greft vaskülerize olmasa bile, greftte inflamasyonu başlatır. İnflamasyon fazı nedeniyle hem greftte hem de alıcı bölgede farklı miktarlarda rezorpsiyon oluşur. Öncül kemik oluşumu aşamasında ilk olarak gerçekleşen olay, mezenkimal kök hücre göçü ve çoğalmasıdır. Mezenkimal hücrelerin kondroblastlara ve kondrositlere dönüşmesi ile ikinci faz başlar. Kemik yüzeyi ile greft arasında bir kırıkta kallus oluşur. Bu kırıkta kallusa kan damarlarının ulaşması ile üçüncü faz başlar. Bu safha, mezenkimal hücrelerden farklılaşan osteosit ve osteoblastların kemik matriksi üretmesi, devamında da kalsifiye etmesi ile sonuçlanır. Öncül kemik oluşumundan sonra yapım ve yıkım

olayları ile olgun kemik halini alır. Alıcı bölgedeki kemik yapısına uygun şekilde greft materyali kemikleşmiş olur (126).

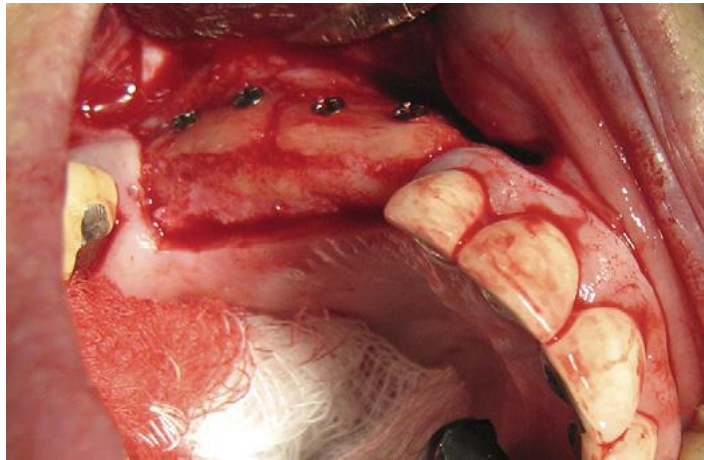
Otojen greftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastlar (sentetik/yarı sentetik materyaller) dahil olmak üzere, çeşitli kemik grefti materyalleri uygulanmış ve klinik olarak değerlendirilmiştir (71).

### **3.1.6.3.2. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması**

Periodontal rejenerasyon için kullanılan kemik grefti materyalleri dört kategoriye ayrılır; otojen greftler, allogreftler, alloplastlar ve ksenogreftler (127).

#### **3.1.6.3.2.1. Otojen greftler**

Bu greftler aynı kişiden elde edilen greft materyalleridir ve “altın standart” olarak kabul edilmektedir (128). Osteojenik hücrelerin yanı sıra iyileşme için gerekli osteoindüktif ve osteokondüktif elementleri sağlar. Diğer greft materyallerinin aksine, canlı hücreler bulundurduğu gibi çoğunluğu tip I kollajenden oluşan matriks proteinleri, osteopontin, kemik sialoprotein, osteonektin, osteokalsin, fibronektin ve BMP de içermektedir. İmmünolojik açıdan oldukça uyumlu olmaları en büyük avantajlarından biridir (129).



**Resim 13.** Alveolar kret kemiği artırımında otojen blok greft uygulanması (125)

Otojen greftlerin elde edildiği yerler; simfiz, tüber, ramus, ekzostozlar veya cerrahi hazırlık bölgeleridir. Anatomik sınırlamalar nedeniyle ağız dışı bölgelerden alınmasını gerektiren durumlar ortaya çıkabilir. Bu bölgeler; iliak krest, kaburga, posterior ilium, tibia ve kafatasıdır. Otojen greftler genellikle ilik, trabeküler kemik ve kortikal kemik içerecek şekilde alınır. Otojen olarak alınan greftler, saklama koşullarına göre iki saate kadar canlılığını koruyabilir. Greftleme işleminden önce greft materyali, kuru bir ortamda saklandığı takdirde 30 dakika içinde, greftin içerdiği hücreler canlılığını yitirmektedir (118).

Otojen kemik grefti altın standart olarak kabul edilse de diğer kemik greftleriyle karşılaştırıldığında, cerrahi verici bölgedeki sınırlamalar ve tedavinin invaziv olması, alınan miktarın kısıtlı olması gibi noktalarda hastalar için durumun zorlaşması nedeniyle dezavantajlıdır. Ağız dışı otojen greft alımı, hematoma oluşumu, sinir yaralanması, fitik oluşumu, enfeksiyon, arter yaralanması, kırık, kozmetik kusurlar ve bazen kronik ağrı dahil olmak üzere komplikasyonların %8.5-20'si ile ilişkili olabilir (130).

Otojen greftler, elde edilmesi ya da uygulama prosedürü esnasında kontamine edilmedikçe biyouyumlu ve güvenlidirler. Otojen greftler hidrofilik olduklarından dolayı kan ya da serum fizyolojik ile ıslatılarak uygulanır. Bütün otojen greftler rezorbe olma potansiyeline sahiptirler. Rezorpsiyon miktarını, hastaya bağlı sistemik, lokal faktörler ve greftin alım yöntemi etkiler (131). Farklı alım yöntemleri, greft partikül morfolojilerinin farklı olmasına ve büyüme faktörleri ya da canlı hücre içeriğinin etkilenmesine neden olur (132). Herhangi bir işlem görmeyen kansellöz kemikte, kortikal kemiğe göre daha fazla osteogenez sağlayan hücre bulunur, bu



durum maksillar kansellöz kemiğin mandibular kortikal kemikten daha fazla hücre içerdiğini ortaya koymaktadır (133).

#### **3.1.6.3.2.2. Allogreftler**

Taze/dondurulmuş, dondurularak kurutulmuş kemik veya demineralize dondurularak kurutulmuş kemik olarak aynı türden yani kadavralardan elde edilir (134). Allogreftler sadece osteokondüktif yapı görevi görmez, aynı zamanda osteoindüktif potansiyele de sahiptirler (135). Doku bankaları, kemik allogreftlerini, özel tekniklere dayanan çeşitli yöntemler kullanarak işler (71).



**Resim 14.** Kemik artırımında allogreft kemik greftinin uygulanması (125)

Allogreftler greftin yapısına göre kortikal, kansellöz, kortikokansellöz ve osteokondral olarak sınıflandırılırlar. Hazırlaması aşamasında; taze olarak uygulanma, dondurulma, dondurulup-kurutulma (freeze drying) (liyofilizasyon), kimyasal koruyucular uygulanması, deproteinize edilme ve çözücüler ile dehidrate edilme (solvent dehydration) gibi yöntemlerle uygulanabilir hale getirilirler. Allogreftlerin canlı hücre içermelerinden dolayı immun reaksiyon oluşturma ihtimallerinin yüksek olması, taze şekilde uygulanmasını engeller. Bu nedenle,

allogreftlerin uygulanması için içerdikleri canlı hücrelerin uzaklaştırılması gerekmektedir (136).

Partikül kemik allogreftleri, mineralize veya demineralize olarak sağlanır. Demineralizasyona uğramış allojenik kemik, DKM veya demineralize dondurularak kurutulmuş kemik allogreft (DDKKA) olarak adlandırılır. DKM, kas gibi ortotopik olmayan bölgelerde kemik oluşumunu artırır ve osteoindüktif olarak kabul edilir. Demineralize edilmiş kemiğin, BMP'lerle temasından dolayı maksimum osteoindüktif potansiyel sağladığı gösterilmiştir (137).

Dondurma işlemi ile allogreftlerde, osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler kaybolmaz. Allogreftlere, gliserinli, civalı veya formaldehitli bileşikler kimyasal koruyucu olarak uygulanır. Çözücü kimyasallar ile dehidratasyon işlemi elde edilir. Greftler çözücüler ile dehidrate edilirken hidrojen peroksit ve aseton uygulanır. Enfeksiyon riski hidrojen peroksit ile düşürülürken, dokudaki yağlar ve suyun uzaklaştırılması aseton ile sağlanır (138).

Allogreftler hazırlama yöntemlerine göre; taze allogreft, dondurulmuş kemik (DK), dondurulmuş ve kurutulmuş kemik (DKKA), demineralize dondurulmuş ve kurutulmuş kemik (DDKKA) ve deproteinize kemik olmak üzere beş gruba ayrılır:

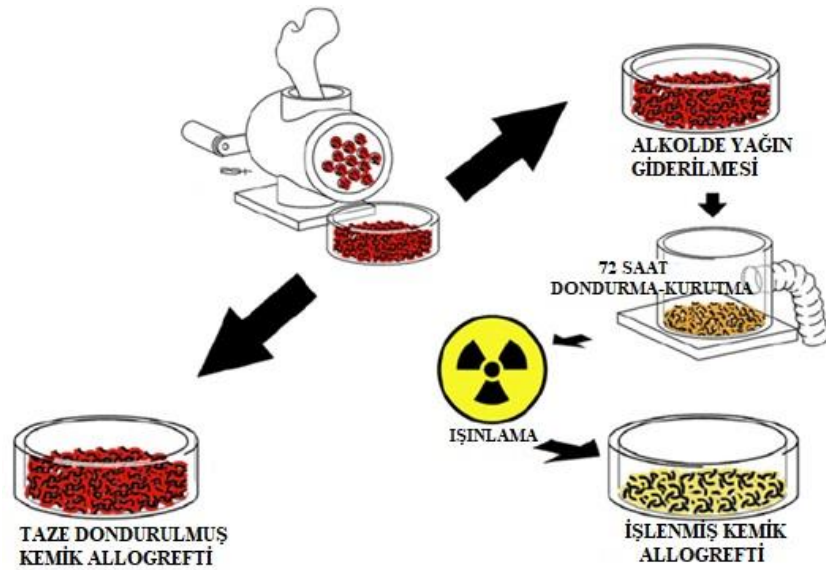
Taze allogreftler, canlı donörden alınır ve olabildiğince az işlem görerek alıcı sahaya aktarılırlar. Greftte bulunan kemik iliği ve periost hücreleri büyük oranda antijenik olduğundan grefti reddetme ihtimali yaklaşık olarak %50 civarındadır. Hastalık taşıma ihtimalleri de yüksek olduğundan genellikle kullanılmazlar (139).

DK greftleri, donör sahadan alındıktan sonra çeşitli çözeltiler ile antimikrobiyal ajanlardan geçirilir ve yaklaşık -70°C'de dondurulurlar. Dondurma

işlemi ile immünojenik özellik düşer ancak tamamen ortadan kalkmaz. İçerdiği proteinler büyük oranda korunduğu için osteoindüktif özellikleri vardır. Antijenik proteinler de korunduğu için pek tercih edilmezler (140).

Dondurulmuş kurutulmuş kemik (DKKA) greftler, DK greftlere dehidratasyon ve liyofilizasyon işlemleri uygulanması ile elde edilir. Bu işlemler proteinlerin yapısını bozar ve böylece immünojenik yanıtın oluşma riski azalır. Bununla beraber osteoindüktif özelliğin kaybolduğu, sadece osteokondüktif özelliğin kaldığı gözlenir. Kollajen liflerin üzerinde mikro çatlaklar oluşmasına neden olduğu için greftin mekanik özelliklerini olumsuz etkiler (140).

Demineralize edilerek dondurulmuş ve kurutulmuş (DDKKA) greftler ise DK greftlere, asit uygulanması sonrası ısı, dehidratasyon, liyofilizasyon, gama ışınları ve etilen oksit uygulanması ile elde edilir. Klinik olarak sadece osteokondüktif etki gösterir. DKKA greftlerde, kemiğin inorganik yapısının çıkarılmasından dolayı yapısal sağlamlığında çok fazla kayıp meydana gelir. Bu kayıp nedeni ile yük taşıyan alıcı sahalarda yeterli desteği sağlayamayacağı unutulmamalıdır (141).



**Şekil 7.** Allogreftlerin (DKKA) işlenerek elde edilmesi (142)

Allogreftler otojen greftler gibi partikül veya bloklar halinde üretilebilir. Allogreftlerin genel avantajı, otojen kemik ile benzer mekanik özellikleri sağlaması, kollajen matriks ve doğal proteinleri içermesidir. Kullanım özellikleri otojen kemik ile karşılaştırıldığında, greftleme için gerekli olan cerrahi sürenin azalması ve kullanılabilirliklerinin artması avantajlarıdır. Olası hastalık bulaşma riski olması ise dezavantajıdır. Allogreftlerin kemik artırımındaki başarıları otojen kemik greftlere göre daha düşüktür. Osteojenik özellikleri bulunmaz ve alıcı bölge ile uyum sağlama süreleri daha uzundur (118).

#### **3.1.6.3.2.3. Alloplastik greftler**

Alloplastik greftler, biyolojik olarak uyumlu, inorganik sentetik olarak üretilmiş ve greft fonksiyonu gören materyallerdir. Periodontal rejenerasyon için kullanılan alloplastik greftler, üretildikleri materyalin özelliklerine ve üretilme şekillerine göre iki sınıfa ayrılır. Bunlar seramikler ve polimerlerdir. Alloplastik greftlerin bileşimi, morfolojisi ve yüzey topografisi kemik oluşumunu teşvik etmesi için osteokondüktif yapı sağlar (143).

Seramik içerikli alloplastik greftler, kemik ve periodontal rejenerasyon için yaygın olarak kullanılmaktadır. Sentetik kemik greftleri hidroksiapatit (HA), trikalsiyum fosfat (TKF), kalsiyum sülfat veya bu materyallerin kombinasyonundan oluşur. Alloplastik greftler osteokondüktif özellikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (144). Bu biyomateryallerin avantajları arasında, biyouyumlu olmaları, bir bağışıklık tepkisinin oluşmaması ve kullanımdan sonra radyografik olarak değerlendirilebilme özelliklerinin daha iyi olması sayılabilir (119).

HA grefti hem araştırma hem de klinik alanlarda yaygın kullanılan kalsiyum fosfat (CaP) içerikli greft biyomateryallerinden biridir. HA, doğal kemik mineraline

benzer bir bileşime ve yapıya sahiptir. Kullanımında, doğrudan kemiğe kimyasal olarak bağlandığı bilinmektedir (145).

TKF'nin kemik grefti olarak kullanımı son yıllarda artmaktadır. TKF'nin  $\alpha$  ve  $\beta$  fazları bulunur. Bu iki greft kimyasal olarak aynı olsa da fizyolojik bir ortamda farklı davranışları vardır.  $\beta$ -trikalsiyum fosfatın ( $\beta$ -TKF) hem hayvanlarda hem de klinik çalışmalarda iyi biyouyumluluk ve osteokondüktivite sergilediği gösterilmiştir. TKF, insan klinik çalışmalarında, marjinal ve periapikal periodontal defektlerin yanı sıra, apeksifikasyon gibi çeşitli alveolar kemik defektlerini onarmak için de kullanılmıştır (145).

$\beta$ -TKF, HA kemik grefti gibi süngerimsi kemiğe benzer oranlarda kalsiyum ve fosfat içeren gözenekli bir CaP bileşimidir ancak kemik ve diş yapısında bulunmaz. HA kemik greftine göre por yapısı daha düzensizdir, kontrolsüz bir rezorpsiyon potansiyeline sahiptir. Yük taşımayan alanlarda tercih edilmektedirler (146).

Bir diğer alloplastik greft materyali de biyoaktif camlardır. Biyoaktif cam, esas olarak  $\text{SiO}_2$  (silika) den oluşan bir seramiktir. Porlu yapıya sahip olmadığından dolayı greft içerisine doğru bir anjiyogenez görülmez. Bu CaP açısından zengin tabakanın, hücre dışı matriksin mineralizasyonu için gerekli olan osteoblasttan türetilmiş proteinlerin absorpsiyonunu ve konsantrasyonunu desteklediği düşünülür. Direkt olarak osteojenik ve osteoindüktif etkileri olmamasına rağmen yüksek biyoaktif özelliği bu etkileri aktive eder. Biyoaktif cam, kemikiçi defektlerde uygulandığında, klinik ataçman seviyesini ve kemik oluşumunu önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (147).

Polimerler kaynağına göre doğal ve sentetik olarak sınıflandırılabilir. Kemik greft materyallerinin üretiminde kullanılan doğal polimerler arasında polisakaritler

(ör., agaroz, aljinat, hiyaluronik asit, kitosan) ve polipeptitler (ör., kollajen, jelatin) gösterilebilir. Bu polimerlerin, nispeten zayıf mekanik dayanıklılık, değişken bozunma oranları gibi yapısal özelliklere sahip olması, kemik greft materyalleri olarak kullanımlarını sınırlandırmıştır (71).

Sentetik polimerler (örneğin, poli (glikolik asit), poli (L-laktik asit), poliortoester, polianhidrit), rejeneratif dokuların biyomekanik özelliklerini kontrol etmek için bir platform sağlar. Polimerler, periodontal defektlerin tedavisi için YDR tedavisinde bariyer membran olarak kullanılmaktadır. Kemik ve periodontal rejenerasyon için polilaktik asit (PLA) içerikli polimerler ve kopolimerler dahil olmak üzere birkaç polimer sistemi kullanılmaktadır (148).

Yukarıdaki alloplast greft materyallerinin dışında kalsiyum sülfatlı bileşikler, metaller ve jelatin filmler alloplastik greft materyali olarak kullanılabilir (147).

#### **3.1.6.3.2.4. Ksenogreftler**

İnsan dışı yani farklı türler arasında nakledilen greftlerdir. Sınırlı rezorptif potansiyele sahiptir. Ksenogreftler, kemik defektlerini onarmak, bir iskelet görevi görmek için çeşitli çalışmalarda kullanılmıştır (121).

Klinik uygulamada sığır kemiği ve doğal mercan olmak üzere iki ksenogreft türü vardır. Doğal kaynaklı kemik greftleri, sentetik greftlere kıyasla daha fazla osteokondüktivite sergiler. Ksenogreftler, sınırsız miktarda materyal tedariki ve kemik elde etmekte fazladan işlem ihtiyacını ortadan kaldırdıkları için iyi alternatiflerdir (149).

Ksenogreftler, sentetik greftlerden daha karmaşık bir bileşime sahiptir. Greft düşük sıcaklıklarda hazırlandığından yapısında küçük kristaller içerir. Küçük

kristallerin daha iyi osseointegrasyona sahip oldukları kanıtlanmıştır. Ksenogreftlerin gözenekliliği ve yüzeyinin, alloplastik kemik greftlerinden daha iyi olduğu kabul edilmiştir. Kortikal kemik ve süngerimsi kemik açısından benzer mekanik özellikler bulunmuştur (150). Isı ve kimyasal işleme, osteojenik bileşenlerin çoğunu kemikten uzaklaştırmakla beraber potansiyel hastalık bulaşma riskini tamamen ortadan kaldırmaz (sığır süngerimsi ensefalopati) (151).

İnorganik sığır kemik greftinin, mineral bileşimi, mikro gözenekli yapıya sahip, doğal olarak türetilmiş ve deproteinize edilmiş bir mineralidir. Bu greft malzemesinin, insanda, klinik ataçman seviyesinde ve kemik içi defektlerde sert doku artırımında olumlu sonuçları olmuştur (149).

Ksenogreftler sığırdan elde edilebildiği gibi, at, domuz gibi diğer hayvan kaynaklarından da elde edilebilir. Domuz kemiği grefti, ağırlıklı olarak CaP'tan oluşan gözenekli bir inorganik kemik greft materyalidir. İnorganik kemik mineral matriksi, biyolojik olarak uyumludur, birbiriyle bağlantılı makro ve mikro gözenekli yapıya sahiptir ve yüksek oranda osteokondüktiftir. Yeni kemiğin oluşumunu ve büyümesini destekler (152). Domuzların insanlara yakın bir genotipe sahip olması nedeniyle, domuz kaynaklı ksenogreft daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Histomorfometrik ve osteoblast gen oluşum profillerine dayanarak, insanlarda çekim soketlerini iyileştirmek için kortikokansellöz domuz kemiğinin greft olarak kullanılması bu özellikleri doğrular niteliktedir (153).

Periodontal rejenerasyonda en sık kullanılan ksenogreftler, deproteinize sığır kemik mineralidir (154). Sığır kaynaklı kemik grefti partikülleri ve blokları, alveolar kret artırımı prosedürleri ve kemik içi defektlerin doldurulması için kullanılmıştır (155). Sığır kaynaklı kemik bloğu greftleri, yüksek osteokondüktif potansiyele

sahiptir, bu greftler doğası gereği kırılıgandır. Bu özellik onları vida sabitleme prosedürleri sırasında veya uygulanmasından sonra başarısız olmaya elverişli hale getirir (156).



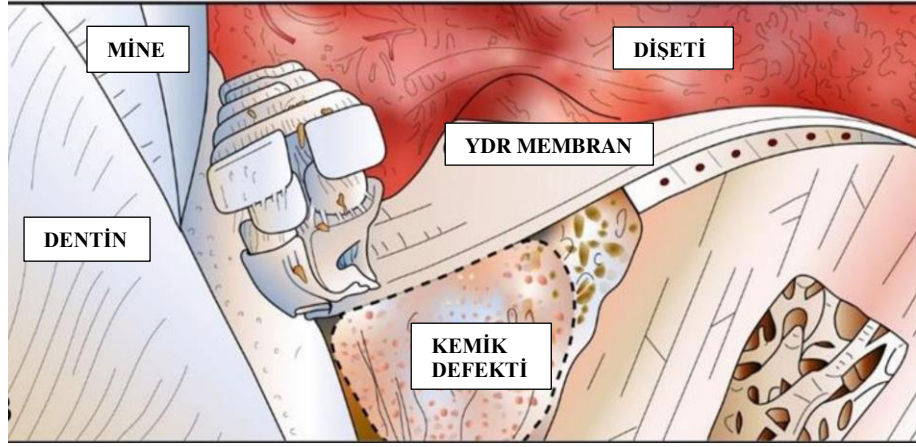
**Resim 15.** Otojen greft ve sığır kaynaklı ksenogreft

Daha düşük maliyetli olması, daha az immün reaksiyon oluşturmaması ve düşük bulaşıcı hastalık riski göstermesi nedeniyle son yıllarda kullanılan ksenogreftler, okyanus mercanından yapılan koralin hidroksiapatittir (125). Bu greftler, periodontal rejenerasyon uygulamalarında daha iyi defekt doldurma potansiyeli göstermiştir (157). Biyolojik bileşenlerden yoksundur, dolayısıyla aktivitesi sınırlıdır. Bu biyomateriyaller çoğunlukla partikül formunda kullanım için mevcut olduğundan büyük defektli rejenerasyon cerrahilerinde kullanımı sınırlıdır (118).

#### **3.1.6.4. Bariyer Membran Kullanımı**

Yumuşak doku iyileşme hızı, kemik ve periodontal dokudan daha hızlıdır. Bu nedenle bariyer membranlar, epitel hücrelerinin dokuların yenilenmesi için defekt alanına girmesine engeller. Kemik greftleri ile kombinasyon halinde kullanılırsa, greft materyallerini stabilize eder. Bu durum greftin rezorpsiyon oranını düşürür. Periodontal doku ve kemik rejenerasyonunda kullanılan rezorbe olabilen ve rezorbe olmayan membranlar vardır (158).



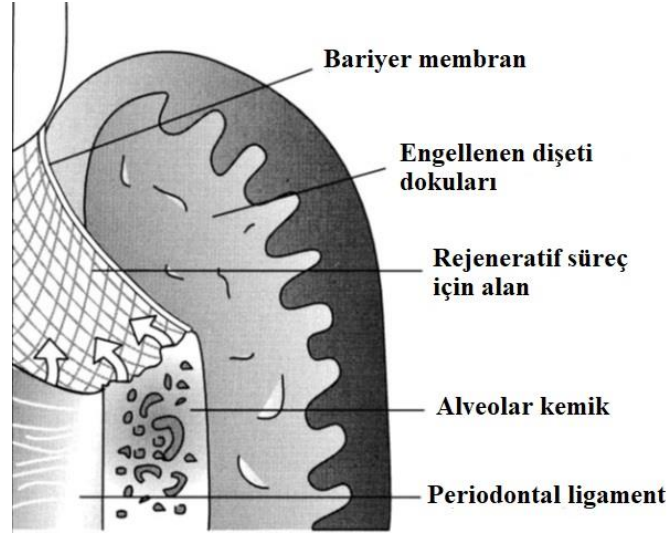


**Şekil 8.** YDR’ de bariyer membran kullanımı (159)

Bariyer membranların genel özellikleri şunlardır:

- ✓ Biyolojik uyumluluk,
- ✓ Hücre tıkaçıcılığı,
- ✓ Boşluk oluşturma yeteneği,
- ✓ Doku entegrasyonu,
- ✓ Mekanik dayanıklılıktır (160).

Bir YDR membranının sahip olması gereken ön koşullardan biri, üstteki dokunun basıncından kaynaklanan çökmeye direnecek kadar sert olmasıdır. Bu nedenle, bazı membranlara, sertliklerini iyileştiren titanyum materyali (titanyum takviyeli ePTFE) eklenmiştir. Böylece geleneksel YDR’ye göre önemli ölçüde daha iyi klinik ataçman seviyesi sağlanmıştır (161). Bu membranlar doku üzerine yerleştirildiklerinde, herhangi bir inflamatuvar reaksiyon ortaya çıkarmamalıdır (162-164).



**Şekil 9.** Bariyer membranların etki mekanizmaları (22)

YDR/YKR membranları, rezorpsiyon özelliklerine göre titanyum ile güçlendirilmiş veya güçlendirilmemiş membranlar olarak iki ana kategoriye ayrılmıştır. PTFE membranlar, hem hareketsiz hem de biyouyumlu olmanın yanı sıra doku rejenerasyonu için gerekli alanı sağlarlar (162).

#### **3.1.6.4.1. Rezorbe Olmayan Bariyer Membranlar**

Biyouyumludur. Rezorbe olan membranlara göre yapısal bütünlüklerinin bozulmaması, defekt boşluğunu daha iyi korumaları, defekt bölgesine doğru çökme ve büzülme göstermemeleri gibi fiziksel özellikleri bulunmaktadır. Sert yapısı nedeniyle membranın açığa çıkmasıyla buna bağlı kemik rezorpsiyonları oluşturmaları dezavantajlarından biridir. Dokuyla bütünleşme özellikleri yoktur ve rezorbe olmadığı için çıkarılmaları ikinci bir cerrahi müdahale gerektirir. Bu membranlar iki gruba ayrılmaktadır (165).

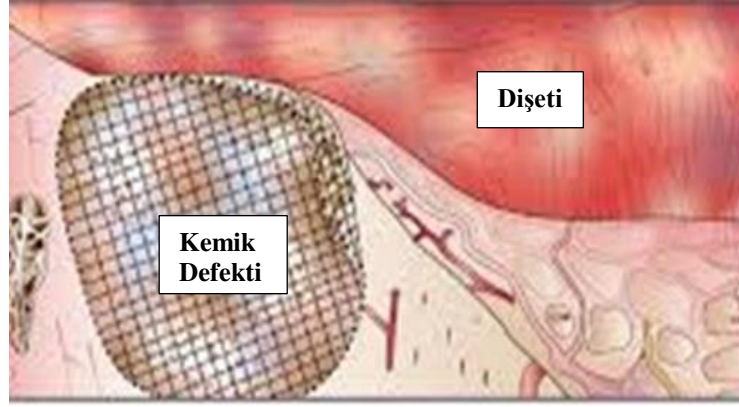
**a) Politetrafloroetilen (PTFE) Membran:** PTFE membranların klinik etkinliği, cerrahi olarak yerleştirme tekniğine ve membran üzerindeki yumuşak doku

örtüsünün korunmasına bağlıdır. İyileşmenin ideal olması için membran üzerindeki keratinize diş etinin kalın olması kritik öneme sahiptir (16).

- ✓ Genişletilmiş-PTFE (expanded/e-PTFE): Gözenekli bir yapıya, esnek bir forma sahip, kimyasal olarak kararlı ve hareketsiz bir polimerdir. Mikrobiyolojik ve enzimatik bozulmaya direnir ve immünolojik reaksiyonlara neden olmaz. Periodontal ve kemik rejenerasyonunda yaygın olarak kullanılan e-PTFE membranları başarılı YKR'ye neden olmuştur. Membran yerleştirildikten sonra iyileşmenin 4-6 hafta kadar sürmesine izin verilir. Radyografik kemik oluşumu altı ay sonra meydana gelir ve bu durum bir yıl boyunca devam edebilmektedir. Klinik çalışmalar, YDR prosedüründe kullanılan ePTFE membranların defektleri düzeltmede flep cerrahisinden daha etkili olduğunu göstermiştir (15).

- ✓ Yüksek Yoğunluklu-PTFE (high density/ d-PTFE)
- ✓ Titanyumla Güçlendirilmiş-PTFE (titanium reinforced-PTFE)

**b) Titanyum Mesh (Ağ) Membran:** İyi mekanik özelliklere ve biyouyumluluğa sahiptir. Yüksek dayanıklılığı ve sertliği ile osteogenez için bariyer sağlar. Şekil verilebilme özelliği olan titanyum mesh, bükülme yoluyla kemik defektlerine uyum sağlar. Bu özellikler titanyum mesh ile yapılan YKR'nin stabil osteogenez etki göstermesini, yatay ve dikey yönde kemik artırımını sağlar. Kalınlık ve gözeneklilik, mekanik özelliklerini etkileyen temel faktörlerdir. Yaygın olarak kullanılan titanyum meshlerin kalınlıkları 0,1 ile 0,6 mm arasında değişmektedir. Genellikle, 0,2 mm kalınlıktaki titanyum mesh kullanılır. Kemik rejenerasyon alanını korumak için YKR'de kalın titanyum mesh kullanılmalıdır (166).



**Şekil 10.** Yumuşak doku hücre göçünün önlenmesi ve kemik rejenerasyonunun desteklenmesi için fiziksel bariyer olarak titanyum mesh kullanılması (159)

#### 3.1.6.4.2. Rezorbe Olan Membranlar

Membranın açığa çıkma ihtimalinden ve ikinci cerrahi prosedürden kaçınmak için rezorbe olabilen bariyer membranlar geliştirilmiştir (167). Yerleştirildikleri bölgede, enzimatik reaksiyonla veya hidroliz yoluyla rezorbe olmaktadır. Bu membranlar biyouyumludur, esnek ve şekillendirilebilir yapıdadır. Rezorbe olmayan membranlara göre klinik olarak şekillendirilebilirlikleri daha kolaydır. Rezorbe olabilen membranların esnek yapısından dolayı yetersiz bariyer sağlaması, fibröz doku oluşturan hücrelerin bölgeye göçünü engellemede başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir. Bu membranların mekanik direncinin az olması sebebiyle, kemik oluşumu için korunması gereken defekt boşluğunu dışardan gelecek kuvvetlere karşı korumada yetersiz kalabilmektedir. Ayrıca, enzimatik reaksiyonla rezorbe olduğu için immün yanıtı tetikleme riskleri de bulunmaktadır (168).

Temel olarak üç tip rezorbe olabilen membran vardır:

- ✓ poliglikosit sentetik polimerler (yani, polilaktik asit, polilaktat / poligalaktat ko-polimerleri);
- ✓ kollajen

✓ kalsiyum sülfat.

**Sentetik olanlar**, likolik asit ve laktik asidin polimerleri şeklinde bulunmaktadır. Bu membranların arasındaki ester bağları 30-60 gün arasında çözünmektedir ve bu çözünmenin sonucunda açığa çıkan serbest asitlere bağlı olarak inflamatuvar reaksiyon gerçekleşebilmektedir (169).

Kollajen, aselüler dermal matriks, fasya lata, perikardium ve laminar kemikten elde edilen membranlar **doğal rezorbe olabilen membranlardır**. İnsan derisi, domuz derisi ve sığır aşıltendonundan türetilen kollajen bazlı membranlar, daha yüksek biyouyumlulukları nedeniyle sentetik membranlar yerine kullanılmaya başlanmıştır (170).

Kollajen membranlar, yabancı cisim reaksiyonu göstermeden rezorbe olurlar, hızlı vaskülarizasyon ve iyi doku uyumu sergilemektedirler (171). Bağ dokusu hücrelerinin membran yapısındaki kollajen zara yapışması, periodontal rejenerasyonu destekler ve defektin pıhtıyla dolmasına yardımcı olarak hemostazı sağlamaktadır. Bu özelliklerinden dolayı kollajen membranlar, rezorbe olabilen YKR bariyerleri içinde ideal bir seçimdir (172).

Rezorbe olan membranların, ePTFE membranları ile kullanımını karşılaştıran YDR çalışmaları, her iki membranın da eşit derecede etkili olduğunu göstermiştir. Bu, çoğu klinisyenin YDR prosedürlerinde rezorbe membranları kullanmasıyla sonuçlanmıştır (16). Kollajen membranlara ek olarak polilaktik asit (PLA) ve kopolimerleri gibi çok çeşitli polyester içerikli membranlar kullanılmıştır. Diğer polimerlerle birleştirilmiş birçok membran türü, özelliklerini iyileştirmek için geliştirilmiştir ve klinik sonuçları ümit vericidir. Biyolojik olarak rezorbe olabilen YDR bariyer membranı, poliglikolik asit ağ ile PLA / poli (glikolid-ko-laktit)

kopolimer (PLGA) membranı ile inşa edilmiştir. PLGA, kullanımı kolay olup, oda veya vücut sıcaklığında elastiktir, ancak epitel ve dişeti bağ dokusunun apikale doğru yer değiştirmesini engellemek için şişer ve sertleşir. Membranın parçalanması 2-6 aylık bir süre içinde meydana gelir. Bunun dışında, PTFE membranlarla karşılaştırıldığında, polyester içerikli membranlar biyolojik olarak rezorbe olabilir ve kullanımı daha kolaydır. Bu membranların, rejeneratif tedavinin başarılı olması için en az 4-6 hafta fiziksel ve mekanik olarak bozulmadan kalması gerekmektedir (162).

Bu çalışmada ise PRF, EMD ve kemik greftlerinin YDR ile kemik oluşumuna olan etkisini incelemek amacıyla ratların kalvaryumlarında defekt oluşturarak titanyum membranın koruyucu etkisinden yararlanmak için titanyum kubbeler yerleştirildi. Bu denekler üç ay gözlemlendi ve bu sürecin sonunda oluşan kemik dokuları osteoblast, osteoklast sayısı ve yeni oluşan kemiğin durumuna göre değerlendirildi.

## 4. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda, Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulundan izin alınarak 97132852/604.01.02 sayılı 28/04/2019 tarihli, D.H.F. 19.08 nolu yapılan projemizde, Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nden temin edilen hayvanlar kullanıldı. Deneysel süreçler Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezinde gerçekleşmiş olup, histolojik ve immunohistolojik kesitler Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında elde edilerek, analizleri gerçekleştirildi.

### 4.1. Deney Hayvanları Seçimi ve Cerrahi Düzenek

Deneysel çalışmamızda, 250, 300 g ağırlığında toplam 127 adet Spraque Dawley türü erkek ratlar kullanılarak rastgele olacak şekilde 7 grup oluşturuldu. Aynı zamanda PRF elde edilen ayrı bir grup oluşturuldu. Ratlara, deney öncesinde, sırasında ve sonrasında hiçbir ek besin takviyesi yapılmadı, havalandırma desteği olan özel kafeslerde barındırılarak herhangi bir durumdan mahrum bırakma söz konusu olmadı.

#### 4.1.1. Gruplar

Her bir deney grubunda 13 hayvan olacak şekilde denekler 7 gruba ayrıldı:

**1. Grup Kontrol Grubu (n=13):** Genel anestezi altında deneklerin kalvaryum kemiklerine kaviteler açılıp kubbeler yerleştirildi ve titanyum kubbelerin içi boş bırakıldı. Çalışmanın sonuna kadar kubbeler boş kalıp ek herhangi bir işlem uygulanmadı. Denekler bu işlemi takiben 3 ay boyunca normal diyetle beslendi, 3 ay sonrasında sakrifiye edilerek histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için kalvaryum kemikleri alındı.

**2. Grup PRF Yerleştirilen Grup (PRF) (n=13):** Genel anestezi altında bu grupta, deneklerin kanından PRF elde edilerek aynı seansta PRF içerikli titanyum kubbeler deneklerin kalvaryum kemiklerine yerleştirildi, denekler bu işlemi takiben 3 ay boyunca normal diyetle beslendi, kemik iyileşmesini takip eden 3. ayın sonunda sakrifice edildi, histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için kalvaryum kemikleri alındı.

**3. Grup PRF ve Kemik Grefti Yerleştirilen Grup (PRF+KG) (n=13):** Bu gruptaki deneklerin genel anestezi altında kalvaryum kemiklerine, kemik grefti ve deneklerin kanından elde edilen PRF karıştırılarak doldurulan titanyum kubbeler yerleştirildi. Denekler bu işlemi takiben 3 ay boyunca normal diyetle beslendi, 3 aylık deney süresinin sonunda sakrifice edildi, histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için kalvaryum kemikleri alındı.

**4. Grup Emdogain Yerleştirilen Grup (EMD) (n=13):** Bu gruptaki deneklerin kalvaryum kemiklerine genel anestezi altında emdogain ile doldurulan titanyum kubbeler yerleştirildi. Denekler bu işlemi takiben 3 ay boyunca normal diyetle beslendi, 3 aylık deney süresinin sonunda sakrifice edildi, histopatolojik ve immunohistokimyasal inceleme için kalvaryum kemikleri alındı.

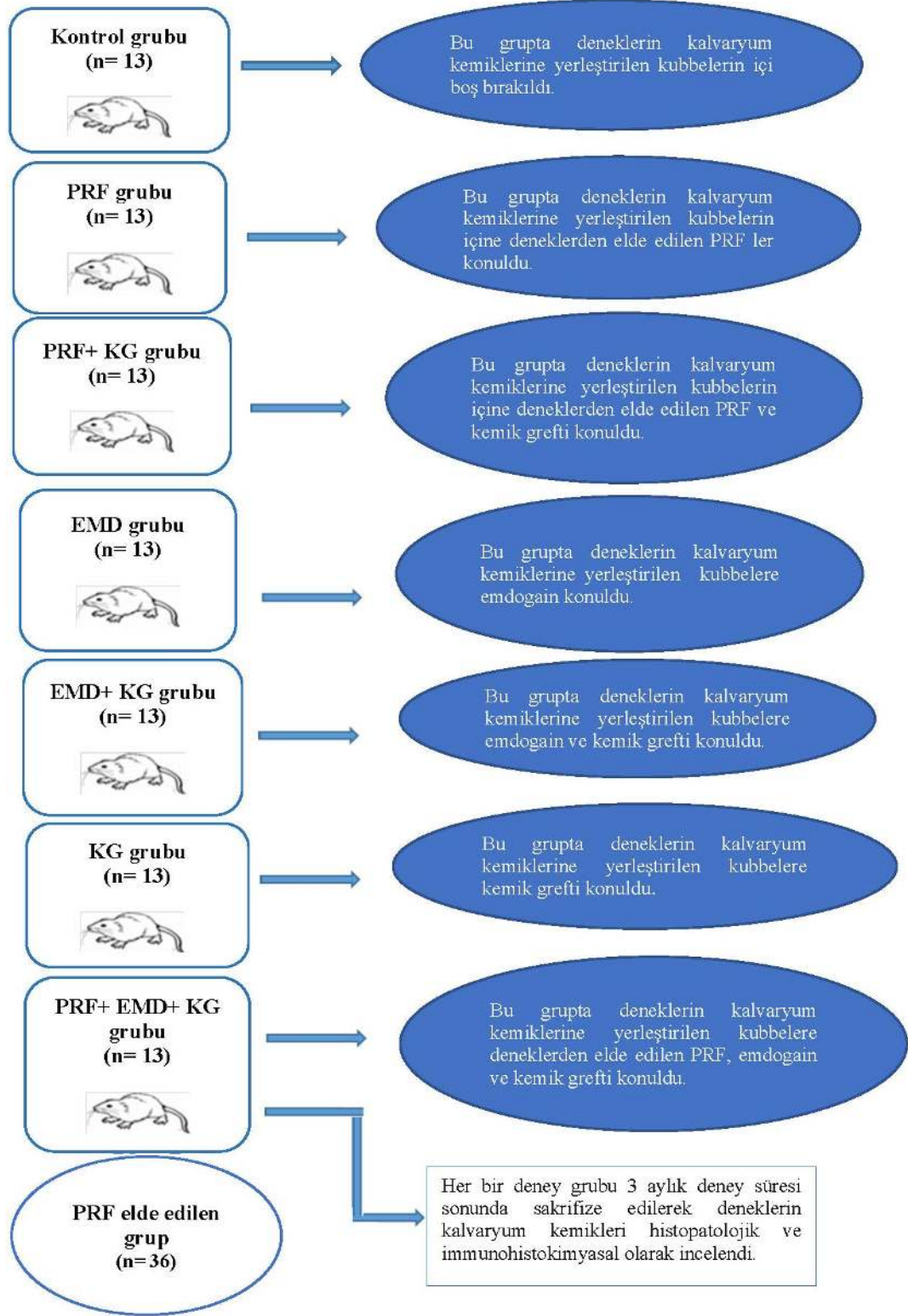
**5. Grup Emdogain ve Kemik Grefti Yerleştirilen Grup (EMD+KG) (n=13):** Bu gruptaki deneklerin kalvaryum kemiklerine genel anestezi altında kemik grefti emdogain ile karıştırılarak doldurulan titanyum kubbeler yerleştirildi. Denekler bu işlemi takiben 3 ay boyunca normal diyetle beslendi, 3 aylık deney süresinin sonunda sakrifice edildi, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için kalvaryum kemikleri alındı.



**6. Grup Kemik Grefti Yerleştirilen Grup (KG) (n=13):** Genel anestezi altında bu gruptaki deneklerin kalvaryum kemiklerine kemik grefti karıştırılıp titanyum kubbeler yerleştirildi. Denekler bu işlemi takiben 3 ay boyunca normal diyetle beslendi, 3 aylık deney süresinin sonunda sakrifice edildi, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için kalvaryum kemikleri alındı.

**7. Grup; PRF, Emdogain ve Kemik Grefti Yerleştirilen Grup (PRF+EMD+KG) (n=13):** Genel anestezi altında bu gruptaki deneklerin kanından PRF elde edilerek emdogain ve kemik grefti ile birlikte karıştırılarak titanyum kubbeler yerleştirildi. Deneklerin kalvaryum kemiklerine bu kubbeler yerleştirildi. Denekler bu işlemi takiben 3 ay boyunca normal diyetle beslendi, 3 aylık deney süresinin sonunda sakrifice edildi, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için kalvaryum kemikleri alındı(173).

PRF elde edilen grup (n=36), genel anestezi altında olan deneklerin kalbinin sol ventrikülünden olacak şekilde kan aspire edilerek uygun miktarda PRF elde edildi (104).

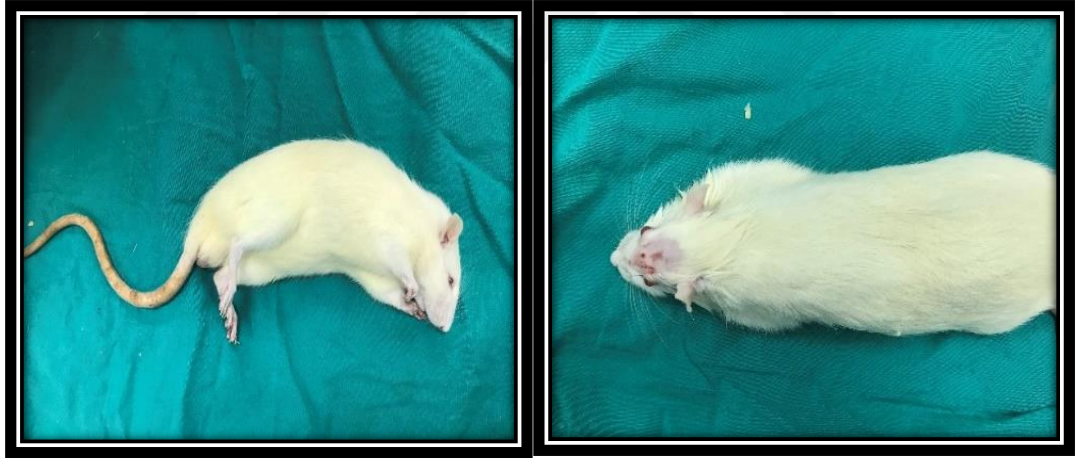


**Şekil 11.** Deneysel çalışma düzeneği

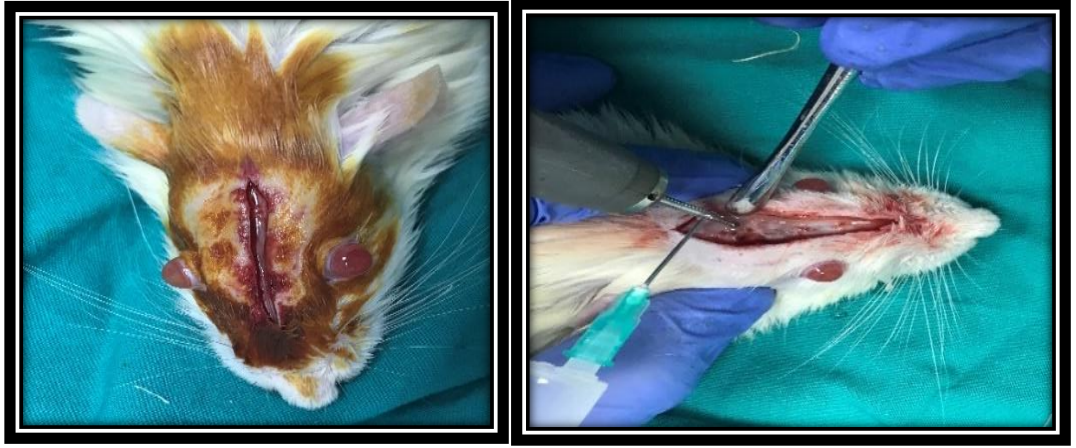
#### 4.1.2. Cerrahi Yöntem

Tüm cerrahi işlemler steril koşullarda genel anestezi altında gerçekleştirildi. Genel anestezikler (10 mg/kg Xylazine®, 40 mg/kg ketamin) deneklere uygun enjektör ile kas içinden ve ilgili bölgede kanama kontrolü sağlamak amacı ile 0,006 mg/ml epinefrin içeren %4 lük artikain 0,5 cc deri altından tek doz şeklinde yapıldı.

Cerrahi işlem uygulanacak alan tıraş edildikten sonra povidone iodine ile yıkandı. Kubbelerin cerrahi yerleştirilmesi aşamasında on beş nolu bistürü ile deneklerin kalvaryum kemiklerindeki linea media üzerinden kesi yapılarak 9 adet 1.5 mm derinliğinde parietal bölgeleri dekortike edilerek kubbe yuvaları oluşturuldu. Kubbe yuvaları açılırken ısınmanın önlenmesi amacıyla cerrahi alan steril serum fizyolojik ile yıkandı (173) (Resim 16, 17).



**Resim 16.** Çalışma için hayvanların anestesizisinden sonra kalvaryum kemiklerinin olduğu baş kısmının tıraş edilmesi ve hazırlanması

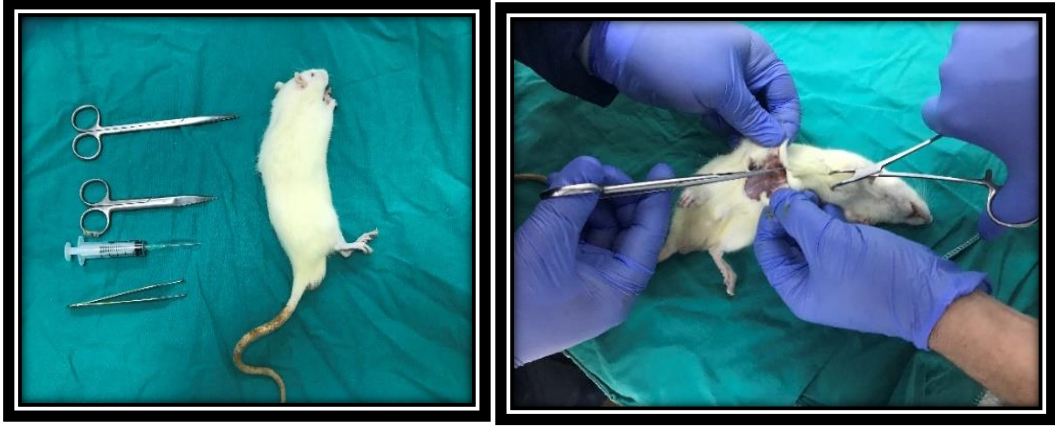


**Resim 17.** Baş kısmının traş edilmesinden sonra hayvanın kalvaryum kemiğinin üzerindeki derinin insizyonu ve serum fizyolojik ile linea media üzerinde 9 adet dekortikasyon kavitesi açılması

#### **4.2. PRF elde edilmesi**

PRF elde edilecek grupta (n=36 ağırlık=250g) 60mg/kg ketamine ve 3 mg/kg Xylazine uygulanarak ratların göğüs kafesleri cerrahi steril makasla açılarak kalbinin sol ventrikül kısmından 5 ml kadar kan aspire edilip, 3000 rpm de 10 dakika kadar santrifüj edilip uygun miktarda PRF elde edildi (Resim 18-21). Antikoagölan içermeyen boş tüpler kullanıldı. Tüpler dengenin sağlanabilmesi için santrifüj cihazında (Nüve NF 200 Santrifüj Cihazı) karşılıklı olarak yerleştirildi. Santrifüj edildikten sonra tüpte, üç bölüme ayrılmış üç katman görünecektir; alt kısım kırmızı kan hücrelerinden oluşur, orta kısım PRF'ten ve üst kısım aselüler plazmadan oluşur. PRF daha sonra izole edildi. Daha sonra PRF, steril makas kullanılarak küçük parçalara kesildi ve PRF gruplarında her bir titanyum kubbeye yerleştirildi (104).





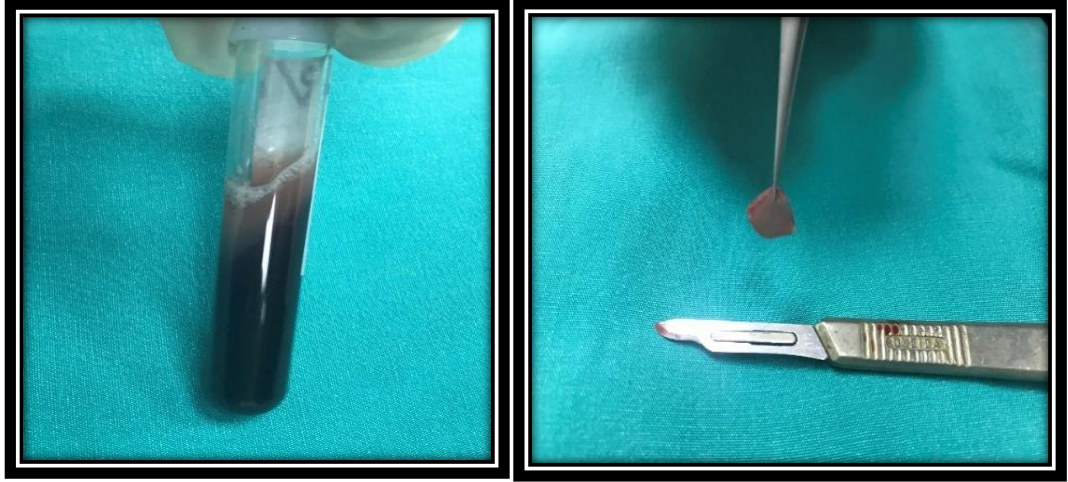
**Resim 18.** Genel anestezi altında olan hayvanlardan PRF elde etmek için açık kalp metoduna göre kan alınması



**Resim 19.** Genel anestezi altında olan hayvanlardan PRF elde etmek için açık kalp metoduna göre kan alınması



**Resim 20.** Hayvanlardan açık kalp metoduna göre alınan kanın 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmesi



**Resim 21.** Kanın santrifüj edilmesinden sonra PRF elde edilmesi

#### **4.3. Defektlerin Titanyum Kubbeler ile Kapatılması**

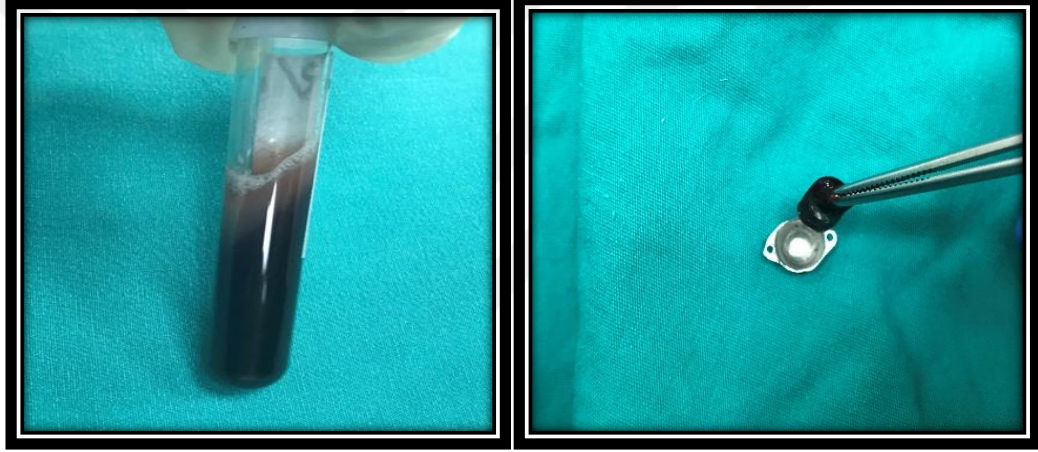
Çalışmada çapı 6 mm, yüksekliği 3 mm olan titanyum kubbe kullanılmıştır (173) (Resim 33). Kubbeler, PRF, EMD (Straumann® Emdogain®, İsveç) ve toplamda 7 cc (2 cc+ 5 cc) sığır kaynaklı ksenogreft (Bioinnovation Bonefill, Türkiye) (KG) ile dolduruldu. Defektler, kubbelerin içine konulan daha önce belirtilen gruplara uyacak şekilde Grup 2 PRF, Grup 3 PRF ve KG, Grup 4 EMD, Grup 5 EMD ve KG, Grup 6 KG ve Grup 7 PRF, EMD ve KG ile olacak şekilde dolduruldu (Resim 22-26).

Titanyum kubbeler kafatasına, doku yapıştırıcısı olan yapışkan N-butil-2 siyanoakrilat (Perioacryl®) kullanılarak sabitlendi (Resim 27). Bu işlem ile aynı zamanda, titanyum bariyerlerin içerisine yumuşak doku invazyonunun da engellenmesi sağlandı. Cilt ve cilt altı dokular 3/0 poliglaktin 910 (Vicryl, Ethicon, ABD) ile dikildi (173).





**Resim 22.** Kubbelerin hazırlanması



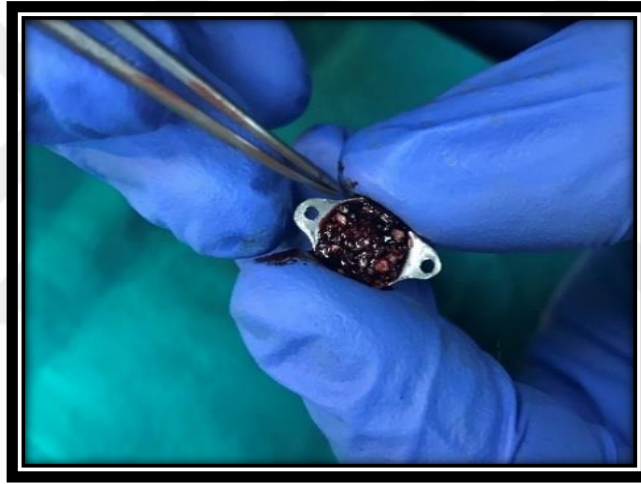
**Resim 23.** Kubbelerin hazırlanan PRF ile doldurulması



**Resim 24.** Kubbelerin Emdogain® Multipack Straumann® ile doldurulması



**Resim 25.** Kubbelerin partikül ksenogreft kemik grefti (Bioinnovation Bonefill Turkey) ile doldurulması



**Resim 26.** Kubbelerin PRF ve KG ile doldurulması



**Resim 27:** Greft materyalleri ile doldurulan kuıbbelerin ratların kalvaryum kemiklerine Perioacryl® ile yerleştirilmesi



Tüm cerrahi işlemlerden sonra enfeksiyon ve ağrının önlenmesi amacıyla antibiyotik (40 mg/kg sefalosporin) ve analjezik (0.1 mg/kg tramadolhidroklorid) intramuskuler yolla 3 gün boyunca uygulandı (173).

#### **4.4. Kemik Örneklerinin Elde Edilmesi**

Cerrahi girişimi takiben denekler 12 haftalık iyileşme döneminin sonunda sakrifiye edildi. Sakrifiye edilmesinin ardından titanyum kubbeler kaldırıldı ve yeni oluşan kemik dokularını içeren kalvarial kemikler histopatolojik ve immünohistokimyasal analizler için toplandı. Çalışma dönemi sonrasında ratların kafatasında bulunan kubbeler çıkarılarak ratların kalvaryum kemikleri histolojik kesit elde etmek amacıyla % 10'luk formalin içerisinde uygun koşullarda muhafaza edildi (173).

#### **4.5. Kesitlerin Hazırlanması**

Kemik dokularının histolojik ve immunohistolojik olarak incelenmesi, Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'nda gerçekleştirildi. Ratların kalvaryumları yeni oluşturulan kemikle birlikte çıkarılarak 72 saat olacak şekilde %10 luk formalin solüsyonunda bekletildi. Daha sonra dokular dekalsifikasyon işlemi için %10'luk formik asit içerisine alındı. Dekalsifikasyon solüsyonu iki günde bir olacak şekilde değiştirildi. Dekalsifikasyon işlemi 1 haftada tamamlandı. Dekalsifikasyon işlemi sonrasında, formik asitin giderilmesi amacıyla dokular akarsuda belli sürede yıkandı. Örnekler rutin takip işlemi sonrası parafin bloklara gömüldü. Hemotoksilen-eozin boyasının yapılması için blok haline getirilen dokulardan mikrotomla (GENBİYO Teknoloji İşleri Labaratuvarı) sagittal düzlemde 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Elde edilen kesitler 65°C'de bir saat deparafinize

edildikten sonra ksilol ve alkolde bekletildikten sonra suda yıkanarak boyama işlemine geçildi. Hemaotoksilen-eozinde boyanan kesitler ışık mikroskobunda (Olympus, BX51, Japan) incelendi.

#### **4.6. Kesitlerin Histopatolojik Açıdan İncelenmesi**

Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilimdalı'nda kemik preparatlarında;

**a) Yeni oluşan kemik miktarı:** Kemik oluşumunu histolojik olarak ölçmek için, katmanlı kemik dokusu oluşumu tespit edildi ve puanlandı. Eski kemiğin aksine lameller kemik dokusunda trabekülasyonlar ve kemik iliği tespit edildi. Kemik oluşumu şu şekilde puanlandı (174):

- 0 → kemik oluşumu yok;
- 1 → hafif görünür kemik oluşumu;
- 2 → orta derecede görünür kemik oluşumu; ve
- 3 → yüksek derecede görünür kemik oluşumu.

**b) Osteoblast:** Osteoblast sayıları, toplam defekt alanında şu şekilde skorlandı (174):

- 0 → osteoblast hücresi yok;
- 1 → hafif görülen osteoblastlar; ve
- 2 → osteoblastlar yoğun olarak görüldü.

**c) Osteoklast:** Osteoklast hücreleri histopatolojik analizde görsel olarak tespit edildi. Osteoklast morfolojisi şu şekilde puanlandı (174):

- 0 → osteoklast yok;
- 1 → hafif osteoklastlar; ve
- 2 → yoğun osteoklastlar görüldü.

#### **d) Fibrozis Skorlaması;**

- 0 → yok

- 1 → hafif yoğunlukta
- 2 → orta yoğunlukta
- 3 → şiddetli yoğunlukta görüldü (175).

**e) Anjiogenezis Skorlaması;**

- 0 → artış yok
- 1 → hafif derecede artış
- 2 → orta derecede artış
- 3 → şiddetli artış görüldü (176).

#### **4.7. İmmunohistokimyasal İnceleme**

Ratların kalvaryum kemik dokusunda OPG ve RANKL immüno-reaktivitelerini belirlemek için bir avidin-biyotin-peroksidaz kompleksine ait prosedür uygulandı. Poli L lizin ile 5 µm kalınlığında doku kesitleri hazırlandı. Parafinden arındırılmış kesitler Ventana XT otomatik boyama cihazında 1/200 seyreltilmiş primer antikorlar (OPG (sc-11383) Rat Poliklonal IgG Antikorları ve RANKL (sc-9073), Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California, ABD) ile boyandı. Boyanan kesitlerdeki dokular ışık mikroskobu (Olympus, BX51-Japonya) ile incelendi. İmmunohistokimyasal analiz için skorlama boyamanın yoğunluğu esas alınarak oluşturuldu. Yoğunluk (0: yok, +0.5: çok az yoğun, +1: az yoğun, +2: orta yoğunlukta, +3: şiddetli yoğunlukta) olacak şekilde skorlandı (177).

Tüm histolojik örneklerin görüntüleri, orijinal büyütme bir ışık mikroskobuna bağlanan bir dijital kamera ile yakalandı ve bir bilgisayara kaydedildi. Histopatolojik analiz için Olympus görüntüleme sistemi (Olympus Bx51, Işık Mikroskobu; Olympus DP71, Görüntüleme Sistemi; Olympus, Tokyo, Japonya) kullanıldı (174).

#### 4.8. İstatistiksel İncelemeler

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirildi. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında Ki-Kare testi ve Fisher Freeman Halton testi kullanıldı. Gruplar arası OPG/RANKL düzeyi karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi kullanıldı. Anlamlılık  $p<0.05$  düzeyinde değerlendirildi.

## 5. BULGULAR

Çalışma 13'ü (%7,7) Kontrol, 13'ü (%7,7) PRF, 13'ü (%7,7) PRF+KG, 13'ü (%7,7) EMD, 13'ü (%7,7) EMD+KG, 13'ü KG (%7,7) ve 13'ü PRF+EMD+KG (%7,7) olmak üzere toplam 7 grup altında incelenmiştir.

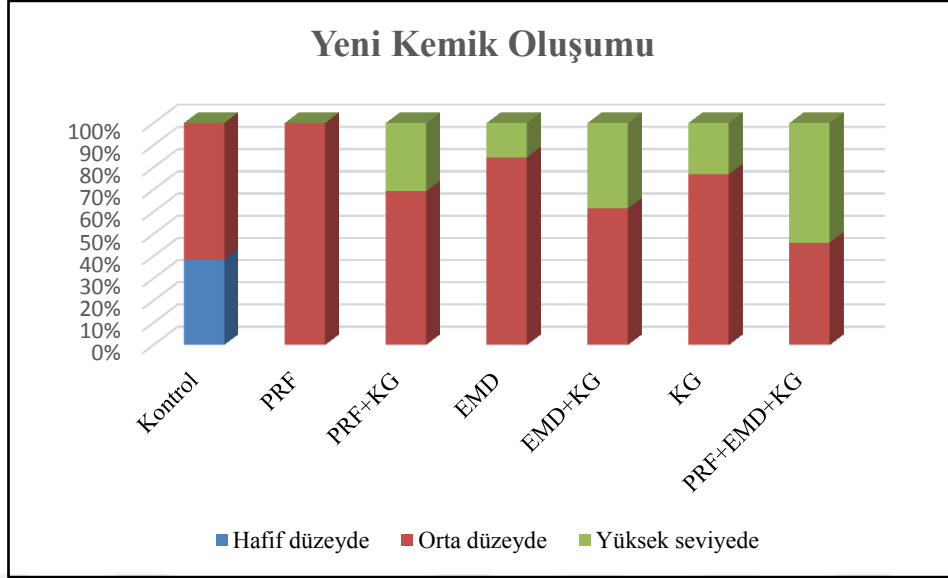
### 5.1.Yeni Kemik Oluşumu

Gruplar arasında yeni kemik oluşumu düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ( $p:0.000$ ;  $p<0.05$ ). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespiti için yapılan değerlendirmeler sonucunda; Grup 1'de (Kontrol) hafif kemik oluşumu görülme oranı, Grup 2 (PRF), Grup 3 (PRF+KG), Grup 4 (EMD), Grup 5 (EMD+KG), Grup 6 (KG) ve Grup 7'den (PRF+EMD+KG) anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p_1:0.047$ ,  $p_2:0.024$ ;  $p_3:0.016$ ;  $p_4:0.011$ ;  $p_5:0.007$ ;  $p_6:0.002$ ;  $p<0.05$ ). Grup 2'de orta düzeyde kemik oluşumu görülme oranı, Grup 3, Grup 5 ve Grup 7'den anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p_1:0.030$ ,  $p_2:0.039$ ;  $p_3:0.005$ ;  $p<0.05$ ). Grup 4'te orta düzeyde kemik oluşumu görülme oranı, Grup 7'den anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur ( $p_1:0.039$ ,  $p<0.05$ ). Diğer gruplar arasında yeni kemik oluşumu düzeyleri açısından anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ) (Tablo 2-Şekil 12).

**Tablo 2.** Grupların yeni kemik oluşumu düzeyleri açısından değerlendirilmesi

|                           | Kontrol<br>(n=13)<br>n (%) | PRF<br>(n=13)<br>n (%) | PRF+KG (n=13)<br>n (%) | EMD (n=13)<br>n (%) | EMD+KG<br>(n=13)<br>n (%) | KG<br>(n=13)<br>n (%) | PRF+EMD+KG<br>(n=13)<br>n (%) | p     |
|---------------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|---------------------|---------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------|
| <b>Yeni kemik oluşumu</b> |                            |                        |                        |                     |                           |                       |                               |       |
| Hafif düzeyde             | 5<br>(%38,5)               | 0<br>(%0)              | 0<br>(%0)              | 0<br>(%0)           | 0<br>(%0)                 | 0<br>(%0)             | 0<br>(%0)                     | 0,00* |
| Orta düzeyde              | 8<br>(%61,5)               | 13<br>(%100)           | 9<br>(%69,2)           | 11<br>(%84,6)       | 8<br>(%61,5)              | 10<br>(%76,9)         | 6<br>(%46,2)                  |       |
| Yüksek seviyede           | 0<br>(%0)                  | 0<br>(%0)              | 4<br>(%30,8)           | 2<br>(%15,4)        | 5<br>(%38,5)              | 3<br>(%23,1)          | 7<br>(%53,8)                  |       |

Ki-kare test \* $p<0.05$



**Şekil 12.** Gruplarda yeni kemik oluşumunun grafik şeklinde gösterilmesi

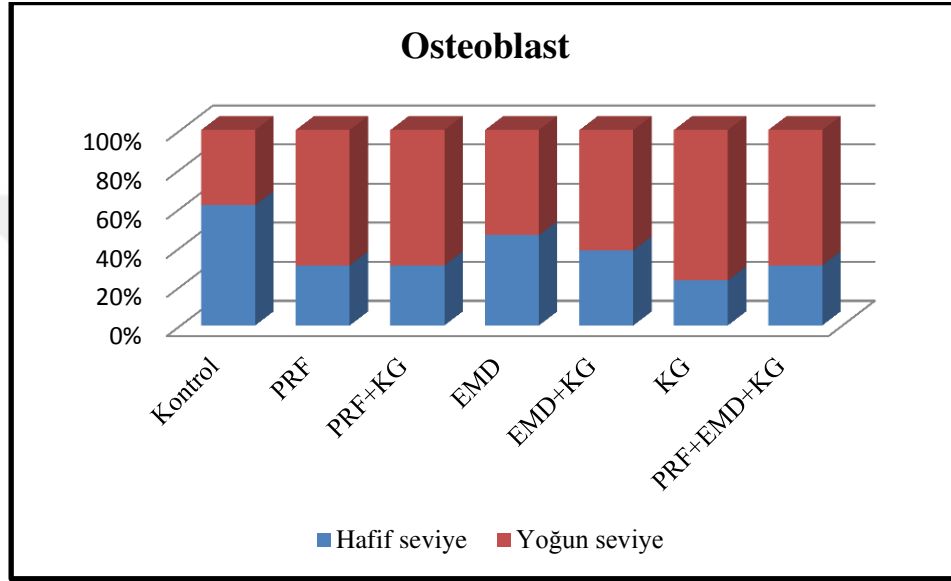
## 5.2. Osteoblast Düzeyleri

Gruplar arasında osteoblast düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p:0.526$ ;  $p>0.05$ ). Grup 1'in (Kontrol) %38.5'inde, Grup 2'nin (PRF) %69.2'sinde, Grup 3'ün (PRF+KG) %69.2'sinde, Grup 4'ün (EMD) %53.8'inde, Grup 5'in (EMD+KG) %61.5'inde, Grup 6'nın (KG) %76.9'unda ve Grup 7'nin (PRF+EMD+KG) %69.2'sinde yoğun seviye osteoblast oluşumu görülmüştür (Tablo 3-Şekil 13).

**Tablo 3.** Grupların osteoblast düzeyleri açısından değerlendirilmesi

|              | Kontrol (n=13) | PRF (n=13)   | PRF+KG (n=13) | EMD (n=13)   | EMD+KG (n=13) | KG (n=13)     | PRF+EMD+KG (n=13) | P     |
|--------------|----------------|--------------|---------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|-------|
| Osteoblast   | n (%)          | n (%)        | n (%)         | n (%)        | n (%)         | n (%)         | n (%)             |       |
| Hafif seviye | 8<br>(%61,5)   | 4<br>(%30,8) | 4<br>(%30,8)  | 6<br>(%46,2) | 5<br>(%38,5)  | 3<br>(%23,1)  | 4<br>(%30,8)      | 0,526 |
| Yoğun seviye | 5<br>(%38,5)   | 9<br>(%69,2) | 9<br>(%69,2)  | 7<br>(%53,8) | 8<br>(%61,5)  | 10<br>(%76,9) | 9<br>(%69,2)      |       |

*Fisher Freeman Halton test*



**Şekil 13.** Gruplarda osteoblast düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi

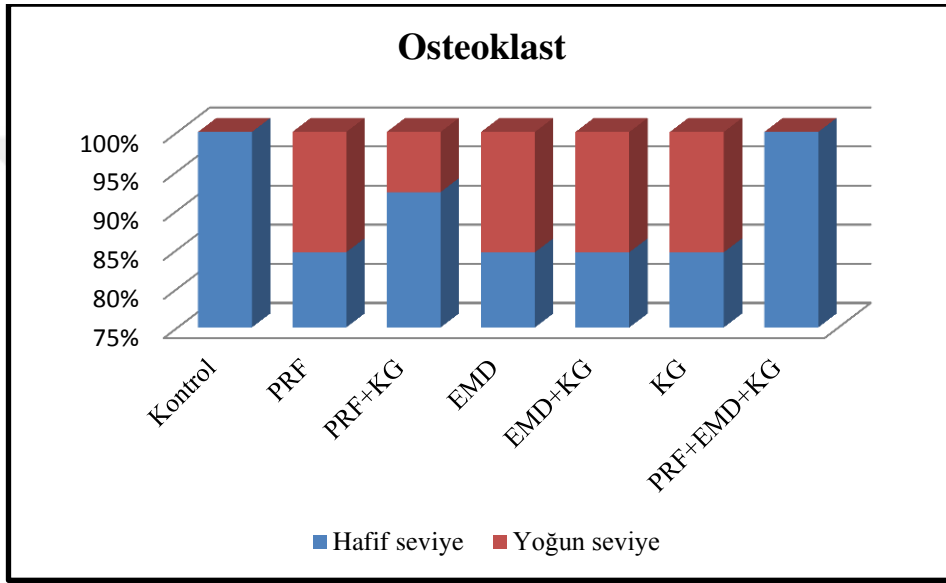
### 5.3. Osteoklast Düzeyleri

Gruplar arasında osteoklast düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p:0.570$ ;  $p>0.05$ ). Grup 1'in (Kontrol) %100'ünde, Grup 2'nin (PRF) %84.6'sında, Grup 3'ün (PRF+KG) %92.3'ünde, Grup 4'ün (EMD) %84.6'sında, Grup 5'in (EMD+KG) %84.6'sında, Grup 6'nın (KG) %84.6'sında ve Grup 7'nin (PRF+EMD+KG) %100'ünde hafif seviye osteoklast oluşumu görülmüştür (Tablo 4-Şekil 14).

**Tablo 4.** Grupların osteoklast düzeyleri açısından değerlendirilmesi

|                 | Kontrol<br>(n=13) | PRF<br>n=13 | PRF+KG<br>(n=13) | EMD<br>(n=13) | EMD+KG<br>(n=13) | KG<br>(n=13) | PRF+EMD+K<br>G<br>(n=13) | P     |
|-----------------|-------------------|-------------|------------------|---------------|------------------|--------------|--------------------------|-------|
| Osteoklast      | n (%)             | n (%)       | n (%)            | n (%)         | n (%)            | n (%)        | n (%)                    |       |
| Hafif seviye    | 13<br>%100        | 11<br>%84,6 | 12<br>%92,3      | 11<br>%84,6   | 11<br>%84,6      | 11<br>%84,6  | 13<br>%100               | 0,570 |
| Yoğun<br>seviye | 0<br>%0           | 2<br>%15,4  | 1<br>%7,7        | 2<br>%15,4    | 2<br>%15,4       | 2<br>%15,4   | 0<br>%0                  |       |

*Fisher Freeman Halton test*



**Şekil 14.** Grupların osteoklast düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi

#### 5.4.Fibrozis

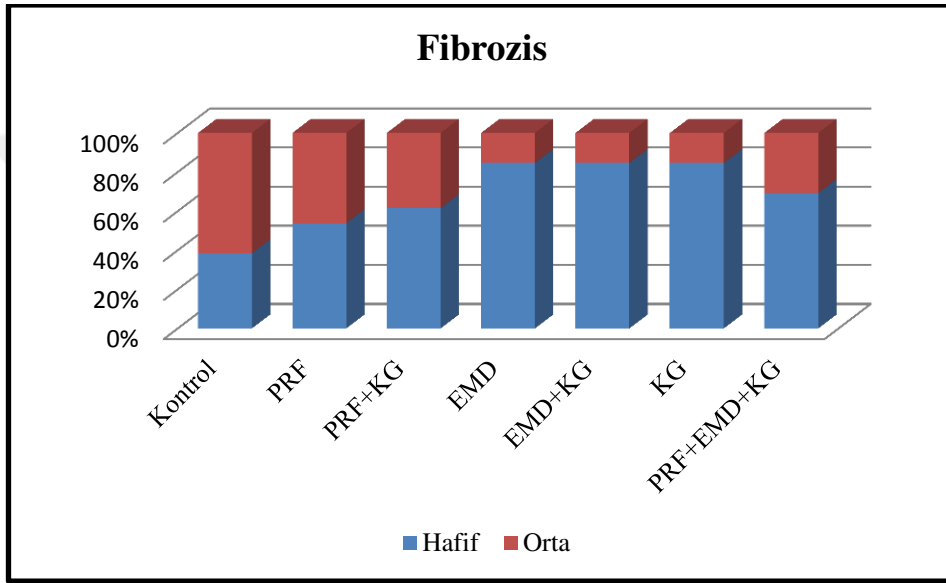
Gruplar arasında fibrozis düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p:0.081$ ;  $p>0.05$ ). Grup 1'in (Kontrol) %61.5'inde, Grup 2'nin (PRF) %46.2'sinde, Grup 3'ün (PRF+KG) %38.5'inde, Grup 4'ün (EMD) %15.4'ünde, Grup 5'in (EMD+KG) %15.4'ünde, Grup 6'nın (KG) %15.4'ünde ve Grup 7'nin (PRF+EMD+KG) %30.8'inde orta seviye fibrozis oluşumu görülmüştür (Tablo 5-Şekil 15).



**Tablo 5.** Grupların fibrozis düzeyleri açısından değerlendirilmesi

|          | Kontrol (n=13) | PRF<br>(n=13) | PRF+KG<br>(n=13) | EMD<br>(n=13) | EMD+KG<br>(n=13) | KG<br>(n=13)  | PRF+EMD+KG<br>(n=13) |       |
|----------|----------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|----------------------|-------|
| Fibrozis | n (%)          | n (%)         | n (%)            | n (%)         | n (%)            | n (%)         | n (%)                | P     |
| Hafif    | 5<br>(%38,5)   | 7<br>(%53,8)  | 8<br>(%61,5)     | 11<br>(%84,6) | 11<br>(%84,6)    | 11<br>(%84,6) | 9<br>(%69,2)         | 0,081 |
| Orta     | 8<br>(%61,5)   | 6<br>(%46,2)  | 5<br>(%38,5)     | 2<br>(%15,4)  | 2<br>(%15,4)     | 2<br>(%15,4)  | 4<br>(%30,8)         |       |

*Fisher Freeman Halton test*



**Şekil 15.** Gruplarda fibrozis düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi

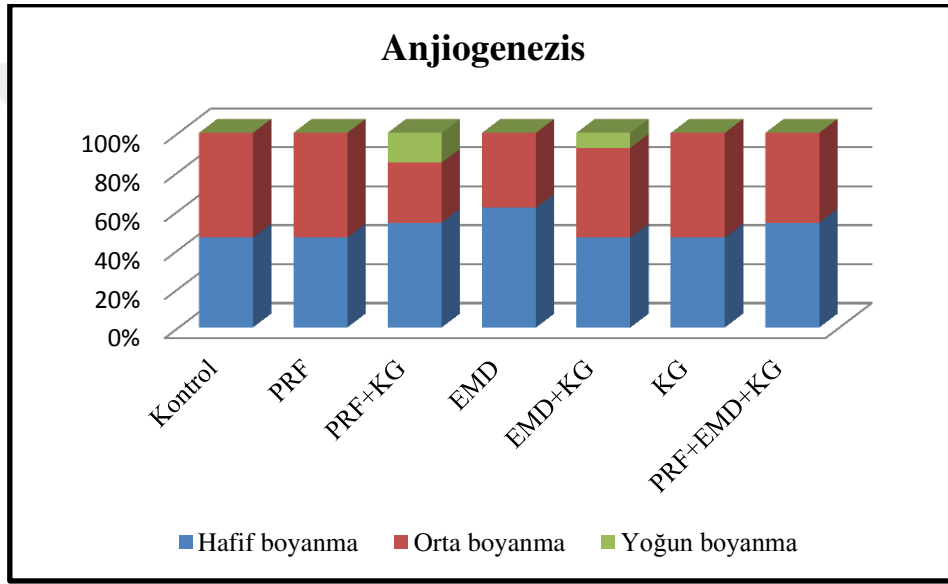
### 5.5. Anjiogenezis

Gruplar arasında anjiogenezis boyanma düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p:0.567$ ;  $p>0.05$ ). Grup 1'in (Kontrol) %53.8'inde, Grup 2'nin (PRF) %53.8'inde, Grup 3'ün (PRF+KG) %30.8'inde, Grup 4'ün (EMD) %38.5'inde, Grup 5'in (EMD+KG) %46.2'sinde Grup 6'nın (KG) %53.8'inde ve Grup 7'nin (PRF+EMD+KG) %46.2'sinde orta boyanma görülmüştür (Tablo 6-Şekil 16).

**Tablo 6.** Grupların anjiogenezis düzeyleri açısından değerlendirilmesi

|                  | Kontrol<br>(n=13) | PRF<br>(n=13) | PRF+KG<br>(n=13) | EMD<br>(n=13) | EMD+KG<br>(n=13) | KG<br>(n=13) | PRF+EMD+<br>KG<br>(n=13) | P     |
|------------------|-------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|--------------|--------------------------|-------|
| Anjiogenezis     | n (%)             | n (%)         | n (%)            | n (%)         | n (%)            | n (%)        | n (%)                    |       |
| Hafif boyanma    | 6<br>(%46,2)      | 6<br>(%46,2)  | 7<br>(%53,8)     | 8<br>(%61,5)  | 6<br>(%46,2)     | 6<br>(%46,2) | 7<br>(%53,8)             | 0,567 |
| Orta boyanma     | 7<br>(%53,8)      | 7<br>(%53,8)  | 4<br>(%30,8)     | 5<br>(%38,5)  | 6<br>(%46,2)     | 7<br>(%53,8) | 6<br>(%46,2)             |       |
| Yoğun<br>boyanma | 0<br>(%0)         | 0<br>(%0)     | 2<br>(%15,4)     | 0<br>(%0)     | 1<br>(%7,7)      | 0<br>(%0)    | 0<br>(%0)                |       |

*Ki-kare test*



**Şekil 16.** Gruplarda anjiogenezis düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi

## 5.6. OPG

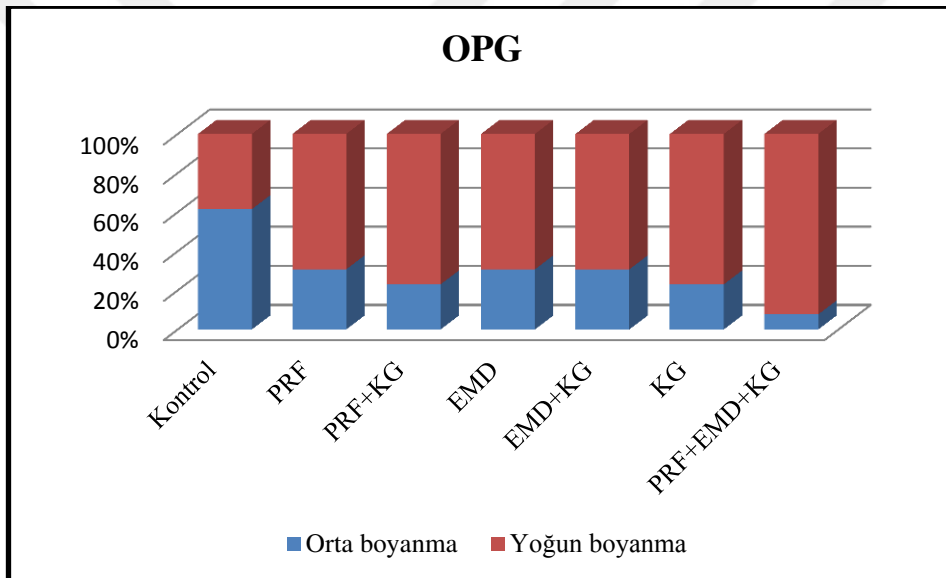
Gruplar arasında OPG boyanma düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p:0.147$ ;  $p>0.05$ ). Grup 1'in (Kontrol) %38.5'inde, Grup 2'nin (PRF) %69.2'sinde, Grup 3'ün (PRF+KG) %76.9'unda, Grup 4'ün (EMD) %69.2'sinde, Grup 5'in (EMD+KG) %69.2'sinde, Grup 6'nın (KG) %76.9'unda ve Grup 7'nin (PRF+EMD+KG) %92.3'ünde yoğun boyanma görülmüştür. Farklılık anlamlı

bulunmamakla birlikte en düşük boyanmanın Grup 1’de, en yüksek boyanmanın Grup 7’de olması dikkat çekicidir (Tablo 7-Şekil 17).

**Tablo 7.** Grupların OPG düzeyleri açısından değerlendirilmesi

|               | Kontrol<br>(n=13) | PRF<br>(n=13) | PRF+KG<br>(n=13) | EMD<br>(n=13) | EMD+KG<br>(n=13) | KG<br>(n=13)  | PRF+EMD+KG<br>(n=13) |       |
|---------------|-------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|----------------------|-------|
| OPG           | n (%)             | n (%)         | n (%)            | n (%)         | n (%)            | n (%)         | n (%)                | P     |
| Orta boyanma  | 8<br>(%61,5)      | 4<br>(%30,8)  | 3<br>(%23,1)     | 4<br>(%30,8)  | 4<br>(%30,8)     | 3<br>(%23,1)  | 1<br>(%7,7)          | 0,147 |
| Yoğun boyanma | 5<br>(%38,5)      | 9<br>(%69,2)  | 10<br>(%76,9)    | 9<br>(%69,2)  | 9<br>(%69,2)     | 10<br>(%76,9) | 12<br>(%92,3)        |       |

*Fisher Freeman Halton test*



**Şekil 17.** Gruplarda OPG düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi

### 5.7. RANKL

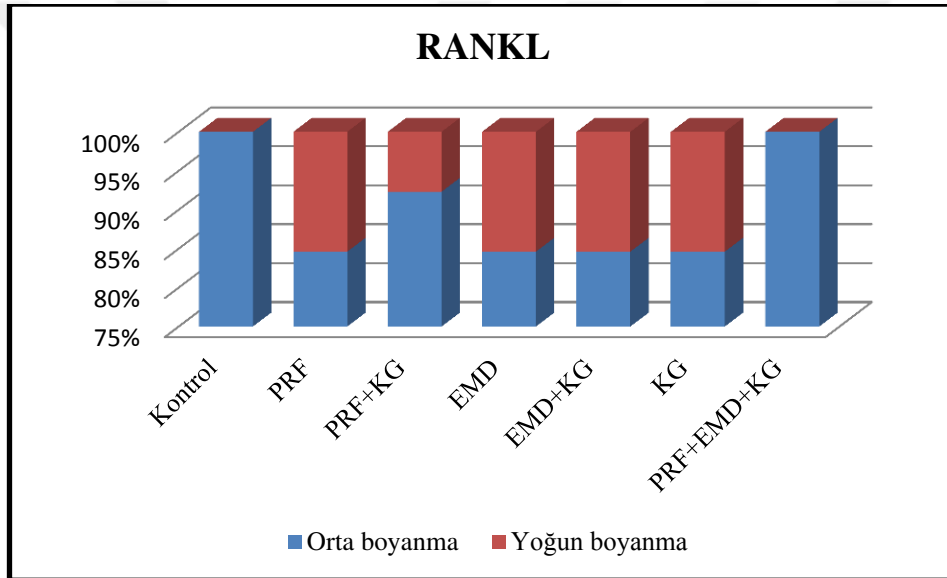
Gruplar arasında RANKL boyanma düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p:0.570$ ;  $p>0.05$ ). Grup 1’in (Kontrol) %100’ünde, Grup 2’nin (PRF) %84.6’sında, Grup 3’ün (PRF+KG) %92.3’ünde, Grup 4’ün (EMD) %84.6’sında, Grup 5’in

(EMD+KG) %84.6'sında, Grup 6'nın (KG) %84.6'sında ve Grup 7'nin (PRF+EMD+KG) %100'ünde orta boyanma görülmüştür (Tablo 8-Şekil 18).

**Tablo 8.** Grupların RANKL düzeyleri açısından değerlendirilmesi

|               | Kontrol<br>(n=13) | PRF<br>(n=13) | PRF+KG<br>(n=13) | EMD<br>(n=13) | EMD+KG<br>(n=13) | KG<br>(n=13)  | PRF+EMD+KG<br>(n=13) | P     |
|---------------|-------------------|---------------|------------------|---------------|------------------|---------------|----------------------|-------|
| RANKL         | n (%)             | n (%)         | n (%)            | n (%)         | n (%)            | n (%)         | n (%)                |       |
| Orta boyanma  | 13<br>(%100)      | 11<br>(%84,6) | 12<br>(%92,3)    | 11<br>(%84,6) | 11<br>(%84,6)    | 11<br>(%84,6) | 13<br>(%100)         | 0,570 |
| Yoğun boyanma | 0<br>(%0)         | 2<br>(%15,4)  | 1<br>(%7,7)      | 2<br>(%15,4)  | 2<br>(%15,4)     | 2<br>(%15,4)  | 0<br>(%0)            |       |

*Fisher Freeman Halton test*



**Şekil 18:** Gruplarda RANKL düzeylerinin grafik şeklinde gösterilmesi

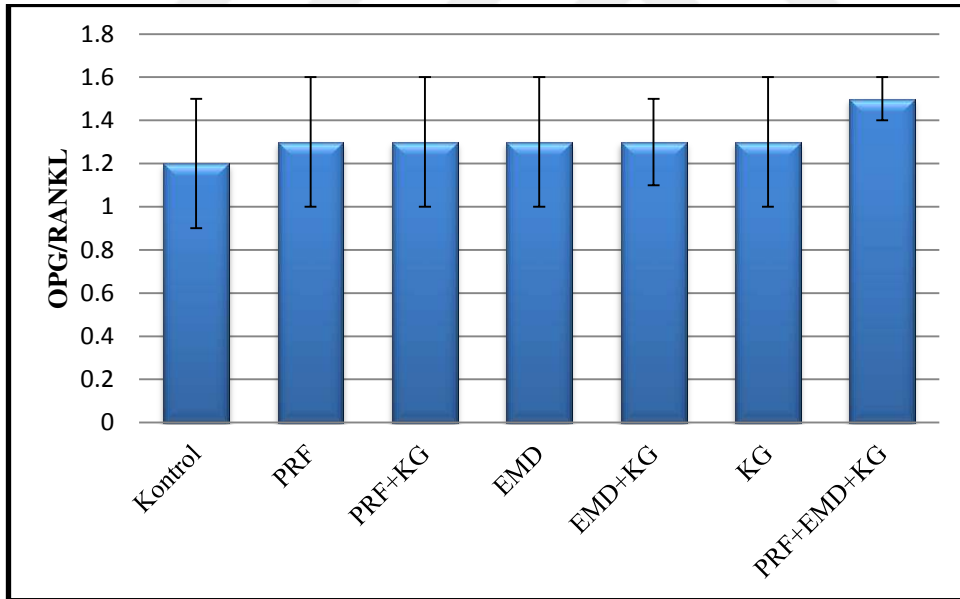
### 5.8. OPG/RANKL Düzeyi

Gruplar arasında OPG/RANKL düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ) (Tablo 9-Şekil 19).

**Tablo 9.** Grupların OPG/RANKL düzeylerinin değerlendirilmesi

| OPG/RANKL  | Minimum | Maksimum | Ort±SS  | Medyan |
|------------|---------|----------|---------|--------|
| Kontrol    | 1       | 1,5      | 1,2±0,3 | 1,0    |
| PRF        | 1       | 1,5      | 1,3±0,3 | 1,5    |
| PRF+KG     | 1       | 1,5      | 1,3±0,2 | 1,5    |
| EMD        | 1       | 1,5      | 1,3±0,3 | 1,5    |
| EMD+KG     | 1       | 1,5      | 1,3±0,3 | 1,5    |
| KG         | 1       | 1,5      | 1,3±0,3 | 1,5    |
| PRF+EMD+KG | 1       | 1,5      | 1,5±0,1 | 1,5    |
| P          | 0,164   |          |         |        |

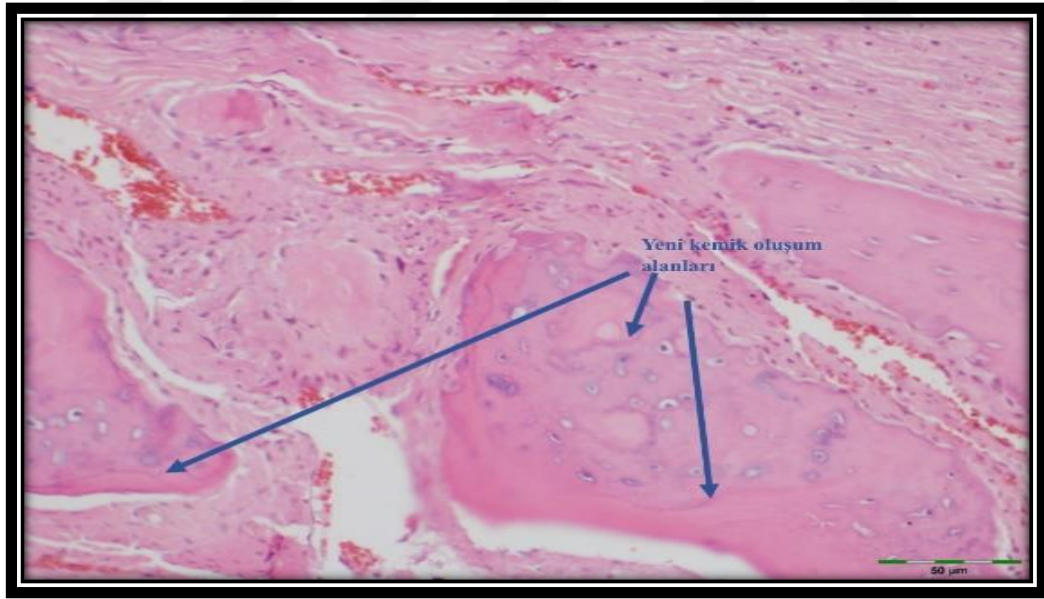
*Kruskal Wallis Test*



**Şekil 19.** Gruplarda OPG/ RANKL oranlarının grafik şeklinde gösterilmesi



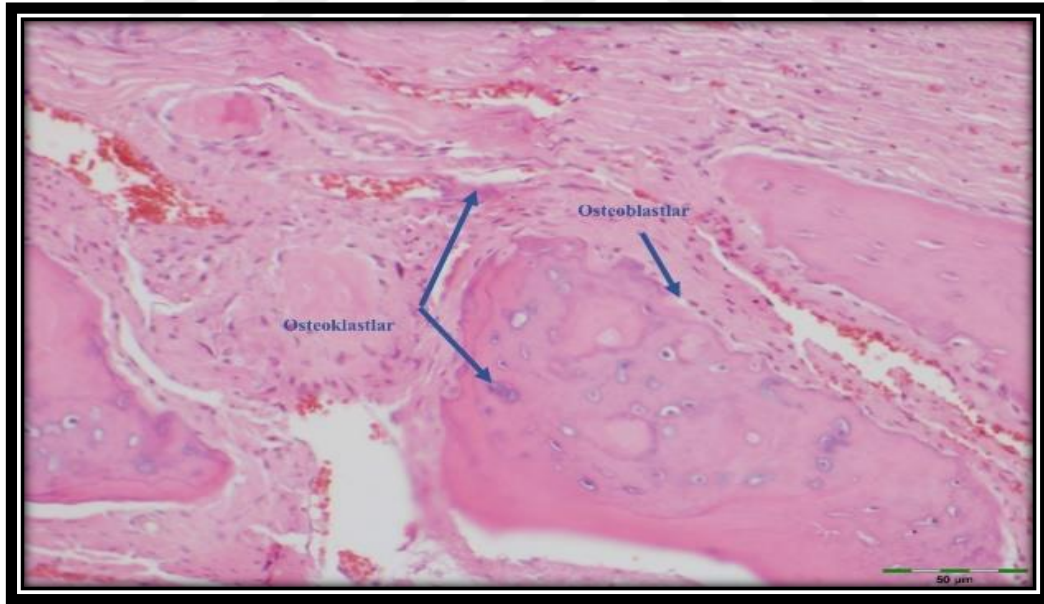
**Resim 27.** Kontrol grubunda hafif derecede yeni kemik oluşumunda histolojik görünüm (Hemtoksilen eozin 20x büyütme)



**Resim 28.** Emdogain grubunda orta derece yeni kemik oluşumunda histolojik görünüm (Hemotoksilen eozin 20x büyütme)



**Resim 29.** PRF+ EMD+ KG grubunda yüksek seviye yeni kemik oluşumunda histolojik görünüm (Hematoksilen eosin x20 büyütme)

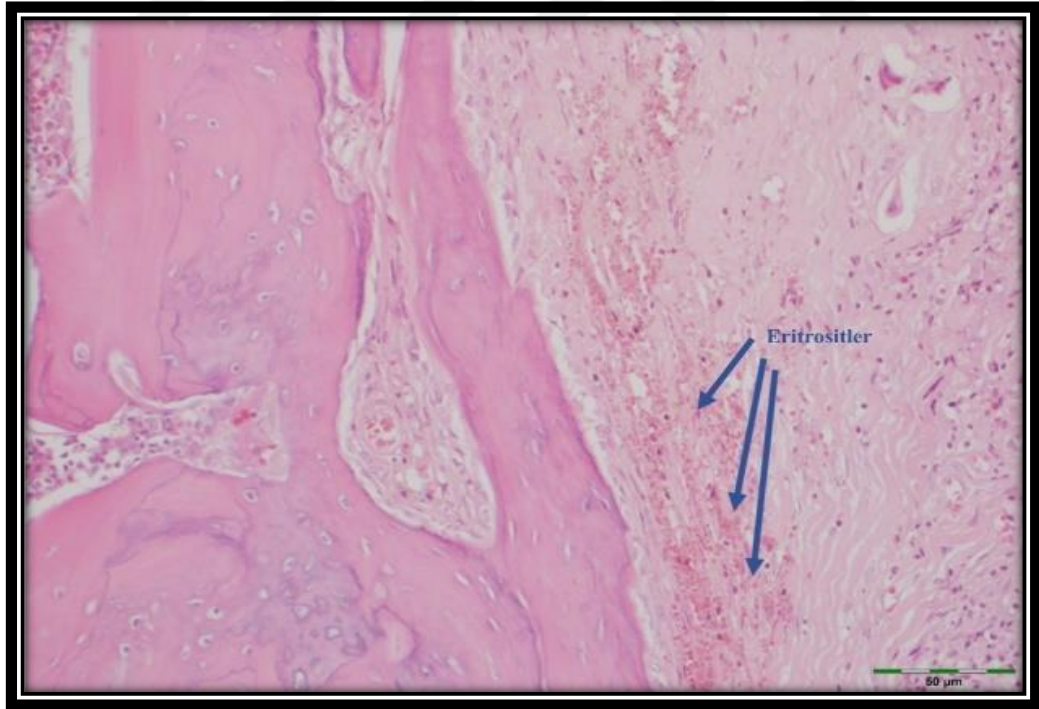


**Resim 30.** KG grubunda yoğun seviyede osteoblast- osteoklast hücreleri histolojik görünüm (Hematoksilen eozin 20x büyütme)





**Resim 31:** Kontrol grubunda görülen orta seviye fibrozis alanı histolojik görünüm(Hematoksilen eozin 20x büyütme)

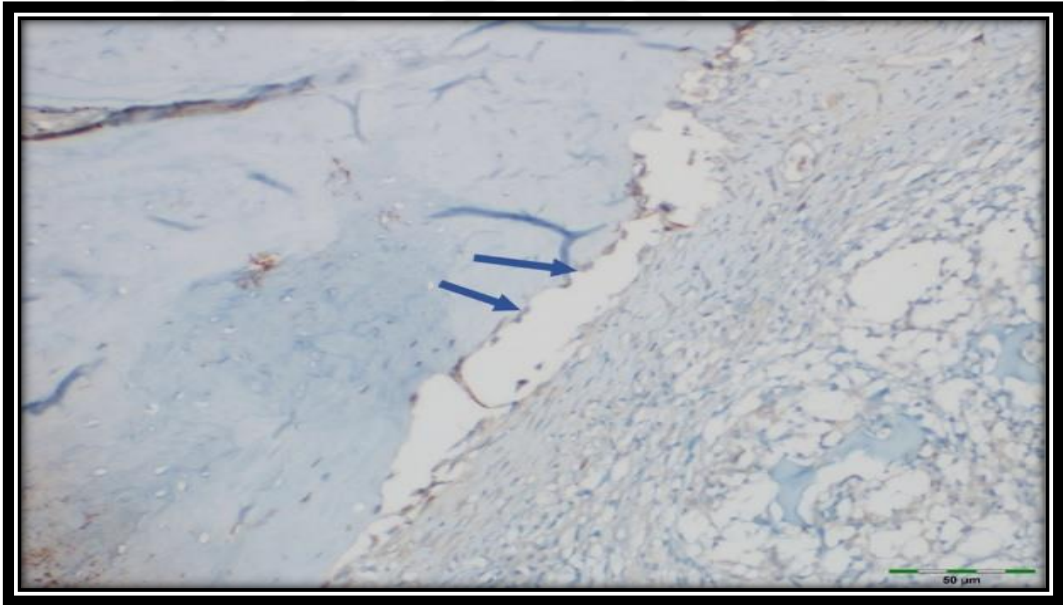


**Resim 32:** PRF+ KG grubunda görülen yoğun seviye anjiogenezis alanları histolojik görünüm (Hematoksilen eozin 20x büyütme)

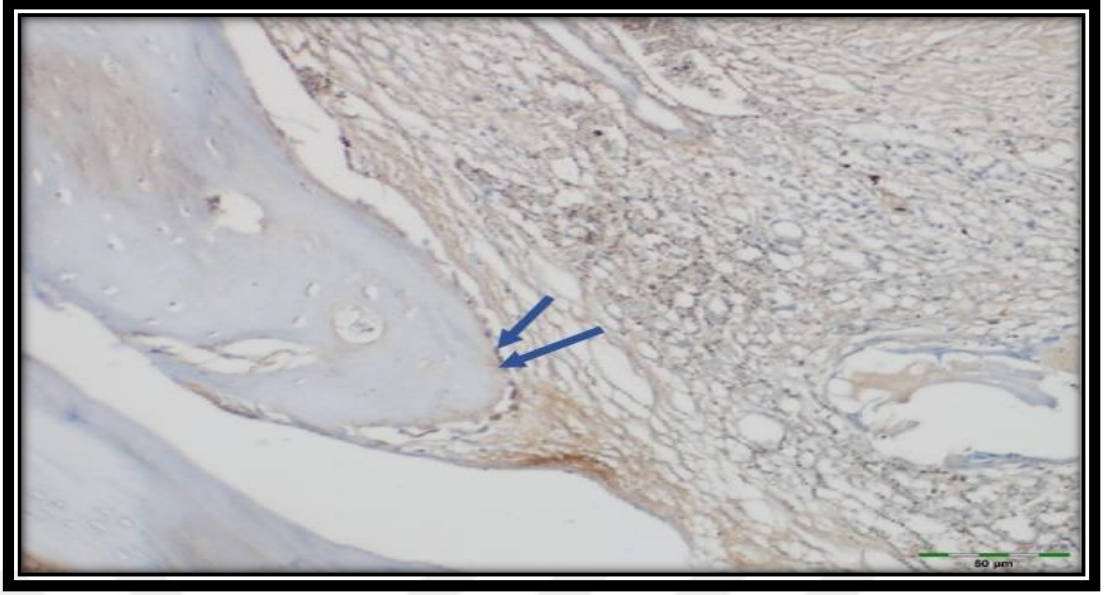




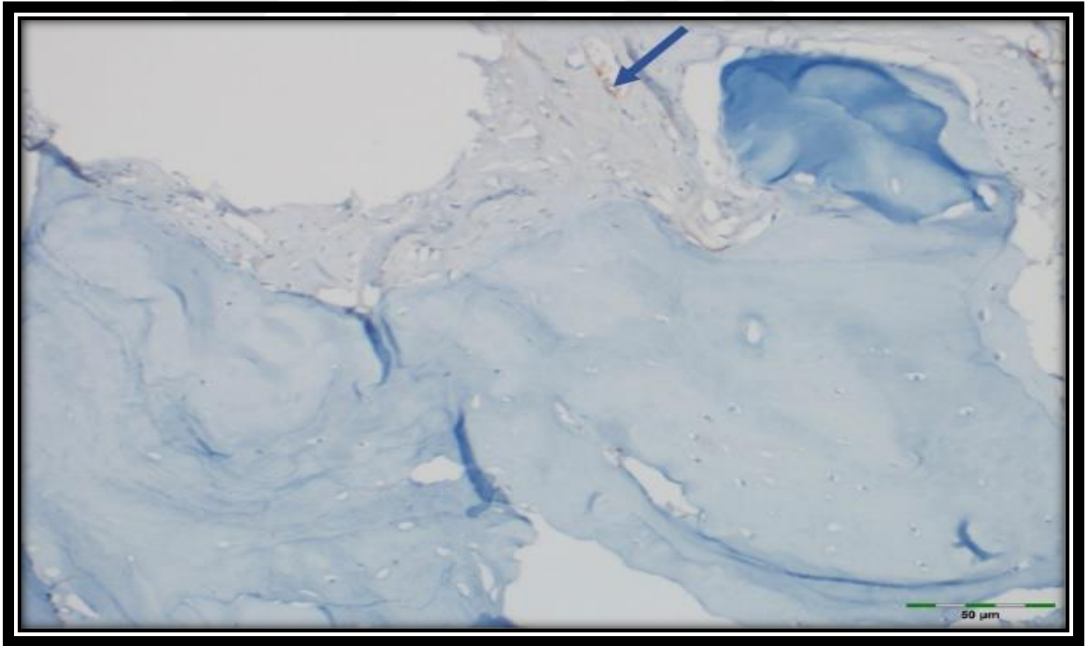
**Resim 33:** PRF grubunda görülen orta seviye OPG boyanma ile osteoblastların immunohistolojik görünümü (OPG boyama 20x büyütme)



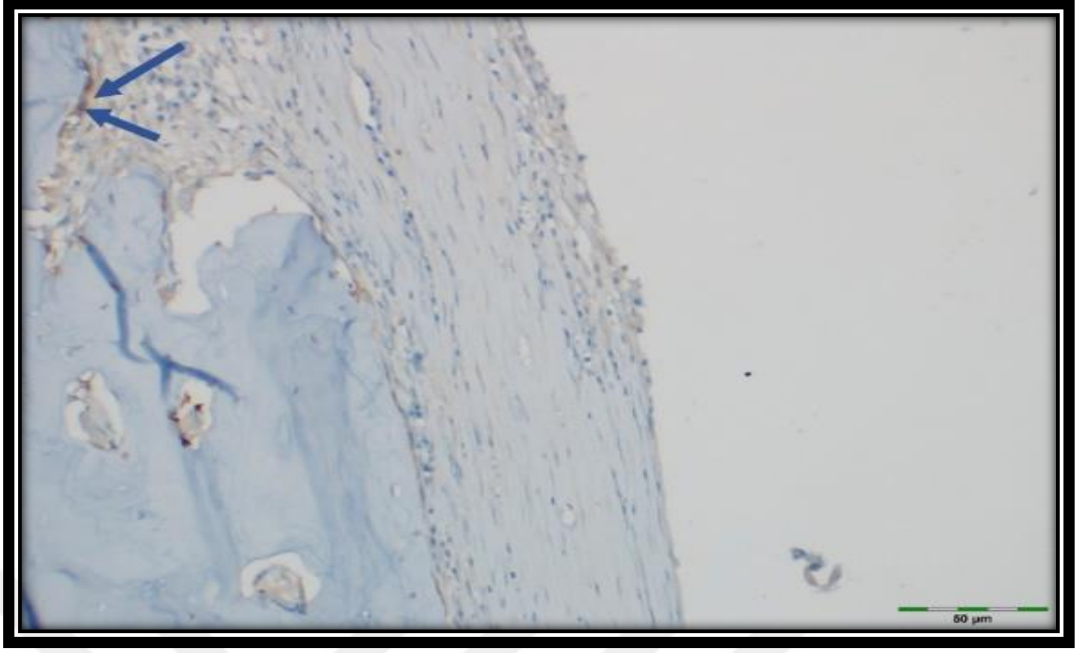
**Resim 34.** EMD grubunda görülen orta seviye OPG boyaması ile osteoblastların immunohistolojik görünümü (OPG boyama 20x büyütme)



**Resim 35.** PRF+KG grubunda görülen yoğun seviye OPG boyaması ile osteoblastların immunohistolojik görünümü (OPG boyama 20x büyütme)



**Resim 36.** Kontrol grubunda görülen orta seviye RANKL boyanması ile osteoklastların immunohistolojik görünümü (RANKL boyama 40x büyütme)



**Resim 37.** KG grubunda görülen yoğun seviye RANKL boyaması ile osteoklastların immunohistolojik görünümü (RANKL boyama 40x büyütme)

## 6. TARTIŞMA

Kemik, vücuda yapısal sertlik ve desteklik sağlamadaki rolünün yanı sıra, kök hücre bakımından önemli rol oynayan ve kanın tüm hücresel bileşenlerini oluşturan kemik iliğini içerir. Hematopoez, kök hücreler tarafından kemik iliğinde meydana gelir. Kemik iliğinde, kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücreler, adipositler, vasküler endotelyal hücreler, osteoblastlar, osteositler ve osteoklastlar bulunur (75).

Kemik defektleri, kemiğin bir kısmının travma, enfeksiyon, periodontal hastalık, tümör rezeksiyonu gibi nedenlerle hasar gördüğü ve kemik grefti gibi biyomateriyaller ile onarılması gereken ciddi durumlardır. Kemik defektlerini onarmak, yeni mineralize kemik matriksi üretmek ve bölgeyi vaskülerize etmek için bölgedeki hücrelere sinyal gönderen yapılar mevcuttur. Bu yapılar genellikle doğal kemik yapısını kopyalayabilen, biyo-uyumlu bir yapı iskeletinden, defekt alanını doldurabilen, yeni kemik oluşturabilen osteoblastlar, osteojenik hücreler ve BMP gibi büyüme faktörlerinden oluşur (178).

Rejenerasyon, kaybedilen dokuların asıl yapısını ve işlevini tamamen restore edilecek şekilde yeniden oluşturulması olarak tanımlanmaktadır. Rejeneratif periodontal tedavinin temel amacı, alveolar kemik, sement ve PDL dahil olmak üzere periodontitis sebebiyle hasar gören periodonsiyumun anatomisini ve fonksiyonunu yeniden sağlamaktır (84).

Dokuların yeniden oluşturulması kapsamında, YDR prensibi geliştirilmiştir. Bu prensibe göre, belirli bir doku tipinin rejenerasyonu, kaybedilen doku türünü yenileme kapasitesine sahip hücrelerin, iyileşme sırasında defekti doldurması sağlandığında elde edilir. YKR konsepti ise YDR prensibi ile geliştirilmiştir.

YKR'nin temeli, istenmeyen yumuşak dokuların kemik defekti içine büyümesinin mekanik olarak engellenmesine dayanır (73).

YDR/YKR prensibine göre kullanılan membran boş bir alan yaratır ve defekt alanını yumuşak dokudan korur. Böylece, defekt alanında kemik oluşumunun sağlanması için, kemik kök hücrelerin toplanmasına, proliferasyonuna, osteoblastik farklılaşmanın sağlanmasına ve osteojenik aktivitenin oluşmasına izin veren bir ortam sağlanır (15). YDR/YKR yöntemleri kapsamında çeşitli kemik oluşturma kapasitesine sahip doğal veya sentetik biyomateriyaller kullanılmaktadır. Bu tedavi yöntemlerine ilişkin çeşitli çalışmalar mevcuttur. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda ratların kalvaryum kemiklerine PRF, EMD ve kemik grefti uygulayarak yeni kemik oluşumundaki etkisinin histopatolojik ve immunohistokimyasal açıdan değerlendirilmesi amaçlandı.

Kemik oluşumu, rezorbe olabilen ve olmayan membranlar tarafından sağlanır. Rejeneratif ürünlerin, klinikte uygulanması ve histomorfolojik incelemeler yapılması için hayvan çalışmaları bir zorunluluk haline gelmiştir. Kemik grefti veya diğer greft maddelerini değerlendirmek için kullanılan birçok hayvan modeli vardır. Koyun ve domuz gibi daha büyük hayvan modelleri ile fare modelleri kritik boyutlu defektlerin rejenerasyonunda ve onarım çalışmalarında kullanılmıştır. İnsan dokularında kemiğin fizyolojik koşullarını taklit etmek amacıyla fareler veya ratlar avantajlıdır. Rat modelleri ucuzdur ve barındırılması kolaydır. Dişi ratların siklus dönemlerinde görülebilen hormanel değişiklikler kemik rejenerasyonunu etkileyebileceğinden dolayı erkek rat modeller kemik oluşumunu incelemede daha avantajlı durumdadır (179). Çalışmamızda kemik rejenerasyonunu histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelemek için rat hayvan modelleri kullanıldı.

Hormonel değişikliklerden etkilenmemek için Spraque-Dawley erkek rat modeli tercih edildi.

Deneyssel çalışmalarda, kalvarial defekt modeli, kemik rejenerasyonunun en seçici deneyssel modeli olarak kabul edilmiştir. Dura mater ve deriden sağlanan destek sayesinde dış fiksasyona gerek kalmadan yeterli cerrahi erişim sağlanarak biyomateriyaller yerleştirilebilir. Kalvariya model kullanılarak çeşitli biyomateriyaller değerlendirilmiş ve rejenerasyon maddeleri arasındaki farkların karşılaştırılmasına olanak sağlanmıştır. Ratların kalvaria modeli, büyük hayvan modeliyle ilgili kemik döngüsünü, iltihaplanmasını, yıkım ve onarım sırasını incelemeye yararlıdır (180). Çalışmamızda YDR ile oluşturulan yeni kemiğin incelenmesi amacıyla ratların kalvaryum kemikleri tercih edilmiştir.

Kritik boyutlu kemik defekti, hayvanın yaşamı boyunca kendiliğinden iyileşme gösteremeyen en kk kemikiçi yara olarak tanımlanmaktadır. Herhangi bir kemik defekt modeli oluşturulurken, defektin boyutu, özellikle de kritik kemik defekti boyutu önemlidir. Köpek, maymun, tavşan, koyun gibi hayvanlarda kritik boyutlu kemik defektlerinin boyutlarıyla ilgili literatürde, rat kalvaryasında 8 mm çapında kritik kemik defekti olması gerektiği belirtilmektedir. Ratlarda, kritik boyutta kemik defektinin optimal boyutlarının ne olduğu konusunda tartışmalar olmuştur. Rat kalvaryumunda en yaygın olarak 5 mm çapında defektler kullanılır (181).

Yeni kan damarlarının oluşumu ve osteoblastların uyarılması kemik dokusu onarımında hayati faktörlerdir. Bununla birlikte, osteoblastik hücrelerin kaynağı tartışmalıdır. Birkaç araştırmacı kemik iliğinin fibroblastlarını, kemik kök hücreleri olarak görse de, diğerleri osteoblastların kapiller sistemden kaynaklandığını öne

sürmektedir. Kemiğin kortikal tabakasının dekortikasyonu, yara bölgesinde kanamayı ve kan pıhtı oluşumunu desteklediğinden rejenerasyonun gerçekleştirilmesi için yararlı olacağı düşünülmektedir (182).

Min ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada, kalvariyal kemik dekortikasyon boyutunun sert titanyum bariyerler içinde kemik oluşumuna etkisini incelemek için tavşanları kullanarak bir çalışma yapmışlardır. Araştırmacılar, dekortikasyon boyutunun kemik oluşumunu etkilemediğini tespit etmişlerdir (183).

Tavşanların kalvaryum kemiklerine kortikasyon kavimleri açılarak YDR etkinliği değerlendirilmiştir. Ksenograft ve otojen kan uygulanmasıyla, bir tavşanın kafatası kemiğinde normal anatomik sınırlarının ötesinde yeni kemik rejenerasyonunun meydana geldiği bildirilmiştir (184, 185). Ezirganlı ve ark.'ları yapmış oldukları deneysel çalışmada, kalvaryumun dekortikasyonuyla farklı kemik greftleri uygulanarak yeni kemik oluşumunun gerçekleştiğini bildirmişlerdir (186). Çalışmamızda ratların kalvaryum kemiklerinde eşit boyutta 9 tane 1.5 mm olacak şekilde dekortikasyon kavimleri açıldı.

Graft materyali, onarımdan rejenerasyona kadar yara iyileşmesini değiştirmede önemli bir rol oynar. Otojen greftlerin ve allogreftlerin analizi, materyalde bulunan sinyal moleküllerinin rejenerasyonu uyurabildiğini göstermiştir. Bu nedenle YDR'de; EMD, PRF, PRP, kemik greftleri, büyüme faktörleri, BMP, rezorbe olabilen ya da olamayan membran gibi materyaller sıklıkla kullanılmaktadır (13). İdeal bir graft materyali biyouyumlu, güvenli olmalı, alerjenik ve toksik olmamalı ve hastalık bulaşma riski taşımamalıdır. Kliniklerde yaygın olarak kullanılan dört ana graft materyali otojen greftler, allogreftler, ksenogreftler ve sentetik greftler veya alloplastik greftlerdir (145).

PRF, trombosit jeli biçimindedir. Yara iyileşmesini, kemik büyümesini, olgunlaşmasını artırma, greft stabilizasyonu ve hemostaz sağlama gibi avantajları olan, kemik greftleri ile birlikte kullanılabilen önemli bir otojen ajandır (149). Çalışmamızda, ratların kalvaryumlarında dekortikasyon kavileri ile defektler oluşturarak kemik oluşumu ve anjiogeneizdeki rolünü değerlendirmek amacıyla PRF ve PRF'nin ksenogreft ile karışımı kullanılarak oluşturulan yeni kemiğin histopatolojik ve immunohistokimyasal karşılaştırılması sağlandı.

Periodontal defektlerde, EMD kullanımı, olumlu rejeneratif sonuçlar göstermiştir. In vitro çalışmalar, EMD'nin PDL hücrelerinin proliferasyonunu, farklılaşmasını uyardığını ve epitel hücrelerinin proliferasyonunu engellediğini göstermiştir. Histolojik olarak, EMD'nin hem maymunlarda hem de insanlarda uygulanmasının hücresiz sement ve alveolar kemik oluşumuna yol açtığı gösterilmiştir (187). Çalışmamızda, EMD'nin yeni kemik oluşumuna, anjiogeneize etkisinin incelenmesi, diğer greft materyalleri ile histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak karşılaştırılması sağlanmıştır.

Ksenogreftler, başka türlerden elde edilen greft materyalleridir ve klinikte yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmalar, kemik dokusunun ksenogreft ile oluşabileceğini göstermiştir. Ksenogreftler, sitotoksik kimyasalları bulundurmaması, viral veya bakteriyel patojen bulaşma riskinin olmaması, rahat bulunabilirlik, düşük maliyet ve sınırsız miktarlarda sağlanabilme gibi özelliklere sahiptir (145). Bu avantajlarından dolayı çalışmamızda, kemik rejenerasyonunu incelemek üzere kemik grefti olarak ksenogreft kullanıldı.



Deneysel bir hayvan kemiği defektinin greftlenmesi ile ilgili çalışmalar, süreç olarak 3 ayın, iyileşmenin, anjiyogenezin ortaya çıkmasında ve yeni kemik oluşumunda yeterli olduğunu bildirmiştir (173, 188).

Literatürlerde, kemik iyileşmesinin aşamaları hafta hafta değerlendirilmiştir Pripatnanont ve ark.'ları, 2013'de yaptıkları çalışmada 8 ile 12 haftalık sürenin kemik iyileşmesi üzerinde anlamlı bir fark oluşturmadığını göstermişlerdir (189). Lundgren ve ark.'ları, tavşandaki parietal kemiğin kortikal tabakasının dekortikasyonunun, 3 aylık bir iyileşme süresinden sonra kemik oluşumu artışı ile sonuçlanmadığını göstermişlerdir (190). Bodde ve ark.'ları kritik boyutta kemik defekti için iyileşme süresini 12 hafta olarak tanımlamışlardır (188). Bu veriler değerlendirilerek, çalışmamızda YDR sonrasında oluşan yeni kemiğin histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak incelenmesi ve karşılaştırılması için bekleme süresi 3 ay olarak belirlendi.

YKR'de membran kullanımı, kemiğin oluşumu için bir alan sağlayarak kemik artırımını ve rekonstrüksiyonu sağlar. Son zamanlarda, YKR için titanyum membranlar, gelişmiş mekanik özellikleri, yüksek öngörülebilirlikleri ve bakteriyel kontaminasyona duyarlılığının daha az olması nedeniyle uygulanmaktadır. Kalınlık, delikli form ve gözenek boyutu gibi özelliklerle membranların yapısı optimize edilerek titanyum membranların etkisini artırmak için birçok çalışma yapılmıştır (167).

Ito ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada, titanyum bariyer membran kullanımının, kemik oluşumunu artırabileceği gösterilmiştir (191). Maréchal ve ark.'larının tavşanların kalvaryum kemiklerinde yapmış oldukları çalışmada ise, titanyum bariyerlerin kullanımı ile yeni oluşan kemik dokusu miktarının diğer

materyallerden daha fazla olduğu bildirilmiştir (182). Bu nedenle çalışmamızda, ratların kalvaryum kemiklerindeki kemik rejenerasyonunun membran uygulanarak etkili olmasını sağlamak için yüksekliği 3 mm ve çapı 6 mm olan titanyum kubbeler kullanıldı.

Ratlardan kan alımı için farklı yöntemler belirtilmiştir. Bu yöntemler kanın alındığı yere göre sınıflandırılabilceği gibi (arterlerden ve venlerden alınabildiği gibi göz damarlarından ve kalbin punkisyonuyla da kan alınabilir) anestezi gerektiren veya gerektirmeyen yöntemler olarak ayrılabilir. Bu yöntemler hayvanın yaşamasına izin veren veya hayvanı feda etmeyi gerektiren uygulamalar olarak da sınıflandırılabilir. Özellikle büyük miktarlarda kan alımı için işlemin başında veya sonunda hayvanın feda edilmesi zorunludur. Kalpten kan alınması tekniği, çalışmanın sonlandırılmasında ve fazla miktarda kan alınması gerektiği durumlarda tercih edilir. Açık ve kapalı uygulanabilen bu teknik ile ratın büyüklüğüne bağlı olarak 10-15 ml kan alınabilir (192). Nugraha ve ark.'ları, Du ve ark.'larının, ratlarda PRF eklenerek yeni oluşan kemiği incelediği çalışmalarda, PRF için kalpten açık yöntemle kan alma metodu tercih edilmiş olup, 10 ml'lik kan 3000 rpm 10 dakika santrifüj edilerek PRF'ler oluşturulmuştur (193, 194). Çalışmamızda, kalpten kan alma metoduna göre 36 rat kullanılıp alınan 10 ml'lik kandan PRF oluşturulup titanyum kubbelere koyularak kemik oluşumu değerlendirildi.

Mineralize kemik matriksi, kalsifiye veya kalsifiye olmayan dokular için farklı doku işleme yöntemleri ile gösterilebilmektedir. Kas-iskelet sisteminin fonksiyonel yapısının bileşenlerini göstermek için farklı boyama yöntemleri kullanılır. Bunlar; hematoksilin ve eozin, movat pentakrom, toluidin mavisi, alsiyan mavisi veya safranin O/fas green gibi genel boyamadan daha özel gümüşe kadar

boyama yöntemleri uygulanır (293). Çalışmamızda histolojik inceleme olarak osteoblast, osteoklast ve yeni kemik oluşumunu gözlemlemek amacıyla hemotoksilin–eosin boyama metodu kullanıldı.

Histolojik teknikler mineralize doku oluşumunu, kemik iliği, damar gibi hücresel bileşenlerin tanımlanmasını ve oluşturulan rejenerasyonda uygulanan greft materyaline karşı konak enflamatuar yanıtını araştırır. Histolojik değerlendirmede defektteki iyileşmeyi nicel ve nitel olarak değerlendirmek için birkaç farklı skorlama yöntemi geliştirilmiştir. Mevcut histolojik skorlama yöntemleri defekte oluşan "yeni kemik" miktarını ölçmektedir. Bu yöntem, iyileşme sırasında altta yatan mekanizmaları anlamaya yardımcı olabilecek ek bilgiler sağlayacaktır (195).

Skorlama yöntemleri histopatolojik ölçümlerin nicel bir ölçüsüdür. Toker ve ark.'ları ile Sacak ve ark.'ları, yeni kemik oluşumunu değerlendirmek için yarı kantitatif bir skorlama yöntemi geliştirmişlerdir; “kemik oluşumu yok 0; hafif görünür kemik oluşumu 1; orta derecede görünür kemik oluşumu 2; yüksek düzeyde görünür kemik oluşumu 3 olarak değerlendirmişlerdir (180, 196). Bizim çalışmamızda da kesitler hazırlanarak hemotoksilen boya ile oluşturulan bloklarda osteoblast, osteoklast yoğunluğu, yeni kemik oluşumu, fibrozis ve anjiogenezis gibi parametreler yarı-kantitatif olan bu skorlamaya göre değerlendirilmiştir.

Yeni kemik oluşumunun fazla olması başarılı kemik iyileşmesinin en önemli göstergesidir. Anjiogenezis, yara iyileşmesinde ve kemik oluşumunda merkezi bir süreçtir. Fibröz granülasyon dokusunun oluşumu, yara iyileşmesi sırasında çok önemlidir (197). Bu nedenle çalışmamızda yeni kemik oluşumu değerlendirilirken histopatolojik olarak osteoblast, osteoklast hücrelerinin seviyeleri, anjiogenezis ve fibrozis yoğunlukları değerlendirilmiştir

Osteoblastlar dahil birçok hücre tipi OPG üretir. OPG, RANKL için bir tuzak reseptör görevi görür ve osteoklast farklılaşmasını inhibe eder. Olgun osteoblastlar, osteoklast farklılaşması için çok önemli olan RANKL salgırlar. Osteoblastlardaki RANKL/OPG oluşum oranı, osteoklast oluşumunu düzenlemek ve iskelet homeostazını sürdürmek için önemlidir. Osteoblast ve osteoklast oluşumunun birbirini inhibe etmediği veya artırmadığı, bunun yerine kemik metabolizmasında bir denge sağladığı sonucuna varılabilir. Bu nedenle, OPG ve RANKL kemik iyileşmesi ve oluşumu için önemlidir. Kemik oluşumunu immunohistokimyasal olarak inceleyebilmek açısından OPG ve RANKL önemlidir (198). Çalışmamızda OPG, RANKL yoğunluğu ve OPG/RANKL oranını göstermek için immunohistokimyasal kit kullanıldı.

Dohan ve ark.'ları tarafından, 2009'da yapılan, PRF'nin, dişeti fibroblastlarının, dermal keratinosit öncül hücrelerin, adipositlerin ve maksillofasiyal osteoblastların, insan kültürlerinin üzerindeki etkilerini analiz ettikleri çalışmada, PRF'nin, tüm hücre tiplerinde önemli ve sürekli bir proliferasyon sağladığı gözlenmiştir. PRF'nin, kültür koşulları ne olursa olsun osteoblastlarda güçlü bir farklılaşmaya neden olduğu belirlenmiştir. Işık ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak PRF ile osteoblast kültürlerinin analizinde, 14 gün sonrasında PRF'nin kendisinde bir mineralizasyon sürecinin başladığı ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın sonucunda PRF, periodontal rejenerasyonda ve kemik oluşumunda umut verici bir biyomateryal olarak kabul edilmiştir (199).

Elgendy ve Shady, 2015 yılında yaptıkları çalışmada klinik sondlama derinliği en az 6 mm olan, hemen hemen aynı kemik içi defektli 20 hasta ile PRF'nin kemik oluşumuna etkisini incelemişlerdir. İki grup halinde oluşturulan deneklerden

birine nano partiküllü seramik kemik grefti diğerine ise bu kemik grefti ile birlikte PRF uygulanarak 6 aylık sürecin sonunda hastalar kemik oluşumu açısından incelenmiştir. PRF ile kombinasyon halindeki nano partiküllü seramik kemik grefti, tek başına uygulanan greft ile elde edilenden daha fazla kemik yoğunluğu göstermiştir (81). Thorat ve ark.'ları, PRF ile tedavi edilen kemik içi defektlerde önemli miktarda kemik dolumu gerçekleştiğini bildirmişlerdir (200).

Du ve ark.'ları yapmış oldukları çalışmada, ratların kalvaryum kemiğinde oluşturdukları defektlerde PRF/aspirin kompleksinin alveolar kemik rejenerasyonunu desteklediğini kanıtlamışlardır. Rat kemik defekti modelinde, rejenere alveolar kemiğin yüksekliği ve hacmi, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PRF/aspirin kompleksi olan grupta en yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu veriler, PRF'nin kemik rejenerasyonunda etkili bir biyomateriyal olduğunu doğrulamaktadır (194). Çalışmamızda, PRF uygulanan grupta görülen orta yoğunluktaki kemik oluşumu oranı, kontrol grubuna göre fazladır ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildir, sonucumuz bu literatürle uyuşmamaktadır. Bunun sebebi çalışmamızda PRF'yi aspirin olmadan uygulamamız ve uygulanan PRF miktarının farklı olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Lee ve ark.'ları, 2012'de tavşan tibialarında periimplant defektlerinde PRF kullanmıştır. Grupların birinde PRF ile defekt tamir edilirken, diğer grupta defekt boş bırakılmıştır. Kemik iyileşmesi histolojik olarak 8. haftada değerlendirildiğinde, periimplant defektlerinde tek başına PRF'nin başarılı olduğunu bildirmişlerdir (201). Çalışmamızda PRF uygulanan grupta görülen orta seviye kemik oluşum oranı kontrol grubuna göre yüksektir, ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildir ve sonucumuz literatürlerle uyuşmamaktadır. Bunun farklılığın bizim deneyimizin 3

aylık sürede olması, olgun kemik oluşumunun artması ve PRF'nin erken dönemde yeni kemik oluşumunda daha etkili olmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Lei ve ark.'ları 2019'da yapmış oldukları PRF konsantrelerinin periodontal defektlerde YDR uygulanarak klinik ataçman seviyelerini karşılaştırmışlardır. Altı aylık tedavi sonucunda A-PRF ve CGF gibi PRF türleri kullanıldığında klinik ataçman seviyelerinin arttığı ve kemik oluşumunun fazla olduğu ancak kontrol grubu ile aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı bildirilmiştir (202). Çalışmamızda PRF uygulanan grupta orta yoğunlukta kemik oluşumu oranı kontrol grubuna göre fazladır ancak aralarında istatistiksel olarak fark oluşmadı. PRF'nin kemik rejenerasyonunu artırdığı gözlemlendi ve sonucumuz literatürlerle uyumludur.

Diss ve ark.'ları 2004'de yapmış oldukları çalışmada, 20 hastaya 35 implantın yerleştirilmesi sırasında, PRF ve kemik grefti ile osteotomla sinüs tabanı yükseltmesi yapmışlardır. Mikro yivli implantlarda apikal kemik seviyelerindeki değişiklikleri radyografik olarak incelemişlerdir. Ardışık radyografilerde belirlenen radyografik analizler implant yerleştirme sırasında maksiller sinüsün altındaki ortalama kemik yüksekliği ve endosinüs kemik seviyesindeki değişiklikler incelenerek implantların 1 yıllık hayatta kalma oranı hesaplanmıştır. 1 yılda, tüm implantlar klinik olarak stabil olup bu da %97.1'lik bir hayatta kalma oranıyla sonuçlanmıştır. Graft materyali olarak PRF kullanımı endosinüs kemik oluşumuna yol açmıştır (133). Çalışmamızda, greft materyali olarak PRF kullanmamız orta yoğunlukta kemik oluşumunu artırarak kemik rejenerasyonuna olumlu etkiler sağlamıştır ve sonucumuz literatürle uyumludur.

Lee ve ark.'larının 2007'de köpeklerde yapmış oldukları çalışmada, eşzamanlı implant yerleştirme ile maksiller sinus yükseltme işlemi yapılmıştır. Graft

materyali olarak PRF ile otojen kemik kullanılmıştır. Ortalama kemik-implant arası kemik oluşumunun, PRF uygulanan tarafta %40.5 ve uygulanmayan kontrol tarafında %32.3 olduğu, büyütülmüş alanda yeni oluşan kemiğin ortalama yüksekliği PRF uygulanan tarafta 12.2 mm ve kontrol tarafında 10.7 mm olduğu gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Sonuçlar, PRF ile karıştırılmış otojen kemik kullanımının, tek başına otojen kemik greftleri için olanlardan daha üstün sonuçlar elde edebileceğini göstermektedir (203). Çalışmamızda PRF ve kemik grefti uyguladığımız gruplarda oluşan yüksek seviye yeni kemik miktarı kontrol grubuna ve tek başına kemik grefti uyguladığımız gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadi ve sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bu farklılık bizim çalışmamızda ksenogreft kullanılması ve greft miktarlarının bu çalışma ile aynı olmamasından kaynaklanabilir.

Horimuzu ve ark.'larının insan periosteal hücreleri ile PRF kompleksinin kombine kullanımının kemik rejenerasyonu üzerindeki sinerjik etkisini hayvan modellerinde değerlendirerek yapmış oldukları çalışmada, farelerin kalvaryal kemik defektlerine PRF ve insan periosteal hücreler uygulanması sonucunda oluşan kemik mikro-BT kullanılarak incelenmiştir. Kalvarial defekt modellerinde, yeni kemik oluşumu insan periosteal hücre + PRF grubunda tek başına insan periosteal hücre grubuna ve sadece defektli kontrol grubuna göre anlamlı derecede daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Periosteal hücrelerin hücre büyümesi, in vivo PRF ile birlikte artmıştır (204). Gassling ve ark.'larının, 2009'da yaptıkları çalışmada PDGF ve TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörlerinin bir kaynağı olan PRF'nin, birçok hücre tipinin ve periosteal hücrelerin çoğalmasını teşvik ettiği bildirilmiştir (205).

Shivashankar ve ark.'ları yapmış oldukları çalışmada, büyük periapikal lezyonun tedavisinde HA içerikli kemik grefti ve PRF'yi bariyer membran olarak kullanmışlardır. Radyolojik olarak HA içerikli greftin uygulanmasıyla 2 yılın sonunda tamamen yeni kemik oluşumu gözlenmiştir. HA içerikli greft ile birlikte PRF kullanımının greft materyallerinin emilimini hızlandırmış olabileceğini ve hızlı kemik oluşumunu sağlayabileceğini varsaymışlardır (206).

PRF, sitokinlerin fibrin ağlarına daha fazla dahil edilmesine ve bu mekanizmayla inflamasyonu hafifleterek yara iyileşmesine yardımcı olur (204). Baslarli ve ark.'larının, 2015'te yaptıkları mukoza retansiyonlu gömülü mandibular üçüncü molar dişleri olan toplam 20 hastanın dahil olduğu çalışmada, PRF'nin çekim soketlerindeki iyileşmeye olan etkisi incelenmiştir. Çekim soketlerinden birine rastgele PRF membran uygulanarak, diğer soketler ise tedavi edilmeden bırakılmıştır. Postoperatif 30. ve 90. günlerde, PRF ile tedavi edilen ve edilmeyen soketlerdeki kemik iyileşmesini değerlendirmek için panoramik görüntüler ve kemik sintigramları alınmıştır. PRF ile tedavi edilen ve edilmeyen soketler arasında önemli ölçüde farklılık izlenmemiştir. Gömülü üçüncü molar dişin alınmasından önce komşu dişlerde ölçülen cep derinliklerinin, dişler alındıktan sonra da değişmeden kaldığı, önemli ölçüde farklılık göstermediği belirtilmiştir. Bu çalışma ile PRF'nin çekim soketlerinde kemik iyileşmesine etki etmeyeceği ancak otolog bir fibrin matriksinin potansiyel özelliklerine sahip olduğu ve iyileşmeyi hızlandırabileceği düşünülmüştür (207). Çalışmamızda PRF uygulanan grupta orta yoğunlukta kemik oluşum oranı kontrol grubuna göre fazladır ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. PRF kemik iyileşmesini artırarak rejenerasyona olumlu etki göstermiştir ve bu nedenle sonucumuz literatürle benzerdir.



Pripatnanont ve ark.'ları, 2013'de yaptıkları çalışma ile tavşan kalvarial defektlerinde PRF'nin çeşitli greft materyalleriyle kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Yirmi Yeni Zelanda beyaz tavşanında iki taraflı kortikal kafatası defekti hazırlanarak, 10 tavşan PRF ile tedavi edilip, diğer 10 tavşan PRF konulmadan tedavi edilmiştir. Her iki grupta da 5 tavşanın defektine otojen; diğer 5 tavşanın defektine ksenogreft uygulanarak iyileşmeleri karşılaştırılmıştır. Hayvanlar 8. haftada sakrifiye edilerek, kemik oluşumu radyografik dansitometri ve histomorfometrik analiz ile değerlendirilmiştir. Yeni kemik yoğunluğunun histomorfometrik analizinde, ksenogreft kullanılan kemik defektlerinde PRF uygulanan gruplar ile PRF olmayan gruplar arasında yeni kemik oluşumu açısından anlamlı fark görülmemiştir. Çalışmanın sonucunda PRF'nin, otojen kemikle birlikte kullanıldığında kemik oluşumu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (189). Çalışmamızda, PRF'nin ksenogreftle kombinasyonu ve ksenogreft grubu arasında oluşan yeni kemik arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi, sonucumuz literatürle uyumludur.

Kızıldağ ve ark.'ları 2018 yılında tavşanların kalvaryum kemiklerinde yaptıkları çalışmada PRF ile kombine edilmiş otojen diş kemik greftinin (ODKG) yeni kemik oluşumu ve BMP-2 üzerindeki katkılarını değerlendirmişlerdir. On iki erkek Yeni Zelanda tavşan kullanılarak, her tavşanda üç dairesel kemik defekti hazırlanmıştır. Bu defektler kontrol, ODKG ile tedavi edilen ve ODKG+PRF ile tedavi edilen 3 gruba ayrılmıştır. Hayvanlar 28 günlük deney süresinden sonra sakrifiye edilmiştir. Yapılan histomorfometrik analizlere göre toplam büyütülmüş alan, yeni kemik alanı ve kemik yoğunluğu, ODKG grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha fazla gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Bu değerler ODKG+PRF

grubunda ODKG grubuna göre anlamlı derecede yüksektir ( $p<0.05$ ). Test grupları, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde artmış BMP-2 seviyeleri göstermiştir ( $p<0.05$ ). Bu çalışma, PRF ile kombine edilen ODKG'nin yeni kemik oluşumunu ve kraniyal defektlerde iyileşmeyi önemli ölçüde artırdığını ileri sürmüştür (208).

Agarwal ve ark.'ları PRF kullanarak klinik ataçman seviyesi ve kemik dolumu seviyelerini karşılaştırdıkları çalışmada, kronik periodontitis tanısı konan 30 sağlıklı, sigara içmeyen hastada 60 interproksimal defekti rastgele PRF/DDKKA grubu veya DDKKA/salin grubu şeklinde gruplandırılmıştır. Klinik cep derinliği, ataçman seviyesi, dişeti çekilmesi ve radyografik ölçümleri (kemik dolgusu, defekt çözünürlüğü ve alveolar kret rezorpsiyonu) başlangıçta ve 12 aylık takip sonunda yapılmıştır. Başlangıç ile karşılaştırıldığında, 12 aylık sonuçlar, her iki tedavi yönteminin de tüm klinik ve radyografik parametrelerde önemli değişikliklerle sonuçlandığını göstermiştir. Çalışmanın sonucunda, kemik altı periodontal defektlerin tedavisinde PRF ve DDKKA'nın bir kombinasyonunun salin ile DDKKA'dan daha etkili olduğunu göstermektedir. (209). Bizim çalışmamızda, PRF ile ksenogreftin uygulandığı grupta oluşan yeni kemik miktarı kontrol ve tek başına ksenogreft uygulanan gruba göre istatistiksel olarak fark anlamlı değildir ve sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bu durum bizim deneyimizde ratların kullanılmasından ve deney süremizin 3 ay olmasından kaynaklanabilir.

Cortellini ve Tonetti 2000'de yaptıkları çalışmada, defekt tipinin, yapılan kemik rejenerasyonunun başarısını önemli oranda etkilediğini ortaya koymuşlardır. Buna göre 2 ve 3 duvarlı kemik defektlerinde öngörülebilir sonuçlar elde etmek daha kolayken, EMD ve PRF gibi rijit olmayan materyallerle 2 duvarlı veya daha az

duvarlı defektlerde bu sonuçların daha zor elde edilebileceği bildirilmiştir (210). Çalışmamızda, 3 duvarlı defektlerde tek başına PRF uygulanan gruplarda orta yoğunlukta kemik oluşumu PRF ile kemik grefti, EMD ile kemik grefti ve üçünün uygulandığı gruba kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla bulundu ve sonucumuz literatürle uyumaktadır. PRF ve EMD'nin ksenogreftle kombinasyonlarının yeni kemik oluşumuna katkıda bulundukları gözlemlendi.

Yılmaz ve ark.'larının, 2013'de 3 erkek yetişkin domuzun kaval kemiklerinde defektler oluşturularak yapmış oldukları çalışmada, defektler ya PRF,  $\beta$ -TKF ya da  $\beta$ -TKF ile karıştırılmış PRF ile doldurulmuştur. On iki hafta deney süresinden sonra denekler sakrifiye edilip histolojik olarak incelenmiştir. Sonuç olarak PRF kullanılan deneklerde daha fazla kemik oluşumu gözlenerek PRF kullanımının yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu hızlandırabileceği gösterilmiştir ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (211). Çalışmamızda PRF ve ksenogreft uygulanan grupta oluşan yeni kemik ile ksenogreft uygulanan grupta oluşan yeni kemik arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ve sonucumuz literatürle uyumludur.

Bu çalışmalarla birlikte, 2011'de Kang ve ark.'ları, PRF'nin doku rejenerasyonunun sürdürülmesinde güçlü bir unsur olduğunu ifade etmiştir. Farelerin kalvaryum kemikleri kullanılarak yapılan 8 haftalık deney süresi sonunda PRF uygulanan grup ile kontrol grubu arasında yeni kemik oluşumu açısından sonuçlar olumlu olsa da, fark istatistiksel olarak anlamsız çıkmıştır (212). Çalışmamızda PRF uygulanan grupta orta seviye kemik oluşumu oranı kontrol grubuna göre daha fazla bulunmuştur ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ve sonucumuz literatürle uyumaktadır.

Oliveira ve ark.'larının 2015'te yaptıkları 48 ratın kullanıldığı bir çalışmada, ratların kalvaryumunda PRF ve ksenogreft arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Oluşan kemik rejenerasyonunda 60 gün sonunda, PRF'nin, ksenogreft ile sinerjik bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Sonuçlara göre ksenogreft-PRF kombinasyonu ksenogreft grubuna göre üstünlük göstermiştir ancak fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. (213). Çalışmamızda histopatolojik olarak yüksek seviye yeni kemik oluşumunda, PRF ve ksenogreft birlikte olduğu grupta, tek başına ksenogreft olan gruba göre yüksek oranda olduğu gözlemlendi, ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildi ve sonucumuz literatürle uyusmaktadır.

Nair ve ark.'ları, bir keçi femur modelindeki defektleri iyileştirmede, trifazik seramik (kalsiyum silikat, hidroksiapatit ve trikalsiyum fosfat) kaplı HA kemik grefti materyalinin performansını araştırmışlardır. Trifazik seramik kaplı hidroksiapatit ve trombosit ürünleri ile bir kombinasyonunu içeren gruplar oluşturulmuştur. Trombosit ürünlerinin olduğu grupta, birçok osteoindüktif proteinin oluşumunu artıran, daha hızlı kemik rejenerasyonu oluşmuştur, ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildir (214). Çalışmamızda ksenogreftle birlikte PRF ve EMD'nin uygulanması orta ve yüksek seviyede yeni kemik oluşumu oranını artırdığı gözlemlendi, fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ve sonucumuz literatürle benzerdir.

Nacopoulos ve ark.'ları, 2014'te, tavşan femurlarında PRF ve PRF ile HA kemik grefti ve  $\beta$ -TKF'den oluşan seramik sentetik materyal kombinasyonunu, bilgisayarlı tomografi (BT) kullanarak karşılaştırmış, üç ay sonunda iyileşmiş kemiğin ortalama yoğunluğu, sentetik materyal kullanıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir ( $p < 0.005$ ). PRF'nin sentetik greft ile kombinasyonu daha fazla kortikal ve subkortikal kemik oluşumu ile

sonuçlanmıştır. PRF ve HA/ $\beta$ -TKF kombinasyonunun yeni kemik oluşumu elde etmek için faydalı olabileceği bildirilmiştir (215). Çalışmamızda PRF ve ksenogreftin uygulandığı grupta yüksek seviye kemik oluşumu, PRF uygulanan gruba göre artmıştır ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bu farklılığın sebebinin, çalışmamızda gruplardaki kemik oluşumunun histopatolojik olarak incelenmesi, yapılan çalışmada ise tomografik veriler üzerinden inceleme yapılmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Acar ve ark.'ları, 20 tavşanın kalvaryum kemiklerinde yapılan çalışmada, tek başına veya HA/ $\beta$ -TKF ile kombinasyon halinde kullanıldığında PRF'nin kemik oluşumu üzerindeki etkinliğini mikro bilgisayarlı tomografi üzerinde araştırmışlardır. Tek başına ve HA/ $\beta$ -TKF ile kombinasyon halinde kullanıldığında sekiz haftalık deney sonucunda PRF'nin kemik oluşumu üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu gözlemlemişlerdir (216). Çalışmamızda PRF ile ksenogreft uygulanan grupta yeni kemik oluşumu açısından ksenogreft uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır, sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bunun sebebi, çalışmamızda deney süremizin 3 ay olması, ksenogreft kullanılması ve kemik oluşumunun histopatolojik- immunohistokimyasal olarak incelenmesi olabilir.

Bölükbaş ve ark.'ları, 2013'te, koyun tibialarında bifazik kalsiyum fosfata PRF eklenmesiyle kemik oluşumuna olan etkisini incelemişlerdir. Gruplar kontrol grubu, PRF grubu, bifazik kalsiyum fosfat ve PRF ile bifazik kalsiyum fosfat şeklinde ayrılmıştır. Çalışmada 40 günün sonunda PRF ile bifazik kalsiyum fosfat kullanımı kemik oluşumu açısından kontrol grubundan istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ancak diğer 3 grup arasında istatistiksel fark oluşmamıştır (217).

Çalışmamızda PRF uygulanan gruplarda orta ve yüksek seviye kemik oluşumu gözlenmiş olup, kontrol grubuna göre fazladır ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ve sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bunun sebebi, bizim çalışmamızda hayvan modeli olarak rat ve kemik grefti olarak ksenogreft kullanmamızdan kaynaklanıyor olabilir. PRF ile ksenogreft grubumuzda oluşan yeni kemik miktarı ile ksenogreft grubunda oluşan kemik miktarı arasında istatistiksel olarak fark anlamlı değildir ve sonucumuz bu literatürle uyuşmaktadır.

Zhang ve ark.'ları, 2012'de ksenogreft ile sinüs yükseltmede, PRF'nin kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmeyi amaçlamışlardır. Çalışmada, posterior maksiller kemik atrofi olan 10 hastadan 11 sinüs seçilmiştir. Bir test grubuna, ksenogreft ve PRF karışımı ile 6 sinüs yükseltmesi yapılmış olup ve kontrol grubu 5 sinüs sadece ksenogreftle tedavi edilmiştir. Histolojik gözlem, hem PRF hem de kontrol grupları için benzer morfolojik özellikler göstererek, PRF grubundaki yeni kemik oluşumunun yüzdesi, kontrol grubundakinin yaklaşık 1,4 katı bulunmuştur. Gözlenen parametrelerde iki grup arasında anlamlı istatistiksel fark bulunamamıştır. 6 aylık iyileşme döneminden sonra sinüs yükseltmede ksenogreft ile kombinasyon halinde PRF uygulamasının avantaj oluşturmadığı belirtilmiştir (218). Çalışmamızda PRF ve ksenogreft uygulanan grupta oluşan orta ve yüksek seviye yeni kemik oluşumu, ksenogreft uygulanan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmamıştır, sonucumuz literatürle uyumludur. Histopatolojik olarak, PRF ve ksenogreftin uygulandığı grupta görülen yüksek seviye yeni kemik oluşumu oranı ksenogreft grubuna göre fazladır.

Do Lago ve ark.'ları, 2019'da, ratlarda yaptıkları çalışmada, kemik defektlerinde PRF ve ksenogreft ile birlikte kullanımının, otojen kemik kullanımına

göre oluşturdıkları kemik rejenerasyonlarını karşılaştırmışlardır. Buna göre 40 rat kullanılan deneyde, denekler 5 gruba ayrılarak, bir grupta kan pıhtısı, bir grupta otojen kemik, bir grupta ksenogreft, bir grupta PRF ve diğerk grupta PRF ile ksenogreft kalvaryum kemiklerine yerleştirilmiştir. 4 ve 8 hafta sonra, kemik rejenerasyonu histometrik ve immünohistokimyasal analizlerle değerlendirilmiştir. Sonuçta en yüksek kemik rejenerasyonu PRF ve ksenogreft grubunda gözlenmiştir, diğerk gruplar arasında kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (219). Çalışmamızda PRF uygulanan grup ile kontrol grubu arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi, sonucumuz literatürle uyulmaktadır. PRF uygulanan grubun, PRF ile ksenogreft uygulanan gruba göre orta yoğunlukta kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak fark bulunmuş olup daha fazla gözlendi, bu sonucumuz literatürle uyulmamaktadır. Bu farklılık, bizim kullandığımız ksenogreftin çalışmada kullanılan ksenogreftte göre farklı olması ve deney süremizin 3 ay olmasından kaynaklanabilir.

He ve ark.'ları, 2009'da rat kalvaryalarında yapmış oldukları çalışmada PRF uygulanmasının osteoblastların proliferasyonunun, mineralizasyonun ve ALP aktivitesini değerlendirildirmişlerdir. Beş günde osteoblastların çoğalmasının arttığı ve 14 günde mineralizasyonun geliştiği ancak ALP aktivitesi üzerine etkisinin olmadığı gözlenmiştir (98). Çalışmamızda PRF uygulanan gruplarda osteoblast ve osteoklast düzeyleri açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu sonucun deney süremizin 3 ay olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. PRF ve EMD uygulanmasıyla gruplarda, histopatolojik olarak yoğun seviye osteoblast oluşumu gözlenmiş olup kontrol grubuna göre fazla oranda olduğu gözlendi.

Anjiyogenez, kemik rejenerasyonu için osteoblast öncüllerinin beslenmesi için önemlidir. Yoon ve ark.'ları 2013'de, tavşan kafa defektlerinde ksenojenik kemik kullanarak yaptıkları YKR'de PRF'nin anjiyogenez ve osteogenez üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Denekler 2 gruba ayrılarak, bir gruba PRF ile ksenogreft uygulanmıştır. Kontrol grubuna tek başına ksenogreft uygulanmıştır. Deney sonunda, VEGF için immün boyama yoğunluğu, deney grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde daha yüksek çıkmıştır. Histomorfometrik ve immünohistokimyasal incelemelerde kontrol grubu ile deney grubu arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre PRF'nin kemik iliği hücrelerinin sayılarını artırabileceği düşünülmüştür (220). Çalışmamızda anjiogenezis açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamakla birlikte PRF eklenmesiyle orta ve yoğun seviyede anjiogenezis oluşum oranı arttı ve sonucumuz bu literatürle uyumludur.

Bi ve ark.'larının, 2017'de yapmış oldukları çalışmada, PRF'de bulunan büyüme faktörlerinin, hücreleri, erken dönemdeki iyileşme ve fibroblastlar üzerindeki etkileri incelenmiştir. İnsan dişeti fibroblastlarında 84 yara iyileştirici genin ekspresyonu üzerindeki etkisi test edilmiştir. Sonuç olarak PRF, fibroblast gen ekspresyonunu hem zamana hem de doza bağlı olarak düzenleyerek, fibroblast yaralarının kapanmasını uyarmış ve fibroblastların endotel oluşumunu artırmıştır (221). Bizim çalışmamızda, PRF uygulanan gruplarda fibrozis açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ve sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bunun sebebi deneyimizin 3 ay olmasından dolayı fibrozis oluşumunun erken dönemde gözlenmesi ve yaptığımız çalışmada ratların incelenmesinden kaynaklanabilir. Histopatolojik olarak fibrozis oranı en yüksek kontrol grubunda gözlendi. Bunun



sebebi, PRF ve EMD'nin iyileşmenin ilk safhalarında oluşan fibrozis oluşumunda iyileşme göstererek kemik oluşumuna yönlendirdikleri ve 3 aylık deney süresinde yeni kemik oluşum alanlarını artırdıkları söylenebilir.

Sumida ve ark.'larının 2019'da yaptıkları çalışmada, farelerin osteoblast hücrelerinin kültürlendiği kemik defekti modelinde, kemik oluşumunda PRF'nin rolü değerlendirilmiştir. Kültür ortamındaki kemik hücrelerinin PRF ile 12 günde OPG oluşumunu artırdığı, ancak RANKL oluşumu üzerinde hiçbir etkisi olmadığı ve OPG/RANKL oranını artırdığı gözlenmiştir. PRF uygulanan grup, uygulanmayan kontrol grubuna kıyasla OPG yoğunluğunu artırmıştır. Sonuç olarak, PRF, OPG oluşumunu artırarak OPG/RANKL oranını artırmıştır. Buradan yola çıkılarak PRF'nin osteoblastik farklılaşmayı optimize ederek erken evre osteogenezisi geliştirdiği gösterilmiştir (222). Çalışmamızda OPG ve OPG/RANKL açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık çıkmadı ve literatürle uyumamaktadır. Bunun sebebi deney süremizin 3 ay olmasından dolayı defektlerde OPG oluşumunun erken dönemlerde gözlenmesi olabilir. Çalışmamızda RANKL açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ve literatürle uyumludur.

EMD ile tedavi edilen rat ve tavşan kalvarial defektlerinde, yeni kemik oluşumunda hızlanma ve kemik olgunlaşması gözlenmiştir. Bazı çalışmalar, EMD'nin iyileşmeyi artırdığını veya hızlandırdığını göstermiştir, ancak mevcut bulgularla uyumlu olarak, önemli bir etki bildirilmemiştir. Bu yüzden bazı araştırmacılar, bunun yerine EMD'nin "osteopromotif" veya "biyolojik bir güçlendirici" olduğunu öne sürmüşlerdir (110).

EMD, büyüme faktörünün aktivasyonu yoluyla kemik metabolizmasını etkilemiştir. Takayama ve ark.'ları, EMD'nin pluripotent mezenkimal hücrelerin osteojenik farklılaşmasını desteklediğini bildirmişlerdir. Bu etkiye, EMD'de bulunan kemik morfogenetik protein benzeri moleküllerin aracılık ettiğini ileri sürmüşlerdir (223). Schwartz ve ark.'ları, EMD'nin, proliferasyonu uyararak osteoblastik olgunlaşmanın erken aşamalarını etkileyebileceğini, ancak hücreler olgunlaştıkça, EMD'nin farklılaşmayı da artırdığını göstermişlerdir (224).

Hyun-Chang Lim ve ark.'larının köpeklerde yapmış oldukları çalışmada, diş implantı çevresindeki çevresel defekte EMD'nin kemik rejeneratif potansiyelini incelemişlerdir. Çalışmada EMD grubunun birkaç örneğinde dikkate değer kemik rejenerasyon paterni gözlemlenmiştir. EMD'nin erken iyileşmeyi desteklediği gösterilmiştir (187). Bizim çalışmamızda EMD uygulanan grupta orta seviye yeni kemik oluşumu istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı bulunup, PRF, EMD ve ksenogreft uygulanan gruba göre daha yüksek çıktı ve literatürle uyumludur.

Sanz ve ark.'ları, 2004 yılında, 75 kronik periodontitisli hasta üzerinden yaptıkları çalışmada, kemikiçi defektlerde, YDR ile EMD kullanımını karşılaştırmışlardır. Membran kullanılarak yapılan YDR yerine EMD uygularken daha iyi sonuçlar elde etmişlerdir. EMD uygulanan grupların klinik sondlama derinliğinde, klinik ataçman seviyesinde önemli kazanımlar sağlandığı ancak istatistiksel olarak gruplar arasında anlamlı fark olmadığı bildirilmiştir. Bu eğilimin, YDR'yi gerçekleştirirken, EMD'yi uygularken olduğundan daha yüksek komplikasyon oranından kaynaklandığı sonucuna varmışlardır (225). Çalışmamızda EMD grubu ile kseongreft uygulanan grup arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ve literatürle benzerdir.

Franke Stenport ve Johansson'nın, tavşan femurlarına yerleştirilen 36 tane titanyum implantların etrafında EMD uygulanması ile yaptıkları 6 hafta süren çalışmada, yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (226). Çalışmamızda EMD uygulanan grupta görülen yeni kemik oluşumu kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fark oluşturmamış ve sonucumuz bu literatürle uyumaktadır.

Casati ve ark.'larının köpek mandibulalarında uygulanan implant çevrelerinde ve Donos ve ark.'larının rat femurlarında oluşturulan silindirik defektler üzerinde yapmış oldukları çalışmalarda, ksenogreft ile kombinasyon halinde uygulanan EMD'nin kemik oluşumuna olan etkisi incelenmiştir. Köpek mandibulalarında ve rat femurlarında silindirik defektlerde önemli seviyede yeni kemik oluşumunun arttığı gözlenmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmamıştır (227, 228). Çalışmamızda histopatolojik olarak EMD ve ksenogreft uygulanan grupta görülen yüksek seviye kemik oluşumu oranı kontrol grubu, ksenogreft grubu ve PRF uygulanan gruplarda görülen yüksek seviye kemik oluşumuna göre yüksektir ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ve sonucumuz literatürle uyumaktadır.

Potijanyakul ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada, EMD'nin rat kalvaryum defektlerinde kemik oluşumunu artırmada kullanılan bioaktif cam alloplastik grefti üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir. Yirmi hayvan kullanıp 4 gruba ayırdıkları çalışmada, EMD'nin tek başına uygulandığı grupta, yeni kemik oluşumunun büyüklüğü, defekti boş bırakılan herhangi bir materyal uygulanmayan gruptakinden daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Radyolojik olarak sonuçlar, EMD'li biyoaktif cam ile tek başına biyoaktif cam arasındaki ortalama optik yoğunlukta önemli bir fark göstermemiştir. Histolojik analiz sonuçlarına göre tüm gruplarda

biyoaktif cam ve EMD ile doldurulan defektlerin, tek başına biyoaktif camla doldurulanlara göre daha fazla yeni kemik yüzdesi içerdiğini ortaya çıkarmıştır, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. EMD grubu ile birleştirilen biyoaktif cam greftinin olduğu grup, diğer herhangi bir grupla karşılaştırıldığında, 8 haftalık olan deneyde, en yüksek yeni kemik oluşumu yüzdesini göstermiştir, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Bu sonuç, biyoaktif cam ile EMD arasındaki ilişkinin, diğer gruplarla karşılaştırıldığında, yeni kemik alanının daha büyük bir yüzde ile gözlenmesinden dolayı kemik iyileşmesini olumlu yönde etkileyebileceğini göstermiştir (229). Bizim çalışmamızda EMD ve ksenogreft uygulanan grupta orta ve yüksek seviye kemik oluşumu gözlenerek, yüksek seviye kemik oluşum oranı diğer gruplara göre daha fazladır, ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildir ve bu sonucumuz literatürle uyumludur.

Siciliano ve ark.'ları, 2011'de EMD kullanımına karşı rezorbe olmayan titanyum membran kullanarak YDR'yi karşılaştırmıştır. Defekt morfolojisinde, tek başına EMD uygulaması YDR tedavisine kıyasla sondlama derinliğinin azalmasını ve klinik ataçman seviyesi kazancını sağlamıştır. EMD'nin, boşluk korumayan özelliğinden dolayı, defekt tedavisi üzerinde idealin altında bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (230). Bu nedenle, Sculean ve ark.'ları 2008'de yaptıkları çalışmada, böyle bir alan sağlamak için EMD kullanımını bariyer membranlarla birleştirerek daha yüksek klinik ataçman seviyesi kazancı sağlamıştır (5). Çalışmamızda YDR uygulanarak titanyum kubbeler kullanılması, defektlere EMD uygulanması orta seviye kemik oluşumunu artırarak istatistiksel olarak anlamlı derecede fark oluşturdu ve sonucumuz literatürle uyumaktadır.

Kawana ve ark.'larının, 2001'de yapmış oldukları, lokal olarak uygulanan EMD'nin kemik ve medüller rejenerasyon üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmada ratlarda yaralanma modeli oluşturularak femurlarında yeni kemik oluşumu incelenmiştir. Yeni oluşan kemik trabeküllerinin ameliyat sonrası 7. günde kemik hacminde, EMD grubunda kontrol grubuna göre önemli ölçüde daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Yaralanan uzun kemiklerin hasar onarımı sırasında EMD'nin kemik ve medüller rejenerasyon üzerinde osteojenik bir etkiye sahip olduğu öne sürülmüştür (231). Çalışmamızda EMD uygulanan grup ile kontrol grubu arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ve sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bunun sebebinin deney süremizin 3 ay olması ve gözlenen erken dönem kemik iyileşmesindeki değişikliklerin yerini olgun kemiğe bırakması olduğu düşünülmektedir.

Lekovic ve ark.'larının, 2000'de; Camargo ve ark.'larının, 2001'de yapmış oldukları çalışmalarda, ksenogreft, tek başına EMD veya kemikiçi periodontal defektlerin tedavisinde flep cerrahisi ile karşılaştırılmıştır. Sondalama derinliğini azaltmada, klinik ataçman seviyesini iyileştirmede ve defektin kemikle dolmasını artırmada EMD'nin etkili olduğu görülmüştür. Camargo ve ark.'larının yapmış olduğu çalışmada, EMD veya otolog fibrinojen/fibronektin sistemi, ksenogreft ile kombinasyon halinde kullanılmış olup benzer sonuçlar elde edilmiştir (232, 233). Çalışmamızın sonuçlarına göre EMD, PRF ve ksenogreft kullanılan grupta histopatolojik olarak oluşan yüksek seviye yeni kemik oluşum oranı ksenogreft uygulanan diğer gruplara göre daha fazla gözlenmiştir ancak istatistiksel olarak fark anlamlı değildir, sonuçlarımız literatür tarafından desteklenmektedir.

Baltacıoğlu, kombine EMD ve DDKKA tedavisi ile periodontal olarak hasarlı dişlerin klinik ve radyografik sonuçlarını değerlendirmiştir. Yaygın alveolar kemik kaybından kaynaklanan 12 periodontal olarak hasarlı dişi olan 11 hasta incelenerek, 12 aylık klinik ve radyografik takipte dişeti çekilmesi hariç tüm parametrelerde anlamlı düzelme gözlenmiştir ( $p<0.05$ ) (234). Çalışmamızda histopatolojik olarak EMD ve ksenogreft uygulanan grupta görülen kemik oluşumu, kontrol grubuna göre daha fazladır ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bunun durum çalışmamızda rat hayvan modeli kullanmış olmamızdan, 3 aylık deney süremizin olmasından ve incelenen parametrelerimizin farklı olmasından kaynaklanabilir.

Çalışmalar, tek başına ksenogreftle ile karşılaştırıldığında EMD ve ksenogreft kombinasyon halinde kullanıldığında çelişkili sonuçlar bildirmiştir. Scheyer ve ark.'larının, 2002'de 17 hastada bulunan kemikiçi defektlerde yapmış oldukları çalışmada, inceledikleri klinik parametrelerin hiçbirinde 2 tedavi grubu arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılık bulunmamıştır (235). Çalışmamızda tek ksenogreft grubu ile EMD ve ksenogreftin kullanıldığı grup arasında orta ve yüksek seviye yeni kemik oluşumu açısından oluşan fark istatistiksel olarak anlamlı değildir, sonuçlarımız bu literatür çalışmasıyla uyuşmaktadır.

Sculean ve ark.'larının, 2002'de insanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada, EMD alloplast materyali bioaktif cam ile birlikte kullanıldığında, sonuç tek başına biyoaktif cam grefti ile karşılaştırılmıştır, ancak iki grup için klinik ataçman seviyesi ve cep derinliği değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (236). Çalışmamızda EMD ile kemik greftinin uygulandığı grupta görülen yeni kemik oluşumu tek başına kemik grefti grubunda görülen yeni kemik

oluşumu ile istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturmadı sonucumuz bu literatürle uyumludur.

Oortgiesen ve ark.'larının 2012'de, 15 rat kullanıp yapmış oldukları çalışmada EMD ile kemik grefti materyalinin kemik oluşumuna etkileri incelenmiştir. Ratların molar dişlerinin mezial yüzeyinde üç duvarlı defekt oluşturulmuş ve kontrol grubu, EMD grubu ve EMD ile CaP'ın uygulandığı grup olarak 3 gruba ayrılmıştır. On iki haftalık deney sonucunda histolojik incelemelerde EMD ve EMD ile CaP grubunun kemik oluşumunun istatistiksel olarak benzer olduğu, iki grupta da kontrol grubundan daha fazla miktarda kemik olduğu gözlenmiştir (237). Çalışmamızda EMD grubu, EMD ile ksenogreft uygulanan grup arasında yeni kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ve sonucumuz literatürle uyumludur.

Zhang ve ark.'ları, 2016'da yapmış oldukları çalışmada, ratların femurlarında defekt oluşturarak EMD ve kemik greftinin kemik rejenerasyonuna etkisini incelemişlerdir. Denekler üç gruba ayrılarak, kontrol grubu, kemik grefti grubu ve EMD ile kemik grefti grubu şeklinde oluşturulup, 2, 4 ve 8. haftalardan sonra sakrifiye edilmiştir. Sonuçta, EMD ve kemik greftinin olduğu grupta 4 ve 8. haftalarda kemik oluşumu istatistiksel olarak diğer gruplara göre daha yüksek bulunmuştur (238). Çalışmamızda EMD ile ksenogreftin uygulandığı grupta oluşan yeni kemik oluşumu ile tek başına ksenogreft uygulanan grupta oluşan yeni kemik miktarı arasında istatistiksel olarak fark oluşmadı ve sonucumuz literatürle uyumsuzdur. Bunun sebebi deney süremizin 3 ay olmasından kaynaklanması olabilir.

Kobayashi ve ark.'larının, tavşanların kalvaryum kemiklerinde yapmış oldukları çalışmada, kemik grefti ile EMD kullanarak kemik rejenerasyonuna etkisini araştırmışlardır. Denekler üç gruba ayrılarak, kontrol grubu, kemik grefti grubu ve EMD ile kemik grefti grubu şeklinde oluşturulmuştur. Kemik rejeneratif potansiyeli, ameliyattan 8 hafta sonra mikro-BT ve histomorfolojik analizlerle araştırılmıştır. Sonuç olarak, EMD ile kemik greftinin uygulandığı grupta oluşan kemik istatistiksel olarak kontrol grubuna göre fazla bulunmuştur. Kemik grefti uygulanan grup ve EMD ile kemik grefti uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmemiştir (239). Çalışmamızda EMD ve ksenogreftin uygulandığı grupta oluşan yeni kemik açısından kontrol grubuna göre istatistiksel olarak farklılık gözlenmedi, bu sonucumuz literatürle uyuşmamaktadır. Bunun sebebi çalışmamızda kullandığımız EMD miktarının farklı olması ve deney süremizin 3 ay olmasından kaynaklanabilir. EMD ve ksenogreft uygulanan grupta görülen kemik oluşumu ile ksenogreft grubunda gözlenen kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır, bu sonucumuz literatürle uyumludur.

Gurinsky ve ark.'ları, insanlarda kemikiçi defektlerin tedavisinde, DDKKA ile beraber EMD'i kullanarak, tek başına EMD uygulanması ile karşılaştırdığı çalışmada, EMD ve allogreftin kullanıldığı grupta tek başına EMD grubuna göre kemik oluşumunda farklılıklar bulunmuştur. İkisinin kombinasyonu tek başına ksenogreft ile karşılaştırıldığında, yumuşak ve sert doku ölçümleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir avantajı olmadığı gözlenmiştir (240). Çalışmamızda EMD ve ksenogreft uygulanan grup ile tek ksenogreft uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ve sonucumuz literatürle uyuşmaktadır.



Qu ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada, osteoblastik hücrelerin titanyum yüzeyinde kültürlendiği bir ortama EMD eklendiğinde, hücrelerde alkaline fosfatase aktivitesini ve osteokalsin üretimini önemli ölçüde arttırmıştır. EMD, OPG'nin seviyesini arttırmıştır ve RANKL seviyesini etkilememiştir. EMD'nin hücre dışı ortamda hücre canlılığını ve proliferasyonunu azalttığı gözlenmiştir (241). Çalışmamızda EMD uygulanan gruplarda osteoblastik ve osteoklastik hücrelerin yoğunluğu arttı, ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ve sonucumuz bu literatürle uyuşmamaktadır. Bunun sebebi deney düzeneğinin farklı olması ve çalışmamızda EMD'nin hücre içi ortamda uygulanmış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Bazı çalışmalarda sunulan veriler, EMD'nin anjiyogeneze süreci üzerinde olumlu bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir. EMD, endotelial hücreleri aktive ederek anjiyogenezi uyarmakta ve ayrıca osteoblast hücre proliferasyonunu artırarak kemik oluşumunu düzenleyebilmektedir. Kauvar ve ark.'larının 2010'da EMD'nin anjiyogeneze etkisini göstermek amacıyla yapmış oldukları çalışmada, EMD'nin in vitro endotelial hücreler için kemotaktik olduğu gösterilmiştir. EMD'nin VEGF'nin PDL oluşumunu önemli ölçüde artırdığı da gösterilmiştir, bu sonuç da anjiyogeneze desteklemedeki başarısına katkıda bulunmuştur (242). Bizim çalışmamızda EMD uygulanan gruplarla diğer gruplar arasında anjiyogeneze açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır. Bunun sebebi, çalışmamızın canlı hücrede yapılmış olmasından ve histopatolojik olarak incelememizden kaynaklanıyor olabilir.

EMD'nin insan mikrovasküler endotel, fibroblast ve PDL hücrelerinde VEGF üretimini uyardığını bildirilmiştir. EMD, diğer hücre türleri tarafından da anjiyogenik

faktör üretimini uyarır. EMD, dişeti dokusundaki VEGF, interlökin-10 gibi belirli büyüme faktörlerini ve sitokinleri artırarak regüle etmiştir. Bu bulgular, EMD'nin yara iyileşme bölgesinde doğrudan veya dolaylı olarak anjiyogenezi artırabileceğini düşündürmüştür (242). Bizim çalışmamızda EMD uygulanan gruplarda anjiogeneze açısından diğer gruplarla istatistiksel açıdan bir fark olmadığı ancak histopatolojik açıdan EMD uygulanan gruplarda anjiogenezis oranının arttığı gözlemlendi.

EMD'nin önemli bir bileşeni olan amelogenin, fibroblast yapışmasını ve proliferasyonunu teşvik etmede önemli bir rol oynar, bu nedenle erken yara iyileşme sürecinde fibrozis oluşumunda etkili olduğu gözlenmiştir (197). EMD'nin insan PDL fibroblastlarında mitozu ve proliferasyonunu önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir (243). Çalışmamızda fibrozis açısından değerlendirildiğinde fibroblast yoğunluğunda EMD uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığı gözlemlendi,

EMD'nin osteoblast hücrelerde fenotipik kemik belirteçlerinin uyarılmasıyla insan, domuz osteoblast hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını artırabildiğini göstermektedir. Narukawa ve ark.'larının yapmış oldukları çalışmada, EMD'nin, RANKL salınımını azaltarak ve OPG üretimini artırarak uygun bir osteojenik mikro ortam yaratabileceği gösterilmiştir (244). Çalışmamızda OPG, RANKL ve OPG/RANKL açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. İmmunohistokimyasal olarak değerlendirildiğinde EMD uygulanan gruplarda OPG yoğunluğunun arttığı gözlemlendi.

EMD'nin osteoklast oluşumu üzerindeki etkileri in vitro çalışmada rapor edilmiştir. Otsuka ve ark.'ları, osteoblastik hücrelerde çok çekirdekli hücre oluşumu ve RANKL oluşumu için fare kemik iliği hücrelerinde EMD'nin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışma ile EMD'nin osteoklast oluşumunu artırdığı ve bu etkinin

RANKL üretimi yoluyla yönlendirildiği sonucuna varılmıştır (245). Bizim çalışmamızda osteoklast hücreleri ve RANKL yoğunluğu açısından, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ve sonucumuz literatürle çelişmektedir. Bunun sebebi bizim çalışmamızın in vitro ortamda değil, ratlarda in vivo ortamda gerçekleşmesinden kaynaklanabilir.

Türkal ve ark.'larının 2016'da yaptıkları klinik çalışmada, kronik periodontitis hastalarında kemik içi defektlerin tedavisinde EMD ve EMD+PRF ile elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlanarak kemikiçi defektlerde, rastgele olacak şekilde, EMD veya EMD+PRF ile tedavi uygulanmıştır. Altı aylık süre sonunda klinik ataçman seviyesi, sondlamada derinliği ve dişeti çekilmesi gibi parametreler değerlendirilmiştir. Bu ölçümler her iki grupta da sondlama derinliği ve klinik ataçman seviyesinde anlamlı azalma olduğunu gösterse de, gruplar arası istatistiksel olarak fark saptanmamıştır. EMD ve EMD+PRF grupları karşılaştırıldığında, kemik dolumu da istatistiksel olarak farklı olmamıştır. Her iki tedavi de kemikiçi defektlerin tedavisinde önemli klinik iyileşme ile sonuçlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre çok duvarlı defektlerde, EMD+PRF tedavisi daha büyük bir kemik kazancı sağlamıştır (246). Bizim çalışmamızda EMD'nin uygulandığı grupta orta seviye yeni kemik oluşumu, PRF, EMD ve ksenogreftin uygulandığı gruptan istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazladır. PRF ile ksenogreftin, EMD ile ksenogreftin ve üçünün beraber uygulandığı gruplar arasında yüksek seviye kemik oluşumu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark oluşmamıştır. Ancak üçünün kombine uygulandığı grupta yüksek seviye kemik oluşum oranının daha fazla olduğu gözlemlendi ve literatürle uyumludur.

Gupta ve ark.'ları, 2014 yılında kemikiçi defektlerde, EMD ve PRF kullanarak oluşan kemiği, herhangi bir kemik grefti olmadan kemikiçi defektlerde karşılaştırmışlardır. Klinik ataçman seviyesi ve cep derinliğinin iyileşmesinde benzer şekilde etkili oldukları, ancak EMD'nin kemikiçi defektlerde kemik kazancı için üstün olduğu sonucuna varmışlardır (247). Bizim çalışmamızda PRF uygulanan gruplarda orta seviye kemik oluşum oranı ile EMD uygulanan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ve sonucumuz literatürle uyumaktadır. Histopatolojik olarak EMD uygulanan grupta görülen yüksek seviye kemik oluşum oranı PRF grubuna göre daha fazladır. Bu durum EMD'nin anjiogenezi artırarak büyüme faktörlerinin salınmasını ve osteoblastik hücreleri kemik oluşumuna teşvik etmedeki rolünün PRF'ten üstün olmasıyla açıklanabilir.

Seibert ve Nyman, köpeklerde yapmış oldukları çalışmada 90 günlük iyileşme sonrası, dişsiz krette cerrahi olarak oluşturulan bukkolingual defektlerin e-PTFE membran altında yeni kemik oluşumunu göstermişlerdir (248). Çalışmamızda titanyum membranlar kullanılarak YDR oluşturulmuş olup orta ve yüksek seviyede kemik oluşumu gözlenmiştir ve sonucumuz literatürle uyumludur.

Li ve ark.'ları, 2018'de, köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada, alveolar kemik defektlerinin onarımı için tek veya kombinasyon halinde titanyum ağ membran ve ksenogreft kullanarak oluşturdukları YKR' yi değerlendirmişlerdir. Üç deneğin mandibular küçük azı dişleri ve birinci azı dişleri çekildikten altı ay sonra, implant ile birlikte titanyum ağ membran ve ksenogreft uygulamışlardır. Sonuç olarak incelenen mikro-BT'de titanyum membran ve ksenogreft uygulanması ile kemik oluşumunun artırılabilceği gözlenmiştir (249). Çalışmamızda titanyum kubbeler kullanılarak PRF, EMD ve ksenogreftlerin uygulanmasıyla ratların

kalvaryum kemiklerinde orta ve yüksek seviyede kemik rejenerasyonları elde edilmiştir ve sonucumuz literatürle uyumludur.

Yaptığımız çalışmada bazı limitasyonlarla karşılaşmıştır. Bu limitasyonların ilki kemik oluşumunun değerlendirilmesinde sadece histolojik ve immunohistokimyasal parametrelerin kullanılmış olup mikro bilgisayarlı tomografi gibi görüntüleme teknikleri kullanılarak kemik oluşumunun hacim olarak değerlendirmelerinin yapılmamış olmasıdır. İkincisi histolojik incelemede yapılan skorlamaların öznel olabileceği ve detayları göstermede eksik olabileceğinden dolayı daha fazla parametrenin incelenmesi gerekliliğidir. Çalışmamızdaki uygulamalara ek olarak erken dönem hücresel döngülerin daha iyi incelenebilmesi için 7, 14, ve 21. günlerde histolojik kesitler alınarak değerlendirmeler ve incelemeler yapılabilir. Çalışmamızda PRF, EMD ve ksenograft kullanarak titanyum kubbelerle destekleyip oluşturduğumuz YDR'de yeni kemiği incelemeyi histopatolojik ve immunohistokimyasal olarak değerlendirmeyi amaçlamaktayız.

## 7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışma ratların kalvaryum kemiklerinde yapılan YDR’de, EMD, PRF ve ksenogreftlerin beraber kullanımının yeni kemik oluşumu ve karşılaştırılmasının 7 grup üzerinden yapıldığı ve bu örneklerin histopatolojik ve immunohistolojik incelemenin yapıldığı tek çalışmadır.

Çalışmamızda yüksek düzeyde yeni kemik oluşumu açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Histopatolojik açıdan incelendiğinde, kontrol grubunun %0’ında, PRF grubunun %0’ında, PRF+KG grubunun %30,8’inde, EMD grubunun %15,4’ünde, EMD+KG grubunun %38,5’inde, KG grubunun %23,1’inde ve EMD+PRF+KG grubunun %53,8’inde yüksek düzeyde yeni kemik oluşmuştur. Orta düzeyde kemik oluşumu açısından değerlendirildiğinde PRF grubunun %100’ünün PRF+KG, EMD+KG ve PRF+EMD+KG gruplarına göre; EMD grubunun %84,6’ının PRF+EMD+KG grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı fark oluşturduğu gözlenmiştir ( $p<0.05$ ). Bu sonuç bize PRF ve EMD’nin kemik oluşumunu, rejenerasyonunu artırdıkları ve hızlandırdıklarını göstermektedir. Ksenogreft uygulamasıyla orta ve yüksek seviye kemik oluşumu artırılabilir. Özellikle EMD ve kemik greftinin kemik rejenerasyonunda kullanılabilecek etkili greft materyalleri olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda osteoblastik hücre düzeyi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Histopatolojik olarak değerlendirildiğinde kontrol grubunun %38,5’inde, PRF grubunun %69,2’sinde, PRF+KG grubunun %69,2’sinde, EMD grubunun %53,8’inde, EMD+KG grubunun %61,5’inde, KG grubunun %76,9’unda ve PRF+EMD+KG grubunun %69,2’sinde

yoğun boyandığı gözlenmiştir. EMD, PRF ve ksenogreftin kullanıldığı gruplarda kontrol grubuna göre yoğun boyanma gözlenmiştir. Bu sonuç bize EMD ve PRF' nin osteoblastik hücreleri uyarmada etkili olduğunu ve ksenogreftle kombine kullanımlarının osteoblastik hücrelerin proliferasyonunu ve kemik rejenerasyonunu artırmada pozitif etkilerinin olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda osteoklastik hücre düzeyi açısından değerlendirildiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Histopatolojik açıdan değerlendirildiğinde kontrol grubunun %0'ında, PRF grubunun %15,4'ünde, PRF+KG %7,7'sinde, EMD grubunun %15,4'ünde, EMD+KG grubunun %15,4'ünde, KG grubunun %15,4'ünde ve PRF+EMD+KG grubunun %0'ında yoğun boyandığı gözlenmiştir. Bu sonuç bize EMD, PRF ve kemik greftinin osteoklastik hücresel aktivite üzerinde önemli bir fark yaratmadıklarını düşündürmektedir.

Çalışmamızda fibrozis düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Histopatolojik açıdan incelendiğinde kontrol grubunun %61,5'inde, PRF grubunun %46,2'sinde, PRF+KG grubunun %38,5'inde, EMD grubunun %15,4'ünde, EMD+KG grubunun %15,4'ünde, KG grubunun %15,4'ünde ve PRF+EMD+KG grubunun %30,8'inde orta yoğunlukta boyandığı gözlenmiştir. Ancak fibrozis düzeyinin histopatolojik olarak en yüksek olduğu grup kontrol grubu olmuştur. PRF ve EMD gruplarında fibrozis seviyeleri kontrol grubuna göre daha azdır. Kemik oluşumu ile fibrozis arasında ters bir orantı gözlenmiştir. Bu sonuç bize EMD ve PRF uygulanmasının erken dönemde yara ve kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerinin değerlendirilmesi açısından fibroblastik hücre yoğunluğu ve

döngüsünü artırarak kemik oluşumunu artırdıklarını, ilerleyen dönemde ise fibrozis alanlarını azaltarak iyileşmeyi hızlandırdıklarını düşündürmektedir.

Çalışmamızda anjiogenezis düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamaktadır ( $p>0.05$ ). Histopatolojik açıdan incelendiğinde, kontrol grubunun %0'ında, PRF grubunun %0'ında, PRF+KG grubunun %15,4'ünde, EMD grubunun %0'ında, EMD+KG grubunun %7,7'sinde, KG grubunun %53,8'inde ve PRF+EMD+KG grubunun %0'ında yoğun boyandığı gözlenmiştir. Histopatolojik olarak kemik grefti grubunda kontrol grubuna göre fark biraz daha belirgindir. Endotel hücrelerinin uyarılması ve anjiogenezin artırılması konusunda kemik grefti olarak ksenogreftin olumlu etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda OPG düzeyleri açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). İmmunohistokimyasal olarak incelendiğinde kontrol grubunun %38,5'inde, PRF grubunun %69,2'sinde, PRF+KG grubunun %76,9'unda, EMD grubunun %69,2'sinde, EMD+KG grubunun 69,2'sinde, KG grubunun %76,9'unda ve PRF+EMD+KG grubunun %92,3'ünde yoğun boyandığı gözlenmiştir. Bu sonuç bize EMD, PRF ve ksenogreftin OPG üretimini artırarak yeni kemik oluşumunda etkili rollerde olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda RANKL düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). İmmunohistokimyasal olarak incelendiğinde kontrol grubunun %0'ında, PRF grubunun %15,4'ünde, PRF+KG grubunun %7,7'sinde, EMD grubunun %15,4'ünde, EMD+KG grubunun %15,4'ünde, KG grubunun %15,4'ünde ve PRF+EMD+KG grubunun %0'ında yoğun boyanma gözlenmiştir. Bu sonuç PRF, EMD ve ksenogreftlerin RANKL üretiminde fazla etkili olmadığını düşündürmektedir.



Çalışmamızda OPG/RANKL düzeyi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ( $p>0.05$ ). İmmunohistokimyasal olarak incelendiğinde, kontrol grubunun  $1,2\pm0,3$ , PRF grubunun  $1,3\pm0,3$ , PRF+KG grubunun  $1,3\pm0,2$ , EMD grubunun  $1,3\pm0,3$ , EMD+KG grubunun  $1,3\pm0,3$ , KG grubunun  $1,3\pm0,3$  ve PRF+EMD+KG grubunun  $1,5\pm0,1$  OPG/RANKL oranları gözlenmiştir. Kontrol grubunun OPG/RANKL düzeyi diğer gruplara göre daha düşüktür. Bu sonuç bize PRF, EMD ve kemik greftinin OPG oluşumuna olumlu etkileri olsa da RANKL oluşumunda fazla etkili olmadıklarını bu nedenle OPG/RANKL oranını anlamlı derecede etkilemediğini düşündürmektedir.

Çalışmamız dahilinde; PRF ve EMD'nin tek başına veya ksenogreftlerle kombinasyonlarının kullanılmasıyla YDR uygulamalarında yeni kemik oluşumu, yara iyileşmesinin hızlanmasını, kemik hücrelerinin üretiminde rol oynayarak olumlu şekilde arttırabileceği düşünülmektedir. YDR' de PRF, EMD ve kemik grefti kullanımı, kemik defektli periodontitis tedavilerinde, periimplantitis tedavilerinde, implant uygulamalarında, implant cerrahisinden önce yapılan kemik augmentasyonlarında ve malign veya travma kaynaklı oluşan kemik kayıplarında önemli etkilere sahiptir. PRF ve EMD kullanımının kemik hücrelerine ve yeni oluşan kemik dokusu hacmine olan etkilerinin değerlendirilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

## 8. KAYNAKLAR

1. Miron RJ, Zucchelli G, Pikos MA, Salama M, Lee S, Guillemette V, et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review. *Clin Oral Investig*. 2017;21(6):1913-27.
2. Del Fabbro M, Karanxha L, Panda S, Bucchi C, Nadathur Doraiswamy J, Sankari M, et al. Autologous platelet concentrates for treating periodontal infrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;11:CD011423.
3. Wang HL, Cooke J. Periodontal regeneration techniques for treatment of periodontal diseases. *Dent Clin North Am*. 2005;49(3):637-59, vii.
4. Wikesjo UM, Selvig KA. Periodontal wound healing and regeneration. *Periodontol* 2000. 1999;19:21-39.
5. Sculean A, Kiss A, Miliauskaite A, Schwarz F, Arweiler NB, Hannig M. Ten-year results following treatment of intra-bony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*. 2008;35(9):817-24.
6. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89 Suppl 1:S173-S82.
7. Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol* 2000. 2017;75(1):152-88.
8. Bosshardt DD, Sculean A. Does periodontal tissue regeneration really work? *Periodontol* 2000. 2009;51:208-19.
9. Han J, Menicanin D, Gronthos S, Bartold PM. Stem cells, tissue engineering and periodontal regeneration. *Aust Dent J*. 2014;59 Suppl 1:117-30.
10. Lang NP. Focus on intrabony defects--conservative therapy. *Periodontol* 2000. 2000;22:51-8.
11. Kao RT, Nares S, Reynolds MA. Periodontal regeneration - intrabony defects: a systematic review from the AAP Regeneration Workshop. *J Periodontol*. 2015;86(2 Suppl):S77-104.
12. Bottino MC, Thomas V. Membranes for Periodontal Regeneration--A Materials Perspective. *Front Oral Biol*. 2015;17:90-100.
13. Kao DW, Fiorellini JP. Regenerative periodontal therapy. *Front Oral Biol*. 2012;15:149-59.
14. Chen FM, Jin Y. Periodontal tissue engineering and regeneration: current approaches and expanding opportunities. *Tissue Eng Part B Rev*. 2010;16(2):219-55.
15. Retzepi M, Donos N. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications. *Clin Oral Implants Res*. 2010;21(6):567-76.
16. Kao RT, Conte G, Nishimine D, Dault S. Tissue engineering for periodontal regeneration. *J Calif Dent Assoc*. 2005;33(3):205-15.
17. Hollander A, Macchiarini P, Gordijn B, Birchall M. The first stem cell-based tissue-engineered organ replacement: implications for regenerative medicine and society. *Regen Med*. 2009;4(2):147-8.
18. Karring T. Regenerative periodontal therapy. *J Int Acad Periodontol*. 2000;2(4):101-9.

19. Ivanovski S. Periodontal regeneration. *Aust Dent J.* 2009;54 Suppl 1:S118-28.
20. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 2006;40:164-72.
21. Nunez J, Vignoletti F, Caffesse RG, Sanz M. Cellular therapy in periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 2019;79(1):107-16.
22. Bartold PM, Gronthos S, Ivanovski S, Fisher A, Hutmacher DW. Tissue engineered periodontal products. *J Periodontal Res.* 2016;51(1):1-15.
23. Bartold PM, Narayanan AS. Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues. *Periodontol* 2000. 2006;40:29-49.
24. Zhu W, Zhang Q, Zhang Y, Cen L, Wang J. PDL regeneration via cell homing in delayed replantation of avulsed teeth. *J Transl Med.* 2015;13:357.
25. Nanci A, Bosshardt DD. Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 2006;40:11-28.
26. Grzesik WJ, Narayanan AS. Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(6):474-84.
27. Zeichner-David M. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol* 2000. 2006;41:196-217.
28. Chen FM, Shelton RM, Jin Y, Chapple IL. Localized delivery of growth factors for periodontal tissue regeneration: role, strategies, and perspectives. *Med Res Rev.* 2009;29(3):472-513.
29. Downey PA, Siegel MI. Bone biology and the clinical implications for osteoporosis. *Phys Ther.* 2006;86(1):77-91.
30. Clinical Periodontology and Implant Denstry. 6 ed. Ankara Nobel Tıp Kitapevleri2017.
31. Kincaid SA, Van Sickle DC. Bone morphology and postnatal osteogenesis. Potential for disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1983;13(1):3-17.
32. Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus.* 2001;10(4):E1.
33. Sodek J, McKee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontol* 2000. 2000;24:99-126.
34. Palumbo C, Palazzini S, Marotti G. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone.* 1990;11(6):401-6.
35. Miller SC, Bowman BM, Smith JM, Jee WS. Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec.* 1980;198(2):163-73.
36. Adli Antropoloji [Internet]2017.
37. Weigle J, Franz-Odenaal TA. Functional bone histology of zebrafish reveals two types of endochondral ossification, different types of osteoblast clusters and a new bone type. *J Anat.* 2016;229(1):92-103.
38. Ferretti M, Palumbo C, Contri M, Marotti G. Static and dynamic osteogenesis: two different types of bone formation. *Anat Embryol (Berl).* 2002;206(1-2):21-9.
39. Sommerfeldt DW, Rubin CT. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J.* 2001;10 Suppl 2:S86-95.

40. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol* 2000. 2015;67(1):211-33.
41. Elangovan S, Srinivasan S, Ayilavarapu S. Novel regenerative strategies to enhance periodontal therapy outcome. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(4):399-410.
42. Rojas MA, Marini L, Piloni A, Sahrman P. Early wound healing outcomes after regenerative periodontal surgery with enamel matrix derivatives or guided tissue regeneration: a systematic review. *BMC Oral Health*. 2019;19(1):76.
43. Heitz-Mayfield LJ, Lang NP. Surgical and nonsurgical periodontal therapy. Learned and unlearned concepts. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):218-31.
44. Morrison EC, Ramfjord SP, Hill RW. Short-term effects of initial, nonsurgical periodontal treatment (hygienic phase). *J Clin Periodontol*. 1980;7(3):199-211.
45. Park JK, Yeom J, Oh EJ, Reddy M, Kim JY, Cho DW, et al. Guided bone regeneration by poly(lactic-co-glycolic acid) grafted hyaluronic acid bi-layer films for periodontal barrier applications. *Acta Biomater*. 2009;5(9):3394-403.
46. Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982;9(4):290-6.
47. Eickholz P, Krigar DM, Kim TS, Reitmeir P, Rawlinson A. Stability of clinical and radiographic results after guided tissue regeneration in infrabony defects. *J Periodontol*. 2007;78(1):37-46.
48. Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjo UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol* 2000. 2006;41:30-47.
49. Susin C, Fiorini T, Lee J, De Stefano JA, Dickinson DP, Wikesjo UM. Wound healing following surgical and regenerative periodontal therapy. *Periodontol* 2000. 2015;68(1):83-98.
50. Trombelli L, Kim CK, Zimmerman GJ, Wikesjo UM. Retrospective analysis of factors related to clinical outcome of guided tissue regeneration procedures in intrabony defects. *J Clin Periodontol*. 1997;24(6):366-71.
51. Needleman IG, Worthington HV, Giedrys-Leeper E, Tucker RJ. Guided tissue regeneration for periodontal infra-bony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006(2):CD001724.
52. Lang H, Schuler N, Arnhold S, Nolden R, Mertens T. Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell populations cultured in vitro. *J Dent Res*. 1995;74(5):1219-25.
53. Iorio-Siciliano V, Blasi A, Nuzzolo P, Matarasso M, Isola G, Ramaglia L. Treatment of Periodontal Intrabony Defects Using Enamel Matrix Derivative: Surgical Reentry After an Observation Period of at Least 5 Years. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2019;39(4):537-43.
54. McClain PK, Schallhorn RG. Long-term assessment of combined osseous composite grafting, root conditioning, and guided tissue regeneration. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1993;13(1):9-27.
55. Prabhakaran MP, Venugopal J, Ramakrishna S. Electrospun nanostructured scaffolds for bone tissue engineering. *Acta Biomater*. 2009;5(8):2884-93.
56. Montecvecchi M, Parrilli A, Fini M, Gatto MR, Muttini A, Checchi L. The influence of root surface distance to alveolar bone and periodontal ligament on periodontal wound healing. *J Periodontal Implant Sci*. 2016;46(5):303-19.

57. Melville JC, Manon VA, Blackburn C, Young S. Current Methods of Maxillofacial Tissue Engineering. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2019;31(4):579-91.
58. Acar AH, Alan H, Ozgur C, Vardi N, Asutay F, Guler C. Is More Cortical Bone Decortication Effective on Guided Bone Augmentation? *J Craniofac Surg.* 2016;27(7):1879-83.
59. Du B, Liu W, Deng Y, Li S, Liu X, Gao Y, et al. Angiogenesis and bone regeneration of porous nano-hydroxyapatite/coralline blocks coated with rhVEGF165 in critical-size alveolar bone defects in vivo. *Int J Nanomedicine.* 2015;10:2555-65.
60. Albrektsson T, Chrcanovic B, Ostman PO, Sennerby L. Initial and long-term crestal bone responses to modern dental implants. *Periodontol 2000.* 2017;73(1):41-50.
61. Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov.* 2012;11(3):234-50.
62. Araujo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F. Alveolar socket healing: what can we learn? *Periodontol 2000.* 2015;68(1):122-34.
63. Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys.* 2008;473(2):139-46.
64. Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol.* 2012;39(3):239-48.
65. Luvizuto ER, Queiroz TP, Dias SM, Okamoto T, Dornelles RC, Garcia IR, Jr., et al. Histomorphometric analysis and immunolocalization of RANKL and OPG during the alveolar healing process in female ovariectomized rats treated with oestrogen or raloxifene. *Arch Oral Biol.* 2010;55(1):52-9.
66. Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, Morony S, Tarpley J, Capparelli C, et al. osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev.* 1998;12(9):1260-8.
67. Fata JE, Kong YY, Li J, Sasaki T, Irie-Sasaki J, Moorehead RA, et al. The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell.* 2000;103(1):41-50.
68. Chen G, Sircar K, Aprikian A, Potti A, Goltzman D, Rabbani SA. Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer.* 2006;107(2):289-98.
69. Anandarajah AP, Schwarz EM. Anti-RANKL therapy for inflammatory bone disorders: Mechanisms and potential clinical applications. *J Cell Biochem.* 2006;97(2):226-32.
70. Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl).* 2001;79(5-6):243-53.
71. Reynolds MA, Aichelmann-Reidy ME, Branch-Mays GL. Regeneration of periodontal tissue: bone replacement grafts. *Dent Clin North Am.* 2010;54(1):55-71.
72. Stoecklin-Wasmer C, Rutjes AW, da Costa BR, Salvi GE, Juni P, Sculean A. Absorbable collagen membranes for periodontal regeneration: a systematic review. *J Dent Res.* 2013;92(9):773-81.
73. Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S. Healing of bone defects by guided tissue regeneration. *Plast Reconstr Surg.* 1988;81(5):672-6.

74. Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontol* 2000. 1993;1:26-35.
75. Cucchi A, Chierico A, Fontana F, Mazzocco F, Cinquegrana C, Belleggia F, et al. Statements and Recommendations for Guided Bone Regeneration: Consensus Report of the Guided Bone Regeneration Symposium Held in Bologna, October 15 to 16, 2016. *Implant Dent*. 2019;28(4):388-99.
76. Diss A, Dohan DM, Mouhyi J, Mahler P. Osteotome sinus floor elevation using Choukroun's platelet-rich fibrin as grafting material: a 1-year prospective pilot study with microthreaded implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(5):572-9.
77. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e45-50.
78. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e56-60.
79. Clark RA. Fibrin and wound healing. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:355-67.
80. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012;13(7):1131-7.
81. Elgendy EA, Abo Shady TE. Clinical and radiographic evaluation of nanocrystalline hydroxyapatite with or without platelet-rich fibrin membrane in the treatment of periodontal intrabony defects. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19(1):61-5.
82. Carlson ER. Bone grafting the jaws in the 21st century: the use of platelet-rich plasma and bone morphogenetic protein. *Alpha Omegan*. 2000;93(3):26-30.
83. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):e37-44.
84. Mosesson MW, Siebenlist KR, Meh DA. The structure and biological features of fibrinogen and fibrin. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:11-30.
85. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;101(3):299-303.
86. Chang YC, Zhao JH. Effects of platelet-rich fibrin on human periodontal ligament fibroblasts and application for periodontal infrabony defects. *Aust Dent J*. 2011;56(4):365-71.
87. Hartshorne J GH. A comprehensive clinical review of platelet-rich fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration: part 2 <https://implantpracticeus.com/> [
88. van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;936:426-37.
89. Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM. The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part II: implant surgery, prosthodontics, and survival. *Implant Dent*. 2009;18(3):220-9.

90. Shah R, M GT, Thomas R, Mehta DS. An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *Eur J Prosthodont Restor Dent*. 2017;25(2):64-72.
91. Cromack DT, Porras-Reyes B, Mustoe TA. Current concepts in wound healing: growth factor and macrophage interaction. *J Trauma*. 1990;30(12 Suppl):S129-33.
92. Saluja H, Dehane V, Mahindra U. Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *Ann Maxillofac Surg*. 2011;1(1):53-7.
93. Dohan Ehrenfest DM, Andia I, Zumstein MA, Zhang CQ, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles Ligaments Tendons J*. 2014;4(1):3-9.
94. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *J Periodontol*. 2017;88(1):112-21.
95. Al-Hamed FS, Mahri M, Al-Waeli H, Torres J, Badran Z, Tamimi F. Regenerative Effect of Platelet Concentrates in Oral and Craniofacial Regeneration. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6:126.
96. Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, et al. Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol*. 2014;40(6):679-89.
97. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clin Oral Investig*. 2017;21(8):2619-27.
98. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(5):707-13.
99. Sacco LM, Caulfield LE, Gittelsohn J, Martinez H. The conceptualization of perceived insufficient milk among Mexican mothers. *J Hum Lact*. 2006;22(3):277-86.
100. Ustaoglu G, Ercan E, Tunalı M. The role of titanium-prepared platelet-rich fibrin in palatal mucosal wound healing and histoconduction. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(7):558-64.
101. Sunitha Raja V, Munirathnam Naidu E. Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian J Dent Res*. 2008;19(1):42-6.
102. Femminella B, Iaconi MC, Di Tullio M, Romano L, Sinjari B, D'Arcangelo C, et al. Clinical Comparison of Platelet-Rich Fibrin and a Gelatin Sponge in the Management of Palatal Wounds After Epithelialized Free Gingival Graft Harvest: A Randomized Clinical Trial. *J Periodontol*. 2016;87(2):103-13.
103. Oncu E, Alaaddinoglu EE. The effect of platelet-rich fibrin on implant stability. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2015;30(3):578-82.
104. Borie E, Olivi DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltran V, et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):7922-9.
105. Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol*. 1997;24(9 Pt 2):658-68.

106. MacNeil RL, Thomas HF. Development of the murine periodontium. I. Role of basement membrane in formation of a mineralized tissue on the developing root dentin surface. *J Periodontol*. 1993;64(2):95-102.
107. Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8 Suppl):87-105.
108. Margolis HC, Beniash E, Fowler CE. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res*. 2006;85(9):775-93.
109. Miron RJ, Dard M, Weinreb M. Enamel matrix derivative, inflammation and soft tissue wound healing. *J Periodontal Res*. 2015;50(5):555-69.
110. Mrozik KM, Gronthos S, Menicanin D, Marino V, Bartold PM. Effect of coating Straumann Bone Ceramic with Emdogain on mesenchymal stromal cell hard tissue formation. *Clin Oral Investig*. 2012;16(3):867-78.
111. Miron RJ, Sculean A, Cochran DL, Froum S, Zucchelli G, Nemcovsky C, et al. Twenty years of enamel matrix derivative: the past, the present and the future. *J Clin Periodontol*. 2016;43(8):668-83.
112. Boyan BD, Weesner TC, Lohmann CH, Andreacchio D, Carnes DL, Dean DD, et al. Porcine fetal enamel matrix derivative enhances bone formation induced by demineralized freeze dried bone allograft in vivo. *J Periodontol*. 2000;71(8):1278-86.
113. Mirastschijski U, Konrad D, Lundberg E, Lyngstadaas SP, Jorgensen LN, Agren MS. Effects of a topical enamel matrix derivative on skin wound healing. *Wound Repair Regen*. 2004;12(1):100-8.
114. Suzuki N, Ohyama M, Maeno M, Ito K, Otsuka K. Attachment of human periodontal ligament cells to enamel matrix-derived protein is mediated via interaction between BSP-like molecules and integrin  $\alpha(v)\beta 3$ . *J Periodontol*. 2001;72(11):1520-6.
115. Esposito M, Grusovin MG, Papanikolaou N, Coulthard P, Worthington HV. Enamel matrix derivative (Emdogain(R)) for periodontal tissue regeneration in intrabony defects. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009(4):CD003875.
116. Abrahamsson P, Walivaara DA, Anderud J, Jimbo R. Vertical bone augmentation with titanium granule blocks in rabbit calvaria. *Clin Exp Dent Res*. 2017;3(3):100-6.
117. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36 Suppl 3:S20-7.
118. Sanz M, Dahlin C, Apatzidou D, Artzi Z, Bozic D, Calciolari E, et al. Biomaterials and regenerative technologies used in bone regeneration in the craniomaxillofacial region: Consensus report of group 2 of the 15th European Workshop on Periodontology on Bone Regeneration. *J Clin Periodontol*. 2019;46 Suppl 21:82-91.
119. Grageda E. Platelet-rich plasma and bone graft materials: a review and a standardized research protocol. *Implant Dent*. 2004;13(4):301-9.
120. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*. 2019;46 Suppl 21:92-102.
121. Sheikh Z, Hamdan N, Ikeda Y, Gryn timer M, Ganss B, Glogauer M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomater Res*. 2017;21:9.
122. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *J Foot Ankle Surg*. 1996;35(5):413-7.



123. Costantino PD, Friedman CD. Synthetic bone graft substitutes. *Otolaryngol Clin North Am.* 1994;27(5):1037-74.
124. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *J Pharm Bioallied Sci.* 2013;5(Suppl 1):S125-7.
125. Kao ST, Scott DD. A review of bone substitutes. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2007;19(4):513-21, vi.
126. Zipfel GJ, Guiot BH, Fessler RG. Bone grafting. *Neurosurg Focus.* 2003;14(2):e8.
127. Pettis GY, Kaban LB, Glowacki J. Tissue response to composite ceramic hydroxyapatite/demineralized bone implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990;48(10):1068-74.
128. Misch CM. Autogenous bone: is it still the gold standard? *Implant Dent.* 2010;19(5):361.
129. Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Br.* 2001;83(1):3-8.
130. Misch CE, Dietsh F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant Dent.* 1993;2(3):158-67.
131. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol.* 2014;7 Suppl 2:S203-17.
132. Saulacic N, Bosshardt DD, Jensen SS, Miron RJ, Gruber R, Buser D. Impact of bone graft harvesting techniques on bone formation and graft resorption: a histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):383-91.
133. Pradel W, Tenbierg P, Lauer G. Influence of harvesting technique and donor site location on in vitro growth of osteoblastlike cells from facial bone. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2005;20(6):860-6.
134. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg.* 2005;16(6):981-9.
135. Reddi AH, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *Orthop Clin North Am.* 1987;18(2):207-12.
136. Shegarfi H, Reikeras O. Review article: bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2009;17(2):206-11.
137. Bowers G, Felton F, Middleton C, Glynn D, Sharp S, Mellonig J, et al. Histologic comparison of regeneration in human intrabony defects when osteogenin is combined with demineralized freeze-dried bone allograft and with purified bovine collagen. *J Periodontol.* 1991;62(11):690-702.
138. Amler MH. Osteogenic potential of nonvital tissues and synthetic implant materials. *J Periodontol.* 1987;58(11):758-61.
139. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury.* 2011;42 Suppl 2:S16-21.
140. Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL, Jr., de la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol.* 1996;67(9):918-26.

141. Voggenreiter G, Ascherl R, Blumel G, Schmit-Neuerburg KP. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. A scanning electron microscopic study. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1994;113(5):294-6.
142. Jensen TB, Rahbek O, Overgaard S, Soballe K. No effect of platelet-rich plasma with frozen or processed bone allograft around noncemented implants. *Int Orthop.* 2005;29(2):67-72.
143. Lee MJ, Kim BO, Yu SJ. Clinical evaluation of a biphasic calcium phosphate grafting material in the treatment of human periodontal intrabony defects. *J Periodontal Implant Sci.* 2012;42(4):127-35.
144. Shetty V, Han TJ. Alloplastic materials in reconstructive periodontal surgery. *Dent Clin North Am.* 1991;35(3):521-30.
145. Shue L, Yufeng Z, Mony U. Biomaterials for periodontal regeneration: a review of ceramics and polymers. *Biomater.* 2012;2(4):271-7.
146. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg.* 1995;3(1):1-8.
147. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(3):454-64.
148. Sokolsky-Papkov M, Agashi K, Olaye A, Shakesheff K, Domb AJ. Polymer carriers for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007;59(4-5):187-206.
149. Mellonig JT. Human histologic evaluation of a bovine-derived bone xenograft in the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2000;20(1):19-29.
150. Jensen SS, Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E, Melsen F, Ruyter IE. Tissue reaction and material characteristics of four bone substitutes. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1996;11(1):55-66.
151. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials.* 2001;22(12):1599-606.
152. Nannmark U, Sennerby L. The bone tissue responses to prehydrated and collagenated cortico-cancellous porcine bone grafts: a study in rabbit maxillary defects. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2008;10(4):264-70.
153. Crespi R, Cappare P, Romanos GE, Mariani E, Benasciutti E, Gherlone E. Corticocancellous porcine bone in the healing of human extraction sockets: combining histomorphometry with osteoblast gene expression profiles in vivo. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2011;26(4):866-72.
154. Liu X, Li Q, Wang F, Wang Z. Maxillary sinus floor augmentation and dental implant placement using dentin matrix protein-1 gene-modified bone marrow stromal cells mixed with deproteinized bovine bone: A comparative study in beagles. *Arch Oral Biol.* 2016;64:102-8.
155. Zitzmann NU, Naef R, Scharer P. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1997;12(6):844-52.
156. Felice P, Marchetti C, Iezzi G, Piattelli A, Worthington H, Pellegrino G, et al. Vertical ridge augmentation of the atrophic posterior mandible with interpositional bloc grafts: bone from the iliac crest vs. bovine anorganic bone. Clinical and histological results up to one year after

- loading from a randomized-controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(12):1386-93.
157. Kim CK, Choi EJ, Cho KS, Chai JK, Wikesjo UM. Periodontal repair in intrabony defects treated with a calcium carbonate implant and guided tissue regeneration. *J Periodontol.* 1996;67(12):1301-6.
  158. Sheikh Z, Qureshi J, Alshahrani AM, Nassar H, Ikeda Y, Glogauer M, et al. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications. *Odontology.* 2017;105(1):1-12.
  159. Zhao R, Yang R, Cooper PR, Khurshid Z, Shavandi A, Ratnayake J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules.* 2021;26(10).
  160. Schenk RK, Buser D, Hardwick WR, Dahlin C. Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 1994;9(1):13-29.
  161. Khanna R, Khanna R, Pardhe ND, Srivastava N, Bajpai M, Gupta S. Pure Titanium Membrane (Ultra - Ti((R))) in the Treatment of Periodontal Osseous Defects: A Split-Mouth Comparative Study. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(9):ZC47-ZC51.
  162. Bottino MC, Thomas V, Schmidt G, Vohra YK, Chu TM, Kowolik MJ, et al. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective. *Dent Mater.* 2012;28(7):703-21.
  163. Linde A, Alberius P, Dahlin C, Bjurstam K, Sundin Y. Osteopromotion: a soft-tissue exclusion principle using a membrane for bone healing and bone neogenesis. *J Periodontol.* 1993;64(11 Suppl):1116-28.
  164. Murphy KG, Gunsolley JC. Guided tissue regeneration for the treatment of periodontal intrabony and furcation defects. A systematic review. *Ann Periodontol.* 2003;8(1):266-302.
  165. Rakhmatia YD, Ayukawa Y, Furuhashi A, Koyano K. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications. *J Prosthodont Res.* 2013;57(1):3-14.
  166. Xie Y, Li S, Zhang T, Wang C, Cai X. Titanium mesh for bone augmentation in oral implantology: current application and progress. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):37.
  167. Hammerle CH, Jung RE. Bone augmentation by means of barrier membranes. *Periodontol* 2000. 2003;33:36-53.
  168. Strietzel FP, Khongkhunthian P, Khattiya R, Patchanee P, Reichart PA. Healing pattern of bone defects covered by different membrane types--a histologic study in the porcine mandible. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2006;78(1):35-46.
  169. Duskova M, Leamerova E, Sosna B, Gojis O. Guided tissue regeneration, barrier membranes and reconstruction of the cleft maxillary alveolus. *J Craniofac Surg.* 2006;17(6):1153-60.
  170. Gentile P, Chiono V, Tonda-Turo C, Sartori S, Ciardelli G. Biomimetic materials for medical application through enzymatic modification. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2011;125:181-205.
  171. Behring J, Junker R, Walboomers XF, Chessnut B, Jansen JA. Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review. *Odontology.* 2008;96(1):1-11.

172. Bunyaratavej P, Wang HL. Collagen membranes: a review. *J Periodontol*. 2001;72(2):215-29.
173. Artas G, Gul M, Acikan I, Kirtay M, Bozoglan A, Simsek S, et al. A comparison of different bone graft materials in peri-implant guided bone regeneration. *Braz Oral Res*. 2018;32:e59.
174. Yaman F, Acikan I, Dundar S, Simsek S, Gul M, Ozercan IH, et al. Dietary arginine silicate inositol complex increased bone healing: histologic and histomorphometric study. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2081-6.
175. Gunay A, Arpag OF, Atilgan S, Yaman F, Atalay Y, Acikan I. Effects of caffeic acid phenethyl ester on palatal mucosal defects and tooth extraction sockets. *Drug Des Devel Ther*. 2014;8:2069-74.
176. Hapa O, Cakici H, Kukner A, Aygun H, Sarkalan N, Baysal G. Effect of platelet-rich plasma on tendon-to-bone healing after rotator cuff repair in rats: an in vivo experimental study. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2012;46(4):301-7.
177. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*. 1987;8(3):138-40.
178. Rocchietta I, Simion M, Hoffmann M, Trisciuglio D, Benigni M, Dahlin C. Vertical Bone Augmentation with an Autogenous Block or Particles in Combination with Guided Bone Regeneration: A Clinical and Histological Preliminary Study in Humans. *Clin Implant Dent Relat Res*. 2016;18(1):19-29.
179. McGovern JA, Griffin M, Hutmacher DW. Animal models for bone tissue engineering and modelling disease. *Dis Model Mech*. 2018;11(4).
180. Toker H, Ozdemir H, Ozer H, Eren K. Alendronate enhances osseous healing in a rat calvarial defect model. *Arch Oral Biol*. 2012;57(11):1545-50.
181. Accorsi-Mendonca T, Zambuzzi WF, Bramante CM, Cestari TM, Taga R, Sader M, et al. Biological monitoring of a xenomaterial for grafting: an evaluation in critical-size calvarial defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2011;22(4):997-1004.
182. Dundar S, Ozgur C, Yaman F, Cakmak O, Saybak A, Ozercan IH, et al. Guided bone regeneration with local zoledronic acid and titanium barrier: An experimental study. *Exp Ther Med*. 2016;12(4):2015-20.
183. Min S, Sato S, Saito M, Ebihara H, Arai Y, Ito K. Micro-computerized tomography analysis: dynamics of bone augmentation within a titanium cap in rabbit calvarium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(6):892-5.
184. Manfro R, Fonseca FS, Bortoluzzi MC, Sendyk WR. Comparative, Histological and Histomorphometric Analysis of Three Anorganic Bovine Xenogenous Bone Substitutes: Bio-Oss, Bone-Fill and Gen-Ox Anorganic. *J Maxillofac Oral Surg*. 2014;13(4):464-70.
185. Marechal M, Luyten F, Nijs J, Postnov A, Schepers E, van Steenberghe D. Histomorphometry and micro-computed tomography of bone augmentation under a titanium membrane. *Clin Oral Implants Res*. 2005;16(6):708-14.
186. Ezirganli S, Kazancioglu HO, Mihmanli A, Sharifov R, Aydin MS. Effects of different biomaterials on augmented bone volume resorptions. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(12):1482-8.
187. Lim HC, Lee JS, Jung UW, Choi SH. Bone Regenerative Potential of Enamel Matrix Protein in the Circumferential Defect Around a Dental Implant. *Implant Dent*. 2016;25(2):179-85.

188. Bodde EW, Spauwen PH, Mikos AG, Jansen JA. Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85(1):206-17.
189. 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. *J Craniomaxillofac Surg*. 2013;41(8):e191-200.
190. Lundgren AK, Lundgren D, Hammerle CH, Nyman S, Sennerby L. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(2):99-106.
191. Ito K, Minegishi T, Takayama T, Tamura T, Yamada Y, Sato S. Effects of ipriflavone on augmented bone using a guided bone regeneration procedure. *Clin Oral Implants Res*. 2007;18(1):60-8.
192. Beeton C, Garcia A, Chandy KG. Drawing blood from rats through the saphenous vein and by cardiac puncture. *J Vis Exp*. 2007(7):266.
193. Nugraha AP, Narmada IB, Ernawati DS, Dinaryanti A, Hendrianto E, Ihsan IS, et al. Osteogenic potential of gingival stromal progenitor cells cultured in platelet rich fibrin is predicted by core-binding factor subunit-alpha1/Sox9 expression ratio ( in vitro). *F1000Res*. 2018;7:1134.
194. Du J, Mei S, Guo L, Su Y, Wang H, Liu Y, et al. Platelet-rich fibrin/aspirin complex promotes alveolar bone regeneration in periodontal defect in rats. *J Periodontal Res*. 2018;53(1):47-56.
195. Han Z, Bhavsar M, Leppik L, Oliveira KMC, Barker JH. Histological Scoring Method to Assess Bone Healing in Critical Size Bone Defect Models. *Tissue Eng Part C Methods*. 2018;24(5):272-9.
196. Sacak B, Certel F, Akdeniz ZD, Karademir B, Ercan F, Ozkan N, et al. Repair of critical size defects using bioactive glass seeded with adipose-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(5):1002-8.
197. Al-Hezaimi K, Al-Askar M, Al-Fahad H, Al-Rasheed A, Al-Sourani N, Griffin T, et al. Effect of enamel matrix derivative protein on the healing of standardized epithelial wounds: a histomorphometric analysis in vivo. *Int Wound J*. 2012;9(4):436-41.
198. Esteves JC, Marcantonio E, Jr., de Souza Faloni AP, Rocha FR, Marcantonio RA, Wilk K, et al. Dynamics of bone healing after osteotomy with piezosurgery or conventional drilling - histomorphometrical, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Transl Med*. 2013;11:221.
199. Dohan Ehrenfest DM, Diss A, Odin G, Doglioli P, Hippolyte MP, Charrier JB. In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(3):341-52.
200. Thorat M, Pradeep AR, Pallavi B. Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2011;38(10):925-32.
201. Lee JW, Kim SG, Kim JY, Lee YC, Choi JY, Dragos R, et al. Restoration of a peri-implant defect by platelet-rich fibrin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012;113(4):459-63.
202. Lei L, Yu Y, Han J, Shi D, Sun W, Zhang D, et al. Quantification of growth factors in advanced platelet-rich fibrin and concentrated growth factors and their clinical efficacy as

- adjunctive to the GTR procedure in periodontal intrabony defects. *J Periodontol*. 2020;91(4):462-72.
203. Lee HJ, Choi BH, Jung JH, Zhu SJ, Lee SH, Huh JY, et al. Maxillary sinus floor augmentation using autogenous bone grafts and platelet-enriched fibrin glue with simultaneous implant placement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103(3):329-33.
  204. Horimizu M, Kubota T, Kawase T, Nagata M, Kobayashi M, Okuda K, et al. Synergistic effects of the combined use of human-cultured periosteal sheets and platelet-rich fibrin on bone regeneration: An animal study. *Clin Exp Dent Res*. 2017;3(4):134-41.
  205. Gassling VL, Acil Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J. Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(1):48-55.
  206. Shivashankar VY, Johns DA, Vidyanath S, Sam G. Combination of platelet rich fibrin, hydroxyapatite and PRF membrane in the management of large inflammatory periapical lesion. *J Conserv Dent*. 2013;16(3):261-4.
  207. Baslarli O, Tumer C, Ugur O, Vatankulu B. Evaluation of osteoblastic activity in extraction sockets treated with platelet-rich fibrin. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20(1):e111-6.
  208. Kizildag A, Tasdemir U, Arabaci T, Ozmen O, Kizildag CA, Iyilikci B. Evaluation of New Bone Formation Using Autogenous Tooth Bone Graft Combined with Platelet-Rich Fibrin in Calvarial Defects. *J Craniofac Surg*. 2019;30(6):1662-6.
  209. Agarwal A, Gupta ND, Jain A. Platelet rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: a randomized split mouth clinical trial. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(1):36-43.
  210. Cortellini P, Tonetti MS. Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontol* 2000. 2000;22:104-32.
  211. 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 Cir Bras*. 2014;29(1):59-65.
  212. Kang YH, Jeon SH, Park JY, Chung JH, Choung YH, Choung HW, et al. Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration. *Tissue Eng Part A*. 2011;17(3-4):349-59.
  213. Oliveira MR, de CSA, Ferreira S, Avelino CC, Garcia IR, Jr., Mariano RC. Influence of the association between platelet-rich fibrin and bovine bone on bone regeneration. A histomorphometric study in the calvaria of rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015;44(5):649-55.
  214. Nair MB, Varma HK, Menon KV, Shenoy SJ, John A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. *Acta Biomater*. 2009;5(5):1742-55.
  215. Nacopoulos C, Dontas I, Lelovas P, Galanos A, Vesalas AM, Raptou P, et al. Enhancement of bone regeneration with the combination of platelet-rich fibrin and synthetic graft. *J Craniofac Surg*. 2014;25(6):2164-8.
  216. Acar AH, Yolcu U, Gul M, Keles A, Erdem NF, Altundag Kahraman S. Micro-computed tomography and histomorphometric analysis of the effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in the rabbit calvarium. *Arch Oral Biol*. 2015;60(4):606-14.

217. Bolukbasi N, Yenyol 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. *Curr Ther Res Clin Exp.* 2013;75:15-21.
218. 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. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012;40(4):321-8.
219. do Lago ES, Ferreira S, Garcia IR, Jr., Okamoto R, Mariano RC. Improvement of bone repair with l-PRF and bovine bone in calvaria of rats. histometric and immunohistochemical study. *Clin Oral Investig.* 2020;24(5):1637-50.
220. Yoon JS, Lee SH, Yoon HJ. The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: a study of rabbit cranial defects. *J Craniomaxillofac Surg.* 2014;42(7):1071-7.
221. Bi J, Intriago MFB, Koivisto L, Jiang G, Hakkinen L, Larjava H. Leucocyte- and platelet-rich fibrin regulates expression of genes related to early wound healing in human gingival fibroblasts. *J Clin Periodontol.* 2020;47(7):851-62.
222. Sumida R, Maeda T, Kawahara I, Yusa J, Kato Y. Platelet-rich fibrin increases the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand ratio in osteoblasts. *Exp Ther Med.* 2019;18(1):358-65.
223. Takayama T, Suzuki N, Narukawa M, Tokunaga T, Otsuka K, Ito K. Enamel matrix derivative stimulates core binding factor alpha1/Runt-related transcription factor-2 expression via activation of Smad1 in C2C12 cells. *J Periodontol.* 2005;76(2):244-9.
224. Schwartz Z, Carnes DL, Jr., Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, et al. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J Periodontol.* 2000;71(8):1287-96.
225. Sanz M, Tonetti MS, Zabalegui I, Sicilia A, Blanco J, Rebelo H, et al. Treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins or barrier membranes: results from a multicenter practice-based clinical trial. *J Periodontol.* 2004;75(5):726-33.
226. Franke Stenport V, Johansson CB. Enamel matrix derivative and titanium implants. *J Clin Periodontol.* 2003;30(4):359-63.
227. Casati MZ, Sallum EA, Nociti FH, Jr., Caffesse RG, Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided bone regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol.* 2002;73(7):789-96.
228. Donos N, Bosshardt D, Lang N, Graziani F, Tonetti M, Karring T, et al. Bone formation by enamel matrix proteins and xenografts: an experimental study in the rat ramus. *Clin Oral Implants Res.* 2005;16(2):140-6.
229. Potijanyakul P, Sattayasansakul W, Pongpanich S, Leepong N, Kintarak S. Effects of enamel matrix derivative on bioactive glass in rat calvarium defects. *J Oral Implantol.* 2010;36(3):195-204.
230. Siciliano VI, Andreuccetti G, Siciliano AI, Blasi A, Sculean A, Salvi GE. Clinical outcomes after treatment of non-contained intrabony defects with enamel matrix derivative or guided tissue regeneration: a 12-month randomized controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2011;82(1):62-71.

231. Kawana F, Sawae Y, Sahara T, Tanaka S, Debari K, Shimizu M, et al. Porcine enamel matrix derivative enhances trabecular bone regeneration during wound healing of injured rat femur. *Anat Rec.* 2001;264(4):438-46.
232. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Nedic M, Aleksic Z, Kenney EB. A comparison between enamel matrix proteins used alone or in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol.* 2000;71(7):1110-6.
233. Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB, Madzarevic M. The effectiveness of enamel matrix proteins used in combination with bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects in humans. *J Clin Periodontol.* 2001;28(11):1016-22.
234. Baltacioglu E, Tasdemir T, Yuva P, Celik D, Sukuroglu E. Intentional replantation of periodontally hopeless teeth using a combination of enamel matrix derivative and demineralized freeze-dried bone allograft. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2011;31(1):75-81.
235. Scheyer ET, Velasquez-Plata D, Brunsvold MA, Lasho DJ, Mellonig JT. A clinical comparison of a bovine-derived xenograft used alone and in combination with enamel matrix derivative for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol.* 2002;73(4):423-32.
236. Sculean A, Barbe G, Chiantella GC, Arweiler NB, Berakdar M, Brex M. Clinical evaluation of an enamel matrix protein derivative combined with a bioactive glass for the treatment of intrabony periodontal defects in humans. *J Periodontol.* 2002;73(4):401-8.
237. Oortgiesen DA, Meijer GJ, Bronckers AL, Walboomers XF, Jansen JA. Regeneration of the periodontium using enamel matrix derivative in combination with an injectable bone cement. *Clin Oral Investig.* 2013;17(2):411-21.
238. Zhang Y, Jing D, Buser D, Sculean A, Chandad F, Miron RJ. Bone grafting material in combination with Osteogain for bone repair: a rat histomorphometric study. *Clin Oral Investig.* 2016;20(3):589-95.
239. Kobayashi E, Fujioka-Kobayashi M, Saulacic N, Schaller B, Sculean A, Miron RJ. Effect of enamel matrix derivative liquid in combination with a natural bone mineral on new bone formation in a rabbit GBR model. *Clin Oral Implants Res.* 2019;30(6):542-9.
240. Gurinsky BS, Mills MP, Mellonig JT. Clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft and enamel matrix derivative versus enamel matrix derivative alone for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol.* 2004;75(10):1309-18.
241. Qu Z, Andrukhov O, Laky M, Ulm C, Matejka M, Dard M, et al. Effect of enamel matrix derivative on proliferation and differentiation of osteoblast cells grown on the titanium implant surface. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;111(4):517-22.
242. Kauvar AS, Thoma DS, Carnes DL, Cochran DL. In vivo angiogenic activity of enamel matrix derivative. *J Periodontol.* 2010;81(8):1196-201.
243. Berlucchi I, Francetti L, Del Fabbro M, Testori T, Weinstein RL. Enamel matrix proteins (Emdogain) in combination with coronally advanced flap or subepithelial connective tissue graft in the treatment of shallow gingival recessions. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2002;22(6):583-93.
244. Narukawa M, Suzuki N, Takayama T, Yamashita Y, Otsuka K, Ito K. Enamel matrix derivative stimulates osteogenesis- and chondrogenesis-related transcription factors in C3H10T1/2 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2007;39(1):1-7.



245. Otsuka T, Kasai H, Yamaguchi K, Nishihara T. Enamel matrix derivative promotes osteoclast cell formation by RANKL production in mouse marrow cultures. *J Dent.* 2005;33(9):749-55.
246. Aydemir Turkal H, Demirer S, Dolgun A, Keceli HG. Evaluation of the adjunctive effect of platelet-rich fibrin to enamel matrix derivative in the treatment of intrabony defects. Six-month results of a randomized, split-mouth, controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2016;43(11):955-64.
247. Gupta SJ, Jhingran R, Gupta V, Bains VK, Madan R, Rizvi I. Efficacy of platelet-rich fibrin vs. enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a clinical and cone beam computed tomography study. *J Int Acad Periodontol.* 2014;16(3):86-96.
248. Seibert J, Nyman S. Localized ridge augmentation in dogs: a pilot study using membranes and hydroxyapatite. *J Periodontol.* 1990;61(3):157-65.
249. Li H, Zheng J, Zhang S, Yang C, Kwon YD, Kim YJ. Experiment of GBR for repair of peri-implant alveolar defects in beagle dogs. *Sci Rep.* 2018;8(1):16532.

## 9. EKLER

### Ek 1: Etik Kurul Kararı



T.C.  
FIRAT ÜNİVERSİTESİ  
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

#### ETİK KURULU KARARI

| Toplantı Tarihi | Toplantı Sayısı | Karar No | Protokol No | Proje Yürütücüsü            |
|-----------------|-----------------|----------|-------------|-----------------------------|
| 10.04.2019      | 2019/10         | 107      | 2019/56     | Doç. Dr. Tuba TALO YILDIRIM |

**“Ratların kalvaryumunda yapılan yönlendirilmiş doku rejenerasyonunda mine matriks proteini, plateletten zengin fibrin (PRF) ve kemik greftinin yeni kemik oluşumuna etkisinin incelenmesi”** başlıklı araştırma projenizde *127 Adet Wistar Albino veya Sprague-Dawley Rat* kullanılacağı ve hayvanlar üzerinde yapılacak girişimlerde hayvan kullanım etiği ilkelerine uyulacağı tarafınızdan beyan edilmiştir. Bu çerçevede aşağıda ismi bulunan araştırmacılara ait bu çalışmanın “Firat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Yönergesi” yönünden uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiştir.

1. Doç. Dr. Tuba TALO YILDIRIM
2. Arş. Gör. Tuğçe DÖNMEZER
3. Doç. Dr. Serkan DÜNDAR
4. Dr. Öğr. Üyesi Alihan BOZOĞLAN
5. Doç. Dr. Gökhan ARTAŞ

|           |                             |           |
|-----------|-----------------------------|-----------|
| Başkan    | Prof. Dr. Mustafa İSSİ      |           |
| Başkan V. | Prof. Dr. Gülsüm ÖKSÜZTEPE  |           |
| Üye       | Prof. Dr. Sinan CANPOLAT    |           |
| Üye       | Doç. Dr. Asiye BAŞUSTA      |           |
| Üye       | Doç. Dr. Serkan DÜNDAR      | Katılmadı |
| Üye       | Doç. Dr. Bureu GÜL BAYKALIR |           |
| Üye       | Dr. Öğr. Üyesi Eşef BOLAT   |           |
| Üye       | Vet. Hek. Özgür BULMUŞ      |           |
| Üye       | Onur UYGUR                  | Bulmadı   |
| Üye       | Murat DAĞHAN                | Bulmadı   |

## 10. ÖZGEÇMİŞ

