T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

AĞIZ, DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

YATAY TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN RAT KALVARYAL DEFEKTLERİNDE KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan

Bilal BAHAR

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Esengül ŞEN

TOKAT – 2025

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

AĞIZ, DİŞ ve ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

YATAY TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN RAT KALVARYAL DEFEKTLERİNDE KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Hazırlayan

Bilal BAHAR

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi

TEZ DANIŞMANI

Dr. Öğr. Üyesi Esengül ŞEN

TOKAT – 2025

ETİK SÖZLEŞME

T.C.

TOKAT GAZİOSMANPAŞA ÜNİVERSİTESİ

DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Bu belge ile, bu tezdeki bütün bilgilerin akademik kurallara ve etik ilkelere uygun olarak toplanıp sunulduğunu, bu kural ve ilkelerin gereği olarak, çalışmada bana ait olmayan tüm veri, düşünce ve sonuçlara atıf yaptığımı ve kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

(...../...../2025)

Bilal BAHAR

İmzası

.....

TEŞEKKÜR

Asistanlık eğitimim süresince, eğitimime özveriyle katkı sağlayan tez danışmanım *Dr. Öğr. Üyesi Esengül ŞEN*'e,

Akademik ve cerrahi vizyonu ile mesleki gelişimime ışık tutan ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen hocam *Prof. Dr. Nihat AKBULUT*'a,

Cerrahi eğitimime katkıda bulunan saygıdeğer hocalarım *Doç. Dr. Sefa ÇOLAK, Dr. Öğr. Üyesi Tolgahan KARA'ya*,

Çalışmamın deney aşaması dahil olmak üzere eğitim sürecim boyunca yol arkadaşlığını ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili *Dt. Göksal KELDAL'a,*

Hayatımı, verdikleri mutlulukla rengarenk kılan canım eşim *Kübra BAHAR'a* ve biricik kızım *Zeynep'e*,

Sonsuz sevgileriyle her daim yanımda olan, aldığım her kararda arkamda duran ve bana güvenen çok değerli annem, babam ve kardeşime,

En içten dileklerimle teşekkürlerimi sunarım.

Bilal BAHAR

YATAY TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN RAT KALVARYAL DEFEKTLERİNDE KEMİK İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Bilal BAHAR

Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi

Diş Hekimliği Fakültesi

Ağız Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı
Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Esengül ŞEN

Nisan-2025

ÖZET

Amaç: Çalışmamızda trombosit konsantrelerinin kemik iyileşmesi ve rejeneratif etkileri değerlendirilerek, Yatay Trombositten Zengin Fibrin (Y-TZF) ve Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (L-TZF) materyallerinin deneysel olarak oluşturulan kritik boyut defektlerine etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 2-3 aylık 200-400gr ağırlığında 24 adet genç-erişkin dişi wistar albino rat deney hayvanı kullanılmıştır. 1.grup kontrol grubu olup herhangi bir işlem yapılmamıştır. 2.grupta sadece ratların kafatasında kritik boyut defekti oluşturulup herhangi bir biyomateryal kullanılmamıştır. 3.gruptaki ratlara kritik boyut defekti oluşturulduktan sonra L-TZF uygulaması yapılmıştır. 4.gruptaki ratlara kritik boyut defekti oluşturulduktan sonra Y-TZF uygulaması yapılmıştır. Tüm gruptaki ratlar

operasyondan 35 gün sonrasında yüksek doz anestezi verilerek sakrifiye edilmiştir ve kafatasından alınan doku örnekleri histolojik inceleme için gönderilmiştir. Elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir ve veriler üzeriden yorumlar yapılarak çalışma sonuçlandırılmıştır.

Bulgular: Elde edilen bulgular ONC molekülünün immün ekspresyonunda, G2 grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede G1,G3 ve G4'ten düşüktür. Ayrıca ONC molekülünün immün ekspresyonu G4'e kıyasla G3 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p < 0.05$). BMP ve ALP molekülünün immün ekspresyonunda, G2 grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede G1,G3 ve G4'ten düşüktür ($p < 0.05$). İstatistiksel olarak G3 ile G4 grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca Hematoksilen-Eozin boyamada, G2'ye kıyasla rejeneratif doku oluşumu mikroskopik olarak G3 ve G4'te anlamlı derecede daha belirgindir ve G3'ün de G4'e göre üstünlüğü gözlemlenmiştir.

Sonuç: Elde ettiğimiz histopatolojik ve immünohistokimyasal bulgular değerlendirildiğinde, L-TZF ve Y-TZF uygulanan gruplarda kemik iyileşmesi üzerinde olumlu etkileri gözlemlenmiştir. Kemik iyileşmesinde değerlendirdiğimiz osteojenik belirteçlerden sadece ONC ekspresyonu L-TZF Y-TZF'ye göre üstün bulunmuş olup haricinde L-TZF ve Y-TZF arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Konuyla ilgili daha detaylı sonuç elde edebilmek için kemik iyileşmesinde değerlendirilen osteojenik belirteçlerin ve denek sayısının arttırılması kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Defekt , L-TZF, Rat, Y-TZF.

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF HORIZONTAL PLATELET-RICH FIBRIN ON BONE HEALING IN RAT CALVARIALE DEFECTS

Bilal BAHAR

Tokat Gaziosmanpasa University

Faculty of Dentistry

Department of Oral and Maxillofacial Surgery

Specialization Thesis in Dentistry

Supervisor: Dr. Öğr. Üyesi Esengül ŞEN

April-2025

ABSTRACT

Objective: The aim of our study was to evaluate the bone healing and regenerative effects of platelet concentrates and to investigate the effect of Horizontal Platelet Rich Fibrin (H-PRF) and Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (L-PRF) materials on experimentally created critical size defects.

Materials and Methods: In our study, 24 young-adult female Wistar albino rats, 2-3 months old and weighing 200-400 grams, were used. Group 1 was the control group and no procedure was performed. In Group 2, only a critical size defect was created in the skulls of the rats and no biomaterial was used. After the critical size defect was created in the rats in Group 3, L-TZF was applied. After the critical size defect was created in the rats in Group 4, Y-TZF was applied. All rats in the group were sacrificed by high-dose anesthesia 35 days after the operation and tissue samples taken from the skull were sent

for histological examination. The results obtained were evaluated statistically and the study was concluded by making comments on the data.

Results: The findings obtained showed that in the immune expression of ONC molecule, G2 group was statistically significantly lower than G1, G3 and G4. In addition, the immune expression of ONC molecule was statistically significantly higher in G3 group compared to G4 ($p < 0.05$). In the immune expression of BMP and ALP molecule, G2 group was statistically significantly lower than G1, G3 and G4 ($p < 0.05$). No statistically significant difference was found between G3 and G4 groups. In addition, in Hematoxylin-Eosin staining, regenerative tissue formation was significantly more evident in G3 and G4 microscopically compared to G2, and G3 was superior to G4.

Conclusion: When the histopathological and immunohistochemical findings we obtained were evaluated, positive effects on bone healing were observed in the L-TZF and Y-TZF applied groups. Among the osteogenic markers we evaluated in bone healing, only ONC expression was found to be superior to L-TZF Y-TZF, and apart from that, no significant difference was found between L-TZF and Y-TZF. We believe that the number of osteogenic markers and subjects evaluated in bone healing should be increased in order to obtain more detailed results on the subject.

Keywords: Defect, L-PRF, Rat, H-PRF.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ETİK SÖZLEŞME ..... **i**
TEŞEKKÜR ..... **ii**
ÖZET ..... **iii**
ABSTRACT ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
TABLOLAR LİSTESİ ..... **x**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **xi**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xiv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **3**
2.1. KEMİK DOKUSU **3**
2.2. KEMİK YAPISI **3**
2.2.1.Kemiğin Makroskobik Yapısı 3
2.2.1.1. Kortikal Kemik 4
2.2.1.2. Trabeküler Kemik 5
2.2.2. Kemiğin Mikroskobik Yapısı 6
2.2.2.1. Primer Kemik 6
2.2.2.2. Sekonder Kemik 7
2.2.2.3. Kompozit ve Bundle Kemik 7
2.2.3. Kemiğin Moleküler Yapısı 8
2.2.3.1. Organik Bileşenler 8
2.2.3.2. Kolajen 8
2.2.3.3. Kolajen Olmayan Proteinler 9
2.2.3.4. İnorganik Bileşenler 9
2.2.3.5. Hidroksiapatit 10
2.3. Kemik Hücreleri **10**
2.3.1. Osteoblastlar 10
2.3.2. Osteoklastlar 12
2.3.3. Osteositler 14
2.3.4. Osteoprogenitör Hücreler (Osteojenik Prekürsör Hücreler) 16
2.4. Kemik Oluşumu (Osteogenezis) **16**

2.4.1. İntramembranöz Kemikleşme 17
2.4.2. Endokondral Kemikleşme 18
2.5. Kalsifikasyon Mekanizması....19
2.6. Kemik Büyümesi ve Şekillenmesi....19
2.7. Kemiğin Hücresel İşlevlerinde Etkili Sistemik Düzenleyiciler....20
2.7.1. Sistemik Düzenleyiciler....20
2.7.1.1. Paratiroid Hormon (PTH) ve Kalsitonin....20
2.7.1.2. Steroid Reseptörleri, Glukokortikoidler, Östrojen ve Androjen .21
2.8. Kan Kaynaklı Biyomateryallerin Gelişimi....22
2.9.Trombosit Konsantreleri....23
2.9.1. Saf Trombositten Zengin Plazma (S-TZP)....27
2.9.2. Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma (L-TZP)....27
2.9.3. Saf Trombositten Zengin Fibrin (S-TZF)....27
2.9.4. Lökosit ve Trombosit Zengin Fibrin (L-TZF) 28
2.10. Yakın Zamanda Geliştirilen Trombosit Konsantreleri 29
2.10.1. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (L-TZF)....29
2.10.2. Otojen Fibrin Yapıştırıcı (OFG)....30
2.10.3. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin (A-TZF)....31
2.10.4. Titanyum Tüplerle Hazırlanmış Trombositten Zengin Fibrin (T-TZF) 31
2.10.5. Enjekte Edilebilen Trombositten Zengin Fibrin (I-TZF) 32
2.10.6. Yatay Trombositten Zengin Fibrin (Y-TZF) 33
2.11. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Hazırlanışı 35
2.12. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin İçeriği....38
2.12.1. Trombositler....38
2.12.2. Alfa Granüller 39
2.12.3. Lökositler....39
2.12.4. Fibrin 41
2.13. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Biyolojik Etkileri 41
2.13.1. Anjiyogenezin Düzenlenmesi 42
2.13.2. Bağışıklığın Desteklenmesi 42
2.13.3. Yara Örtücülüğü....42
3. GEREÇ VE YÖNTEM 44
3.1. Etik Kurul Onayı....44

3.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması 44
3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması 44
3.4. Deneye Hazırlık 45
3.5. Deneklerin Opere Edilmesi 46
3.6. Sakrifikasyon 51
3.7. Doku Örneklerin Hazırlanması 51
3.8. Histopatolojik Değerlendirme 52
3.8.1. Doku Takibi 52
3.8.2. Hematoksilen-Eozin Boyama 52
3.8.3. Histopatolojik Analiz 52
3.8.4. İmmünohistokimyasal Boyama 52
3.8.5. İmmünohistokimyasal Analiz 53
3.8.6. İstatistiksel Analiz 54
4. BULGULAR 55
4.1. Histopatolojik Analiz Sonucu 55
4.2. İmmün histokimyasal Analiz Sonuçları 56
5. TARTIŞMA 61
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 72
7. KAYNAKÇA 74

TABLOLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: Kemiğin mikroskobik yapısı 8
Tablo 2.2: Trombosit konsantrelerinin çeşitleri ve kısaltmaları..... 25
Tablo 3.1: İmmün boyanma şiddeti derecelendirme kriterleri..... 54
Tablo 4.1: ONCHs, BMPHs, ALP moleküllerin immün boyanma şiddeti H-skorları grup ortalama değerleri 57

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2. 1: Kemiğin yapısı.....6
Şekil 2.2: Osteositler 15
Şekil 2.3: (1) İntramembranöz kemikleşme. (2) Mezenkimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesi. (3) Mezenşim hücreleri hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücrelere farklılaşarak, sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler. 17
Şekil 2.4: Enkondral kemikleşme. **(A)** Hyalin kıkırdak modeli **(B)** Diyafiz kıkırdağını saran perikondriyumun iç katmanındaki mezenkim hücrelerinin osteoprogenitör hücrelere, onların da osteoblastlara dönüşmesi. Osteoblastlar üst üste yığılan kemik lamellerini oluşturur. Böylece yeni oluşan kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında kemik manşet oluşur. **(C)** Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesini engelleyerek, kondrositlerde hipertrofiye ve ardından ölümlerine sebep olur. Kıkırdak modelin ortasında kemik iliği kavitesi oluşur. **(D)** Kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler çoğalarak alt alta dizilen grupları oluşturur. **(E)** Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece epifiz plağı kalır. 18
Şekil 2.5: A: PRGF süpernatantı. B: Aktif sıvı PRGF. C: PRGF pıhtı. D: Otojen fibrin membran. 25
Şekil 2.6: Santrifüj kuvveti altında kanın bileşenlerine ayrılması 26
Şekil 2.7: Santrifüj sonrasında, kanın parçacık kütlesine bağlı olarak bileşenleri ayrılır. En altta eritrositler, ortada lökositler ve üstte plazmanın içinde azalan yoğunlukta dağılmış trombositler tüpün üst kısmında bulunur. 27
Şekil 2.8: L-TZF bölümleri.....29
Şekil 2.9: TZF kutusu 30
Şekil 2.10: 4 saat boyunca inkübe edilen E. coli ve S.aureus bakteri kolonisinin L-TZF ve Y-TZF katmanıyla kantitatif analizi.....34
Şekil 2.11: L-TZF protokolünü takiben tüpte oluşan tabakalar 36
Şekil 2.12: Santrifüj işlemi sonrasında TZF'nin doğal görünümü ve membran formuna dönüştürülmüş hali.....36
Şekil 2.13: Choukroun'un geliştirdiği TZF kutusu 37
Şekil 2.14: TZF'in TZF kutusunda silindir disk haline getirilmesi.....37

Şekil 2.15: TZF'nin polimerizasyonu sonucunda meydana gelen fibrin ağının bilgisayar ortamında tasarlanmış üç boyutlu modeli. 1: Fibrin ağı içindeki sitokinler. 2: Fibrin polimerlerinin dışında kalan solüsyondaki trombosit sitokinleri. 3: Fibrin ile ilişkili glikanik zincirler. 4: Dolaşımdaki glikoproteinler (fibronektin). 5: Glikanik zincirler ve sitokinler ile bağlantılı fibriller.....41
Şekil 3.1: Ratların frontal bölgelerinin traş edilmesi ve antisepsisi.....45
Şekil 3.2: Kullanılan TZF(trombositten zengin fibrin) kutusu, cam tüp ve kan almak için enjektör.....46
Şekil 3.3: İnsizyon ve elevasyonun ardından kemik dokusunun açığa çıkarılması.....47
Şekil 3.4: Defekt oluşturmak için kullanılan trefan frez kullanılması.....47
Şekil 3.5: Trefan frez kullanılarak defekt hattının oluşturulması ve defekt hattındaki kemiğin çıkarılması.....48
Şekil 3.6: Kafatasındaki defektin görünümü ve çıkarılan kemik parçası.....48
Şekil 3.7: L-TZF elde etmek için kullanılan Electromag M815P santrifüj cihazı.....49
Şekil 3.8: H-TZF elde etmek için kullanılan Electromag M815 A2(açılır başlık) santrifüj cihazı.....49
Şekil 3.9: Elde edilen TZF ve TZF kutusuna konulması.....50
Şekil 3.10: Elde edilen TZF'nin defekt bölgesine uygulanışı.....51
Şekil 3.11: Alınan doku örneklerinin bazıları.....51
Şekil 4.1: Gruplardan temsili örnek kafatası kemiği defekt alanı ve defekt bölgesinde oluşan rejeneratif doku mikroskobik görüntüleri. G1 de normal histolojik yapıda sıçan kafatası kemik doku, G2 de çevre intakt kemik doku ve ortada yeni oluşmuş olan rejeneratif doku, G3 de çevre intakt kemik doku ve ortada defekt alanında yeni oluşmuş büyükçe yer kaplamış olan rejeneratif doku, G4 de çevre intakt kemik doku ve ortadaki defekt alanında yeni oluşmuş orta düzeyde yer kaplamış olan rejeneratif doku görülmekte. *****: defekt alanında yeni oluşmuş rejeneratif dokuyu işaret etmekte (Hematoksilen eozin, Scale bars: 30 µm). 56
Şekil 4.2: Gruplarda ONC molekülü immün ekspresyonlarının immün histokimyasal boyanma şiddeti H-skor değerleri karşılaştırmalı grafiksel görünümü. Barlar üzerindeki harfler istatistiksel olarak farklılık ve benzerlikleri gösterir. 58

Şekil 4.3: Gruplarda BMP molekülü immün ekspresyonlarının immün histokimyasal boyanma şiddeti H-skor değerleri karşılaştırmalı grafiksel görünümü. *: $p < 0.05$ (G2 istatistiksel olarak diğer gruplardan farklı; G1, G3 ve G4 istatistiksel olarak benzer)...58
Şekil 4.4: Gruplarda ALP molekülü immün ekspresyonlarının immün histokimyasal boyanma şiddeti H-skor değerleri karşılaştırmalı grafiksel görünümü. *: $p < 0.05$ (G2 istatistiksel olarak diğer gruplardan farklı; G1, G3 ve G4 istatistiksel olarak benzer)...59
Şekil 4.5: Her bir gruptan ONC, BMP, ALP molekülleri için immünohistokimyasal boyalı temsili mikroskobik resimler bulunmaktadır. (IHC- AEC, Scale bars: 25 µm). .60

SİMGELER VE KISALTMALAR

% : Yüzde

α : Alfa

µm : Mikrometre

m^2 : Metrekare

mm^3 : Milimetreküp

ADP : Adenozin Difosfat

AEC : Amino etil karbozol kromojen

ALP : Alkalen Fosfataz

ark : Arkadaşları

ATP : Adenozin Trifosfat

A-TZF : Geliştirilmiş Trombositten Zengin Fibrin

BMP : Kemik Morfogenetik Protein

CaSR : Kalsiyum Algılayıcı Reseptörler

cm : Santimetre

CO_2 : Karbondioksit

CSF : Koloni Uyarıcı Faktör

dk : Dakika

EDTA : Etilendiamintetraasetik asit

EGF : Epidermal Büyüme Faktörü

FGF : Fibroblast Büyüme Faktörü

ELISA : Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi

FXIII : Faktör 13

GAG : Glikozaminoglikan

gr : Gram

HA : Hidroksiapatit

H2O2 : Hidrojen peroksit

HRP : Streptavidin-horseradish peroxidase conjugated reagent

IGF : İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü

IL- 1 : İnterlökin 1

IL- 4 : İnterlökin 4

IL- 6 : İnterlökin 6

I-TZF : Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin

KBF : Konsantre Büyüme Faktörü

L-TZF : Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin

L-TZP : Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma

kg : Kilogram

lt : Litre

mg : Miligram

ml : Mililitre

mm : Milimetre

mM : Milimolar

MMP-3 : Matriks Metalloproteinaz-3

nm : Nanometre

OFG : Otojen Fibrin Yapıştırıcı

ONC : Osteonektin

OP : Osteojenik Protein

OPG : Osteoprotegerin

PBS : Fosfat Buffer Solüsyonu

PDGF : Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü

PRGF : Büyüme Faktöründen Zengin Plazma

PTH : Paratiroid Hormon

PTHrP : Paratiroid Hormon İlişkili Protein

RANKL : Nükleer Faktör Kappa-B Ligandının Reseptör Aktivatörü

RCF : Göreceli Santrifüj Kuvveti

RPM : Dakikadaki Tur Sayısı

SEM : Standart eror mean

S-TZF : Saf Trombositten Zengin Fibrin

S-TZP : Saf Trombositten Zengin Plazma

TFP : Trombositten Fakir Plazma

TGF : Dönüştürücü Büyüme Faktörü

TGF-β : Dönüştürücü Büyüme Faktörü Beta

TNF -α : Tümör Nekroz Faktör-alfa

T-TZF : Titanyum Tüplerle Hazırlanmış Trombositten Zengin Fibrin

TZF : Trombositten Zengin Fibrin

TZFM : Trombositten Zengin Fibrin Matriks

TZP : Trombositten Zengin Plazma

VEGF : Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü

Y-TZF : Yatay Trombositten Zengin Fibrin

1. GİRİŞ

Ağız, diş ve çene cerrahisi, temel olarak kemik dokusu üzerine odaklanmaktadır. Bu alan, özellikle kemik yapısının tedavi edilmesi ve iyileştirilmesi gereken durumlarla ilgilenir. Kemik, yaşam boyunca meydana gelen yaralanmalara karşı kendini yüksek rejenerasyon kapasitesiyle onarabilen, çoğu zaman skar dokusu oluşmadan iyileşebilen özel bir dokudur. Küçük kemik kayıplarında cerrahi müdahaleye gerek kalmaksızın doğal iyileşme süreci devreye girerken, daha büyük boyutlu kemik defektlerinde bu durum gözlenmeyebilir (Aybar Odstrcil vd., 2005).

Geçmişten günümüze kadar bilim insanları, kemik defektlerinin onarımında yeni kemik yapımını uyarabilecek özellikler içeren biyomateryaller üzerinde çalışmaktadırlar (ÖZEÇ vd., 2007). Trombosit konsantrelerinin iyileşmeyi olumlu yönde etkilediği ve bu özelliklerinden yararlanma görüşü Whitman tarafından ortaya atılmıştır (Whitman vd., 1997). Trombositler, hemostazda kritik bir rol oynar ve aynı zamanda çeşitli büyüme faktörlerinin salınımını sağlayan doğal bir kaynaktır. Salınımını sağladıkları bu büyüme faktörleri arasında trombosit türevli büyüme faktörü (PDGF), transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) gibi moleküller bulunmaktadır. Bu faktörlerin salınımı, trombositlerin aktivasyonu ile tetiklenir ve bu süreç, onarımda önemli rol oynar (Pripatnanont vd., 2013). Trombosit içerikli ürünler hücre çoğalması, matrisin olgunlaşması ve damar oluşumunu da tetiklemektedir (Balcı & Toker, 2012).

Yara iyileşmesinde görev alan gerekli bileşenleri bünyesinde barındıran kan kaynaklı ürünler, bu bileşenleri fibrin temelli bir matriks içerisinde sunan tedavi edici biyomateryaller olarak değerlendirilmektedir. Anjiyogenezin düzenlenmesi, bağışıklığın desteklenmesi, yara örtücülüğü gibi önemli görevleri üstlenir (Choukroun vd., 2006b; Dohan vd., 2006a, 2006d). Büyüme faktörlerini kademeli olarak serbest bırakarak inflamasyonu kontrol etme kapasitesine sahip olup, bağışıklık sistemini düzenleyici bir rol üstlenir. Cerrahi işlemler inflamasyona yol açabileceği için, trombositten zengin fibrin (TZF)'nin kullanımı yaralı dokuların iyileşme sürecinde olumlu katkılar sağlamaktadır (Dohan vd., 2006d).

Santrifüj süresi ve hızında değişiklikler yaparak büyüme faktörleri ile hücre miktarını optimize etmeyi hedefleyen araştırmacılar, çeşitli otojen biyolojik materyaller

geliştirmişlerdir (Fujioka-Kobayashi vd., 2017). Döndürme ve santrifüj kuvvetlerinin ayarlanmasıyla hem sert hem de yumuşak doku rejenerasyonunu teşvik edebilen A-TZF, L-TZF ve Y-TZF ve I-TZF geliştirilmiştir. Bu TZF çeşitliliği alınan kan örneklerinin farklı devir ve sürelerde santrifüj edilmesiyle elde edilir. Bu uygulanan farklı santrifüj kuvvetleri ve açılarda yapılan değişikliklerle büyüme faktörü konsantrasyonundan etkili bir şekilde faydalanarak rejeneratif özellikler artırılmaya çalışılmıştır (Miron vd., 2017). Yatay santrifüj yöntemi, TZF'nin hücre tabakalarını daha etkili bir şekilde ayırmasına olanak tanırken, santrifüj tüplerinin yüzeylerinde hücrelerin birikmesini en aza indirdiği gösterilmiştir (Kubesch vd., 2019). Yapılan çalışmalarda yatay santrifüjlemenin, geleneksel açılı santrifüjlemeye oranla immun sistem hücrelerinin daha fazla olduğu ortaya koyulmuştur. Trombositlerin ve lökositlerin enfeksiyona karşı savunmasında kritik bir role sahip olduğu düşünüldüğünde, yatay santrifüjleme (Y-TZF) ile elde edilen TZF, geleneksel olarak üretilen TZF'den daha fazla antibakteriyel etki gösterebilir. Literatürde yatay santrifüjleme ile hazırlanan TZF'nin geleneksel TZF'ye göre S.aureus ve E.coli'ye karşı önemli miktarda daha iyi antibakteriyel etki gösterdiği ispatlanmıştır (Feng vd., 2020).

Bu çalışmanın amacı trombosit konsantrasyonlarının rejeneratif etkileri göz önünde bulundurularak, ratların kalvaryalarında oluşturulan kritik boyutlu defektlerde, ratların kendi kanından elde edilen Y-TZF ve L-TZF materyallerinin kemik iyileşme süreci üzerindeki etkilerinin ve birbirlerine göre kıyaslanmasının histolojik olarak incelenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. KEMİK DOKUSU

Kemik dokusu, kalsiyum ve fosfat tuzlarının mineralize olarak kolajen matrisle birleştiği, canlı bir bağ dokusudur. İskelet sistemi, organizmanın yapısal desteğini sağlayan kemik dokusu tarafından desteklenir. Bu doku, kalsiyum depolayarak endokrin sistemin önemli bir parçası olur. Kemik dokusu, osteoblast ve osteoklast hücrelerinin denetiminde sürekli olarak yeniden şekillenir. Ayrıca, kemik dokusu kan hücrelerinin üretildiği bir yer olarak dolaşım ve bağışıklık sisteminin temelini oluşturur .

Kemik dokusu hem organik hem de inorganik bileşenlerden oluşur. Organik bileşenlerin büyük kısmını %80-90 oranında Tip I kolajen oluştururken, geri kalan kısmı proteoglikanlar, çeşitli proteinler, büyüme faktörleri ve sitokinlerle tamamlanır. Kemiklerin kuru ağırlığının %65'ini oluşturan inorganik bileşenlerde ise çoğunlukla hidroksiapatit (HA) kristalleri bulunur. Ayrıca, bu inorganik bileşenler içinde az miktarda fosfor, bikarbonat, sitrat, sodyum, potasyum ve magnezyum da yer alır (Garg Arun K., 2004; Haghighi, 1989).

Kemik dokusunun yapısı incelendiğinde, en dışta kortikal kemik ya da kompakt kemik olarak adlandırılan tabaka görülür. Bu tabakanın altında ise trabeküler kemik ya da kansellöz kemik adı verilen ve metabolik süreçlerin gerçekleştiği bir bölge bulunur (Bajada vd., 2008).

2.2. KEMİK YAPISI

Kemik yapısal olarak 3 farklı boyutta incelenebilir; makroskobik, mikroskopik ve moleküler yapı.

2.2.1.Kemiğin Makroskobik Yapısı

Makroskobik açıdan incelendiğinde, kemik dokusu trabeküler (süngerimsi ya da kansellöz) ve kortikal (kompakt) kemik olarak ayrı sınıflandırılabilir. Kortikal kemik genellikle uzun kemiklerin gövdelerinde bulunurken, kemiğin distal ve proksimal uçlarında trabeküler kemik ile örtülüdür. Trabeküler kemik ise uzun kemiklerde kortikal kemik tabakasının altında, omurlarda ve küçük kemiklerin iç bölgelerinde yer alır (Wang vd., 2010).

Genellikle her kemik bölgesinde hem kortikal hem de trabeküler kemik bulunur; ancak bu kemiklerin oranları bölgeden bölgeye farklılık gösterebilir. Ayrıca, bazı kemiklerde kemik iliği adı verilen, esas olarak kan hücrelerinin üretimiyle görevli, kan damarları ve sinirler içeren bir yapı da bulunur (Şekil 2.1) (Garg Arun K., 2004).

2.2.1.1. Kortikal Kemik

İnsan iskeletinin büyük çoğunluğunu oluşturan kortikal kemik, önem arz eden organları koruma, hareketi destekleme ve uygulanan kuvvetlere karşı direnç sağlama gibi önemli işlevlere sahiptir. Kortikal kemik, sert ve yoğun bir kitleden oluşur ve içinde mikroskobik düzeyde kanalcıklar barındırır. Bu kanalcıklar, lamel adı verilen kemik katmanları tarafından oluşturulur. Özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgelerinde bulunan bu lameller dört ana tipe ayrılır: Dış çevresel lameller kemik dış yüzeyine paralel olarak düzenlenmiş lamellerdir; iç çevresel lameller, kemik iç yüzeyine paralel olarak düzenlenmiş lamellerdir; osteonlar (Haversian Sistemleri), merkezi bir kanalı çevreleyen düzenli lamellerden oluşan yapılar olarak bulunur; ve interstisyel lameller osteonlar arasındaki boşluklarda bulunan ve daha düzensiz bir yapı gösteren lamellerdir (Garg Arun K., 2004; Haghighi, 1989).

Periostun en alt tabakasında bulunan dış çevresel lameller, diyafizin en dış tabakasını oluşturur ve periost ile kemik arasında sıkı bir bağlantı sağlar. Bu bağ, içerisinde bulunan Sharpey lifleri sayesinde gerçekleştirilir. İç çevresel lameller, dış çevresel lamellere benzer bir düzen gösterir ve spongioz kemik trabekülleri bu tabakaya bağlı olarak gelişir, böylece kemik iliğine doğru genişler (Gartner & Hiatt, 2011).

Haversian kanal sistemi veya osteonlar, kortikal kemikteki kan damarlarının etrafında düzenlenmiş silindirik bir yapı oluşturur. Osteonlar, kemiğin uzun aksına paralel olarak düzenlenmiş olup, yaklaşık 200 μm çapındadır. Bu osteonların merkezinde, yaklaşık 50 μm çapında olan ve kan damarları ile sinirleri içeren Haversian kanalları bulunur. Osteoblast ve osteoprogenitör hücre tabakası, bu Haversian kanallarının iç yüzeyini kaplar. Ayrıca, Haversian kanalları ile bağlantılı olarak, kemik yüzeyine dik yönde seyreden Volkmann kanalları, osteonların birbirleriyle ve kemik dış yüzeyiyle iletişimini sağlar. Bu Volkmann kanallarının çevresinde herhangi bir lamel sistemi bulunmaz. Lameller arasında yer alan osteositler, kanalükuli adı verilen ince iletişim

kanalları aracılığıyla hem komşu hücrelerle hem de Haversian ve Volkmann kanallarıyla iletişim kurar (Garg Arun K., 2004; Gartner & Hiatt, 2007; Haghighi, 1989).

Osteonlar, Haversian kanalının çevresinde halka şeklinde dizilmiş lamellerden oluşur. Öncelikle en dış tabaka oluşur ve sonrasında içe doğru ilerleyerek lamel sayısı kademeli olarak artar. Tipik bir Havers kanalı etrafında ortalama 4 ile 20 arasında lamel yer alabilir. Bu sayıyı belirleyen faktör, lameller içindeki hücrelerin beslenme kapasiteleridir. Hücrelerin yeterli metabolik alışveriş yapabilmesi için, her hücrenin en yakın kan damarına olan uzaklığı en fazla 300 μm olmalıdır. Kortikal kemiğin porozitesi; Haversian sistemleri, Volkmann kanalları ve kemik rezorpsiyonuna bağlı oluşan boşluklar tarafından şekillendirilir. Osteoklastların kemik remodelleme sürecinde oluşturduğu geçici boşluklar rezorbsiyon kaviteleri olarak adlandırılır. Ayrıca, osteositler kemik matrisine gömüldüğü lakünalar ve bu lakünalardan uzanan haberleşme kanalları olan kanalikuliler bulunur (Garg Arun K., 2004; Haghighi, 1989).

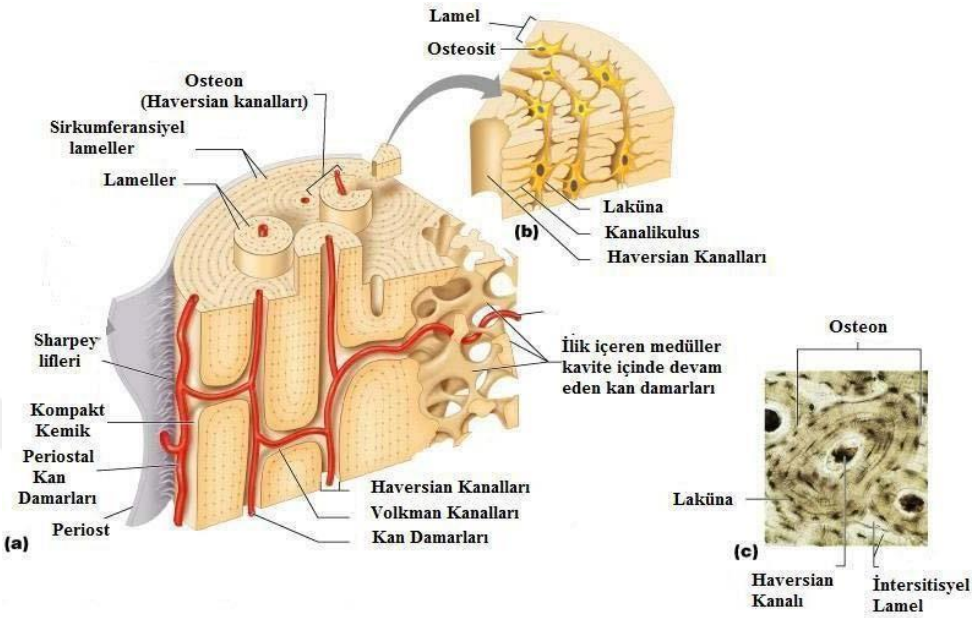
2.2.1.2. Trabeküler Kemik

Trabeküler kemik, kanselöz kemik veya süngerimsi kemik olarak da bilinir. Bu yapı, düz kemiklerde, omurlarda ve uzun kemiklerin medullar boşlukları ile metafiz bölgelerinde bulunur. Trabeküler kemiklerin matrisinde, her biri yaklaşık 200 μm kalınlığında olan ve kafes benzeri bir düzen içinde yerleşmiş trabekül adı verilen üç boyutlu yapısal elemanlar bulunur (Garg Arun K., 2004; R. B. Martin vd., 2015; Wang vd., 2010).

Gözenekli bir morfolojiye sahip olan trabeküler kemik, bu gözenekler aracılığıyla kemik iliğiyle ilişkili bir yapı oluşturur. Trabeküler kemikte, gözenekli yapının oranı %75 ile %95 arasında değişir. Kan hücrelerinin üretimi sırasında veya mezenkimal kök hücreler için depo olarak kullanıldığında, bu yapılar kırmızı renktedir. Ancak, zamanla yağ depolaması için kullanıldığında bu gözenekler sarı renge dönüşür (Garg Arun K., 2004; Wang vd., 2010).

Trabeküllerin dizilimi genellikle rastgele olmakla birlikte, bazı bölgelerde, özellikle iliak kemikte olduğu gibi, gelen fonksiyonel kuvvetlere göre belirli bir düzen gösterirler. Bu bölgelerde trabeküller, kuvvetlerin yönünü ve şiddetini karşılamak için

özel bir düzen içinde yerleşirler. Ancak, bu dizilimler paralel olmayıp, girintili ve çıkıntılı bir yapı oluşturacak şekilde dağılır (Cowin, 2001).



Şekil 2. 1: Kemiğin yapısı

(Lynch vd., 2007)

2.2.2. Kemiğin Mikroskobik Yapısı

Kemiğin makroskobik olarak iki ana tipi bulunur: kortikal ve trabeküler. Mikroskobik düzeyde ise kemik, primer kemik ve sekonder kemik olarak iki ana kategoriye ayrılır. Ayrıca, kompozit ve bundle (demet) olarak adlandırılan kemik türleri de mevcuttur. Kemik dokusunun yapısını oluşturan ve metabolizmasına katkıda bulunan temel hücreler, osteositler, osteoblastlar, osteoprogenitör hücreler ve osteoklastlardır (Haghighi, 1989).

2.2.2.1. Primer Kemik

Woven kemik olarak da adlandırılan immatür kemik, genellikle fetal gelişim sürecinde veya kırık iyileşmesi sırasında ortaya çıkan, geçici ve yapısal olarak düzensiz bir kemik formudur. Bu tür kemik, daimî olarak bulunabileceği yerlerle sınırlıdır; bunlar arasında kafatasındaki düz kemiklerin suturları, diş soketleri ve bazı tendonların bağlanma bölgeleri yer alır. Primer kemik, yetişkinlerde yaşam boyunca sekonder

kemikle yer değiştirir; bu süreç sürekli bir döngü halinde gerçekleşir ve bu sürece remodeling denir. Primer kemik sekonder kemikle kıyaslandığında kolajen lifleri düzensizdir ve mineral içeriği daha düşük olmasına rağmen osteosit oranı daha yüksektir (Gartner & Hiatt, 2011; Weiner & Traub, 1992).

Olgunlaşmamış kemik, iyileşme sürecinde büyük önem taşır ve kemik iyileşmesine katkıda bulunur. Ancak, organize olmayan yapısı nedeniyle mekanik olarak güçsüzdür. Bu geçici yapı, iyileşme sürecinin ilerleyen aşamalarında hızla mineralize olarak sekonder kemikle yer değiştirir (Garg Arun K., 2004).

2.2.2.2. Sekonder Kemik

Sekonder kemik, aynı zamanda lameller veya gelişimini tamamlamamış (immatür) kemik olarak da adlandırılır ve genellikle yetişkinlerde bulunur. Bu kemik türü, primer kemiğe göre daha yüksek derecede kalsifiye olmuş bir matrise sahiptir. Sekonder kemik, Haversian kanalları çevresinde paralel veya eş merkezli olarak düzenlenmiş lamellerden oluşur (Gartner & Hiatt, 2011; Mescher & Junqueira, 2013).

Sekonder kemik, organize kolajen lifleri ve yüksek mineralizasyon düzeyi sayesinde mekanik kuvvetlere dirençli bir yapıya sahiptir. Haversian kanalından dışarıya doğru incelendiğinde, her lamel içinde bulunan kolajen lifleri paralel ve sarmal bir düzen gösterir. Bu lifler, komşu lamellerdeki kolajen lifleriyle ters yönde sarmal yapılar oluşturur ve birbirlerini dik açıyla keserler. Bu özel yapı, ışık mikroskobunda Havers kanalları çevresinde aydınlık ve koyu bölgelerin oluşmasına neden olurken, aynı zamanda kemiğin basınç ve burulma kuvvetlerine karşı dayanıklılığını artırır. Sekonder kemiğin büyüme hızı, primer kemiğe göre çok daha yavaş olup, günlük 0,6-1 mm arasında değişir (Tablo 2.1) (Cibicková vd., 2007; Garg Arun K., 2004).

2.2.2.3. Kompozit ve Bundle Kemik

Kompozit kemik, kemik yapısının primer-sekonder dönüşümü sürecinde ortaya çıkan geçici bir yapı olarak tanımlanır. Buna karşın, bundle kemik; ligamanlar ve eklem bölgelerinde, liflere paralel yerleşimli özel bağlantı yapılarıyla karakterize edilen temel kemik formudur (Garg Arun K., 2004).

Tablo 2.1: Kemiğin mikroskobik yapısı

Mikroskobik Görünüm	Alt Tip	Özellikleri	Örnek
Primer Kemik	Kansellöz	Kortikal kemikten daha elastik	Distal femoral metafiz
	İmmatür	Stres yönelimli değil	Embriyonik iskelet, Kırık kallusu
	Patolojik	Rastgele organizasyon Artmış döngü Zayıf ve esnek yapı	Osteojenik sarkom, Fibröz displazi
Sekonder Kemik	Kortikal	Yapı, güçlü ve stres çizgileri boyunca yönelmiştir	Femur

(Özer, 2017)

2.2.3. Kemiğin Moleküler Yapısı

Kemik dokusu, moleküler düzeyde Tip I kolajen, hidroksiapatit (HA), su, proteoglikanlar ve kolajen dışı proteinlerin bir araya gelmesiyle oluşur. Aynı zamanda, kolajen liflerinin mineral kristallerle birleşmesiyle meydana gelen bir yapı olarak da tanımlanabilir (Garg Arun K., 2004; Wang vd., 2010).

2.2.3.1. Organik Bileşenler

Kolajen, bağ dokusunun temel bileşeni olup organik yapının %90-96'sını oluşturur ve vücut proteinlerinin yaklaşık üçte birini oluşturur. Kemikteki kolajen, diğer bölgelerde görülen kolajenden farklı olarak mineralize bir yapı oluşturur ve lameller adı verilen paralel bantlar şeklinde düzenlenmiştir. Bu tür kolajen Tip I kolajen olarak adlandırılır. Organik yapının diğer bileşenleri arasında kolajen dışı proteinler de bulunur; bunlar arasında proteoglikanlar ve glikoproteinler yer alır. Proteoglikanlar örnek olarak çeşitli glikozaminoglikanlardan oluşan versican, decorin, biglycan, fibromodulin, osteoglisin ve osteoadherin gibi molekülleri içerir. Glikoproteinler arasında ise osteonektin (ONC), trombospondin, fibronektin, vitronectin, fibrilin, osteopontin ve kemik sialoproteini sayılabilir (Cowin, 2001; Gartner & Hiatt, 2011).

2.2.3.2. Kolajen

Kolajen, bağ dokusunun temel bileşeni olup, memelilerde en bol bulunan proteindir. Bugüne kadar 29 farklı kolajen tipi tanımlanmıştır. Organik matrisin büyük

kısmı Tip I kolajen tarafından oluşturulur. Kolajenin ana molekülü, hücre içinde üretilen prokollajenlerden oluşan tropokollajen'dir (Lullo vd., 2002; Söderhäll vd., 2007).

Tip I kolajen molekülü, bir adet α2 polipeptid zinciri ve iki adet α1 polipeptid zincirinden oluşur ve bu zincirler üçlü bir sarmal yapıyı oluşturur. Bu sarmallar bir araya gelerek kolajen liflerini meydana getirir. Yaklaşık 300 nm uzunluğundaki kolajen molekülleri, birbirleriyle çakışmadan dizildiklerinden, aralarındaki boşluklara inorganik matriks tuzları çöker (Bilezikian vd., 2008; Cowin, 2001; H-w & Y-z, 2005).

Kolajen ve hidroksiapatit (HA) oranı ve düzeni, kemiğin mekanik kuvvetlere karşı dayanıklılığını belirler. Kolajen, kemikte çekme kuvvetlerine karşı direnç oluştururken, aynı zamanda esneklik sağlar. Kolajen eksikliği, osteogenezis imperfekta, osteoporoz, osteoartroz ve Ehlers-Danlos sendromu gibi durumların ortaya çıkmasına neden olabilir. Bu sendromlarda kemiğin morfolojik yapısında belirgin bir değişiklik gözlenmese de, kemiğin kırılganlığı artar (Cowin, 2001; Garg Arun K., 2004; H-w & Y-z, 2005).

2.2.3.3. Kolajen Olmayan Proteinler

Görevleri tam olarak belirlenememiş olmakla birlikte, çeşitli proteinlerin organik yapı içinde bulunduğu ve bu proteinlerin bazı potansiyel işlevleri şunlardır: büyüme faktörlerinin salınımına yardımcı olmak, hidroksiapatit (HA) kristallerinin kolajene bağlanmasını sağlamak, organik matriksin kalsifikasyonunu desteklemek ve osteoblast ile osteoklast metabolizmasını düzenlemek. Bu tür proteinlerden bazıları osteokalsin, osteonektin, osteopontin ve kemik sialoprotein gibi kolajen dışı proteinlerdir (Özer, 2017; Weiner & Traub, 1992).

2.2.3.4. İnorganik Bileşenler

Kemik dokusunun inorganik matriksi, kemiğin kuru ağırlığının %60-70'ini kapsar ve kemik yapısının dayanıklılığı ile sertliğini belirler.

İskelet sistemi, vücuttaki kalsiyumun %99'unu, fosforun %85'ini, sodyum ve magnezyumun %40-60'ını barındırır. Ayrıca, bikarbonat, sitrat ve potasyum gibi mineralleri de içerir. Mineralize kısmın büyük bir bölümü, kalsiyum, fosfat ve hidroksil iyonlarından oluşan kristal yapıdaki hidroksiapatit (HA)'den meydana gelir (Gartner & Hiatt, 2007; Weiner & Traub, 1992).

2.2.3.5. Hidroksiapatit

Kemiğin mineralize bileşenini meydana getiren temel molekül, doğada var olan ancak saf olmayan bir kristal formdaki fosfat minerallerinin OH^- (hidroksil) iyonları içererek hidroksiapatit (HA) oluşturmasıyla oluşur. Kemiğin mineralize bölgesinde, çoğunlukla amorf ve kristalleşmemiş kalsiyum fosfat bulunur; bununla birlikte, az miktarda karbonat, florit, magnezyum ve stronsiyum elementleri de yer alır. Kolajen fibrilleri arasında yer alan HA kristallerinin yüzeyinde, elektron mikroskobu ile yapılan gözlemler sonucunda su ve iyonlardan oluşan bir hidrasyon kabuğunun varlığı tespit edilmiştir. Bu yapı, kristallerin daha kolay çözünmesini sağlayarak vücut sıvılarıyla kristaller arasında iyon alışverişini hızlandırır, böylece kalsiyum, fosfat ve magnezyum iyonlarının ekstraselüler sıvıya aktarılmasına olanak verir. Bu süreç, vücutta iyon dengesinin korunmasına yardımcı olur (Garg Arun K., 2004; H-w & Y-z, 2005; Wang vd., 2010; Weiner & Traub, 1992).

Hidroksiapatit (HA), kemiğe sertlik kazandırır ve kuvvetlere karşı dayanıklılığını artırır. Ancak, mineralizasyonu kaybeden ve demineralize olmuş kemik yapıları, morfolojik yapılarını korurken daha esnek bir hale gelirler (Cowin, 2001; Garg Arun K., 2004).

2.3. Kemik Hücreleri

Kemik hücreleri dört ana türden oluşur: osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve osteoprogenitor hücreler. Osteoblastlar ve osteositler, temel olarak benzer yapıya sahip hücrelerdir çünkü osteoblastların olgunlaşma sürecinin farklı aşamalarında yer alırlar.

Osteoklastlar, dolaşımdaki hücre ailesinin bir parçasıdır ve monositlerin farklılaşmasıyla ortaya çıkarlar. Farklı kökenlere sahip olmalarına ve zıt görevler üstlenmelerine rağmen, osteoblastlar ve osteoklastlar yaşam süreçleri açısından benzerlik gösterirler. Her ikisi de kısa ömürlü ve geçici hücrelerdir, bu nedenle yaşam süreleri boyunca sınırlı bir süreyle etkin olurlar (Cowin, 2001; Feldman vd., 1996; Puzas & Lewis, 1999).

2.3.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar, kemik iliğindeki ana kök hücrelerden türetilir. Osteoblast gelişim sürecinde, osteoblast öncü hücreleri çoğalır ve önce preosteoblastlar, ardından olgun

osteoblastlar olarak dönüşürler. Hücrelerin büyümesinde bir duraklama gerçekleştiğinde, kemik matriksi olgunlaşır ve mineralizasyon için önemli olan alkalen fosfataz (ALP) ile özelleşmiş kemik proteinleri belirgin hale gelir.

Osteoblastların sentez ürünü organik matrikstir. Başta kolajen üretip salgılayarak görev alırlar, sonrasında ise kalsiyum ve fosfat iyonlarının kemik dokusuna giriş ve çıkışını düzenleyerek kalsifikasyon sürecini kontrol ederler. Kemik oluşumu, matriks sentezi ve ardından gelen mineralizasyon aşamalarıyla tamamlanır. Osteoid, mineralize olmamış bir tabaka olarak, mineralizasyon ve matriks oluşumu arasındaki dönemde kemik yüzeyinde ortaya çıkar. Bu süreç, erişkin bireylerde yaklaşık 10 gün sürerken, erişkin olmayan bireylerde daha kısa olabilir. Kemik oluşum hızı, tetrasiklin gibi floresan işaretleyicilerin mineralizasyon sınırlarında birikmesiyle değerlendirilir. Osteoblastların aktif kalma süresi genellikle 1-10 hafta arasında olup, bu süreçte %15'i osteositlere dönüşür, geri kalanlar ise kemik yüzeyini döşeyen hücrelere dönüşür (Eriksen vd., 1994; Parfitt, 1995).

Osteoblastlar, kemik yüzeylerinde yan yana dizilir ve bu dizilim epitel hücrelerinin dizilimlerine benzerlik gösterir. Sentez aşamalarına bağlı olarak morfolojik görüntüleri farklılık gösterir. Matriks sentezine başladıkları zaman, hücre şekilleri kübik formdan prizmatiğe kadar değişiklik gösterebilir. Alkalen fosfataz seviyeleri yükselir ve sitoplazmaları bazofilik özellikler gösterir. Sentez faaliyetleri azaldıkça, osteoblastlar yassılaşır ve alkalen fosfataz aktivitesi ile bazofilik özellikler de azalır (Kierszenbaum, 2002).

Osteoblastların, osteoprogenitör hücrelerden dönüşümü iki ana mekanizmayla gerçekleşir. İlk mekanizma, embriyojenik dönemde hücrelerin kolonize olması ve farklılaşması yoluyla doğrudan kemik dokusunun oluşumunu içerir. İkinci mekanizma ise, kemik dokusunun rejenerasyon sürecinde rezorbe olmuş kemik dokusunun yerine veya kırık iyileşmesinde hasar görmüş kemik dokusunun yerine yeni kemik oluşumunu kapsar. Bu süreçte, osteoprogenitör hücrelere özel transkripsiyon faktörleri ve hormonların uygun bir zamanlamayla etkili olması gereklidir. Bu faktörler ve hormonlar eksik olduğunda, mineralize yapının tam olarak oluşması engellenebilir (Borovecki vd., 2007; Gartner & Hiatt, 2011; Mescher & Junqueira, 2013).

Osteoblastlar, birçok biyolojik molekül için reseptörler taşırlar. Bu moleküller arasında paratiroid hormon (PTH), paratiroid hormon ilişkili protein (PTHrP), prostaglandinler, D vitamini metabolitleri, kemik morfogenetik proteinleri (BMP'ler), gonadal ve adrenal steroidler, bazı sitokinler, lenfokinler ve koloni uyarıcı faktör (CSF) yer alır. Düzenleyici faktörler, bu reseptörler aracılığıyla osteoblastların aktivasyonunu, farklılaşmasını, çoğalma oranlarını ve hücrelerin apoptozisini kontrol eder. Kalsifikasyon aşamasında, matriksin içine gömülen osteoblastlar osteositlere dönüşür. Osteositlere dönüştükten sonra, komşu osteositlerle, yüzeydeki osteoblastlarla veya döşeyici hücrelerle iletişim kurmak amacıyla uzantılar geliştirirler (H-w & Y-z, 2005).

Bu iletişimi sağlayan uzantılar, osteositlerin kendi etrafını matriksle sarmaya başlamasıyla daha belirgin hale gelir. Yeni sentezlenen matriksle osteoblastlar sarıldığında osteosit adını alırlar. Hücre ve sitoplazmik uzantılar etrafında matriks oluşumu, lakünalar ve kanaliküllerin belirginleşmesini sağlar. Osteoblastlar, matriks sentezi aşamasında, yoğun protein sentezi ve sekresyonu yapan hücrelere özgü yapısal özellikler kazanırlar. Osteoblastlar, sitoplazmalarında büyük miktarda alkalen fosfataz enzimi bulundururlar. Bu enzim sadece matriks yapımıyla değil, aynı zamanda kalsifikasyon ile de ilişkilidir. Daha önce oluşmuş kemik matriksiyle temas eden osteoblast yüzeylerinden matriks sekresyonu gerçekleşir. Bu süreçle, henüz kalsifiye olmamış matriks, osteoblastlar ile mevcut kemik matriksi arasında yer alır. Bu olay kemik apozisyonu olarak adlandırılır ve zamanla kalsiyum tuzlarının çökelmesiyle tamamlanır. Alkalen fosfatazın, inorganik fosfat konsantrasyonunu yerel olarak artırarak veya kolajeni aktive ederek bu süreci desteklediği düşünülmektedir. Ayrıca, bir miktar alkalen fosfatazın kana geçmesi nedeniyle, kandaki alkalen fosfataz düzeyi, kemik yapım hızını yansıtan önemli bir marker olarak kabul edilir (Mescher & Junqueira, 2013; Puzas & Lewis, 1999).

2.3.2. Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemiğin yıkımı ve yeniden biçimlendirilmesinde görev alan, çekirdek sayısı fazla olan ve sitoplazmik uzantılara sahip büyük hücrelerdir. Bu uzantılar oldukça düzensiz bir yapı gösterir ve kemiği yıkım sürecine sokarlar. Osteoklastlar ya kemik iliğindeki prekürsör hücrelerden ya da kandan gelen mononükleer/fagositik

hücrelerden türetilirler. Kemik rezorpsiyonunun başladığı bölgelerde, enzimatik olarak açılmış Howship lakünaları içinde bulunurlar (Bayar, 2004).

Osteoklastlar, kemik matriksine zarar veren asidik, proteolitik, kollajenaz ve hidrofilik enzimler açığa çıkarır. Bu hücreler kemik yüzeyine tutunarak, ortama verdikleri enzimler aracılığıyla kemiğin organik ve inorganik matriksini çözerek, kalsifiye olmuş temel maddeyi serbest bırakırlar. Bu süreç sonucunda, Howship lakünaları olarak bilinen erozyon bölgeleri oluşur. Ayrıca, osteoklastlar kemik rezorpsiyonu sırasında ortaya çıkan artıkların temizlenmesinde de aktif bir rol oynarlar (Becker, 2001; Rothman & Simeone, 1992).

Osteoklastlar, osteoblastlarla birlikte kemik dokusunun mekanik uyarılara yanıt olarak yeniden şekillenmesini sağlar. Osteoklastlar, kemiğin rezorpsiyonunu sağlarken, osteoblastlar yeni kemik matriksinin oluşumunu destekler. Bu iş birliği, kemiğin hem yeniden şekillenmesini hem de adaptasyonunu optimize ederek, mekanik yükler ve diğer etkenlere göre kemiğin yapısal bütünlüğünü korur. Osteoklastlar, kemik yapım sürecinde trabeküllerin yüzeylerinde veya kompakt kemiklerin iç yüzlerinde yerleşir ve bu bölgeleri rezorbe ederler. Bu süreç, kemiklerin genişlemesini ve uzamasını sağlar. Ayrıca, kemiklerdeki yıkım esnasında serbest kalan kalsiyum, kana geçerek kan kalsiyum düzeyini dengeler. Dolayısıyla, osteoklastlar hormonal ve hücresel mekanizmaların kontrolü altında kemik rezorpsiyonunu gerçekleştirirler (Becker, 2001; Gartner & Hiatt, 2007; Kierszenbaum, 2002; Rothman & Simeone, 1992).

Osteoklastların kemik üzerinde hangi bölgeleri yıkıma uğratacakları henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da mevcut görüşlere göre kemik yüzey hücreleri, osteoklastların kemik yüzeyine yapışmalarını ve kemik yıkımını başlatmalarını sağlayan sinyaller ve faktörler sunar. Kemik yüzey hücreleri, kemik yüzeyinde belirli bölgelerde açılma ve kontraksiyonlar yaparak, osteoklastların bu açık yüzeylere yapışmalarına ve yıkım sürecini başlatmalarına olanak tanır. Bu mekanizma, osteoklastların kemik yıkımını düzenlemesine ve spesifik bölgelerde etkili olmasına yardımcı olur (Becker, 2001; Kierszenbaum, 2002; Rothman & Simeone, 1992).

Osteoklastlar, kemikteki mineral yapıyı parçalayıp kalsiyumu serbest hale getirir. Osteoklast aktiviteleri, bifosfonatlar, kalsitonin ve östrojen hormonları gibi bazı moleküller tarafından azaltılabilir. Öte yandan, paratiroid hormonu, tiroksin ve D

vitamini gibi hormonlar osteoklast faaliyetlerini artırabilir. Bu hormonlar, osteoklastların kemik rezorpsiyonunu teşvik ederek kemiklerdeki mineral ve kalsiyum seviyelerini etkilerler (Gürgan, 2005; Hüsmani, 2007; Şirin, 2005; Tuskan & Yaltırık, 2002).

Osteoklastların yaşam süreleri genellikle 3-4 hafta arasındadır. Östrojen ve TGF-β (Transforming Growth Factor-beta) gibi faktörler, osteoklastların apoptozisini (programlanmış hücre ölümünü) teşvik eder. Bu faktörler, osteoklastların yaşam sürelerini kısaltarak kemik yıkım sürecini düzenler ve kemik sağlığını korur (Gürgan, 2005).

2.3.3. Osteositler

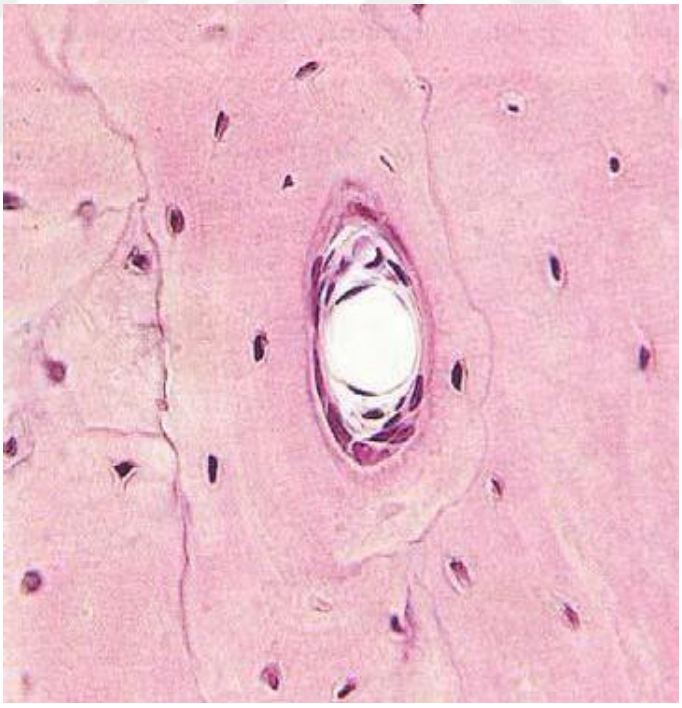
Osteositler, kemikteki olgun hücrelerdir ve osteoblast kaynaklı lakünler içinde bulunurlar. Yaklaşık 1 mm^3 kemikte 20.000 ile 30.000 arasında osteosit bulunur. Kemik dokusundaki hücrelerin %95'ini oluştururlar, bu da onları kemikte en bol bulunan hücre türü yapar. Osteoblastlardan osteositlere dönüşüm sırasında, hücrelerin boyutu küçülür ve şekli yassı, elips formuna gelir. Yaşlandıkça, osteositlerin hem hücre hem de organellerinin boyutları küçülür. Golgi kompleksleri ve endoplazmik retikulumun boyutları da belirgin şekilde küçülür. Osteoblastlardan daha yoğun şekilde çekirdek kromatini içerirler. Osteositler, kemik matriksinin sürekliliğiyle aktif olarak ilgilenir ve osteositlerin ölümünden sonra kemik matriksinde rezorpsiyon görülür (Garg Arun K., 2004; Gartner & Hiatt, 2011; Gupta & Maitra, 2002; H-w & Y-z, 2005; Mescher & Junqueira, 2013; Özer, 2017).

Osteositler, osteoblastlardan farklı olarak daha küçük olup, kemik içinde kanaliküller aracılığıyla geniş sitoplazmik uzantılar oluştururlar. Bu uzantılar her yöne doğru yayılır ve komşu osteositler, osteoblastlar, periost hücreleri ve vasküler yapılar gibi çevredeki diğer hücrelerle iletişim kurar. Bu iletişim, gap bağlantıları aracılığıyla gerçekleşir ve moleküllerin hücreler arasında transferini sağlar. Ayrıca, osteositlerin etrafında bulunan az miktarda ekstrasellüler sıvı, moleküler alışverişi destekler. Bu sıvı, periosteositik boşluk adı verilen bölgede yaklaşık 1-1,5 litre(lt) kadar bulunur ve yüzey alanı yaklaşık 1000-5000 m^2 arasında değişir.

Üç boyutlu osteositik lakünokanaliküler ağ, dışsal mekanik kuvvetleri algılayarak bunları hücresel düzeyde içsel mekanik sinyallere dönüştüren bir sensör sistemi olarak

işlev görür. Kemik matrisinde oluşan distorsiyon veya deformasyon, periosteositik boşlukta baskı oluşturur ve bu da hücre dışı sıvıyı hareketlendirir. Bu hareket, sitoplazmik membran üzerinde stres oluşturarak, prostaglandin ve nitrik oksit gibi biyokimyasal sinyallerin salgılanmasına neden olur (H-w & Y-z, 2005; Mescher & Junqueira, 2013).

Osteositlerin en önemli görevleri matrisin devamlılığını sağlama ve kan kalsiyum düzeyinin düzenlenmesidir. Matrisin devamlılığını sağlamada, osteositler osteoblastların olgunlaşmış formu olarak kabul edilirler ve bulundukları matrisin sürekliliğini sağlama görevini üstlenirler. Bu görev, osteositlerin kemik matrisinin bütünlüğünü koruyarak, kemik yapısının stabilitesini ve dayanıklılığını destekler. Kan kalsiyum düzeyinin düzenlenmesinde osteositlerin, osteoliz yaparak yani kemik matrisini çözerek kan kalsiyum düzeylerini düzenlediğine dair bir diğer varsayım mevcuttur. Bu süreç, osteositlerin kemik dokusunun mineral dengesini ve kalsiyum metabolizmasını kontrol etmeye yardımcı olduğu düşünülmektedir (Şekil 2.2) (Puzas & Lewis, 1999).



Şekil 2.2: Osteositler

Osteositler, kemik yüzeyini döşeyen hücrelerle birlikte çeşitli önemli işlevler üstlenirler. Osteositler, kemikteki kalsiyum akışını düzenler ve böylece kemiğin mineral direncini sağlarlar. Kemikte meydana gelen küçük hasarları tespit ederler ve bu hasarları

onarma sürecine katkıda bulunurlar. Gap bağlantıları aracılığıyla diğer hücrelerle iletişim kurarak, bükülme kuvvetlerine karşı kemiğin yeniden şekillenmesini sağlarlar.

Osteositler, yukarıda bahsedilen ağsı bağlantı sistemi sayesinde canlılıklarını sürdürürler. Ortalama yaşam süreleri birkaç yıl olmasına rağmen, kemikteki döngü hızına bağlı olarak, bazı bölgelerde osteositlerin yarılanma ömrü 25 yıla kadar çıkabilir. Ayrıca, kronik glukokortikoid uygulamaları, östrojen kaybı, kuvvet uygulanması ve yaşlanma osteositlerin ölümünü artırabilir (H-w & Y-z, 2005; Özer, 2017).

2.3.4. Osteoprogenitör Hücreler (Osteojenik Prekürsör Hücreler)

Osteoprogenitör hücreler, embriyonel mezenkimden türeyen stromal hücrelerin farklılaşmasıyla oluşur. Bu hücreler, kemik gelişiminin çeşitli aşamalarında önemli roller üstlenirler ve şu bölgelerde bulunurlar:

- Endost: Kemiğin iç yüzeyini döşeyen dokuda
- Periost: Kemiğin dış yüzeyini kaplayan zar üzerinde
- Epifiz Kıkırdakları: Büyümekte olan kemiklerin uç kısımlarında

Osteoprogenitör hücreler, kemiklerin normal büyüme sürecinde aktif olarak yer alır. Ayrıca, yetişkinlerde kemiğin yeniden şekillenmesi veya kırık iyileşmesi sırasında da aktif hale gelirler. Bu durumlarda, sayılarında bir artış meydana gelir ve osteoblastlara veya osteoklastlara dönüşerek kemik dokusunun onarım ve yeniden yapılandırılmasında rol oynarlar (Caplan, 1987). Osteoprogenitör hücreler 2 çeşittir; direkt kemik yapımında görevli olan osteoprogenitör hücreler, önce osteoblastlara dönüşür ve ardından osteositlere dönüşürler (Fawcett & Bloom, 1975). Bağ dokusunun diğer türlerinde bulunan osteoprogenitör hücreler, fibroblastlar, yağ dokusu hücreleri gibi çeşitli bağ dokusu hücrelerine dönüşebilirler (Mescher & Junqueira, 2013). Periost ve endosteum tabakalarındaki osteoprogenitör hücreler, embriyonik mezenkimal kökenli stromal hücrelerin farklılaşmasıyla meydana gelir (Gartner & Hiatt, 2007).

2.4. Kemik Oluşumu (Osteogenezis)

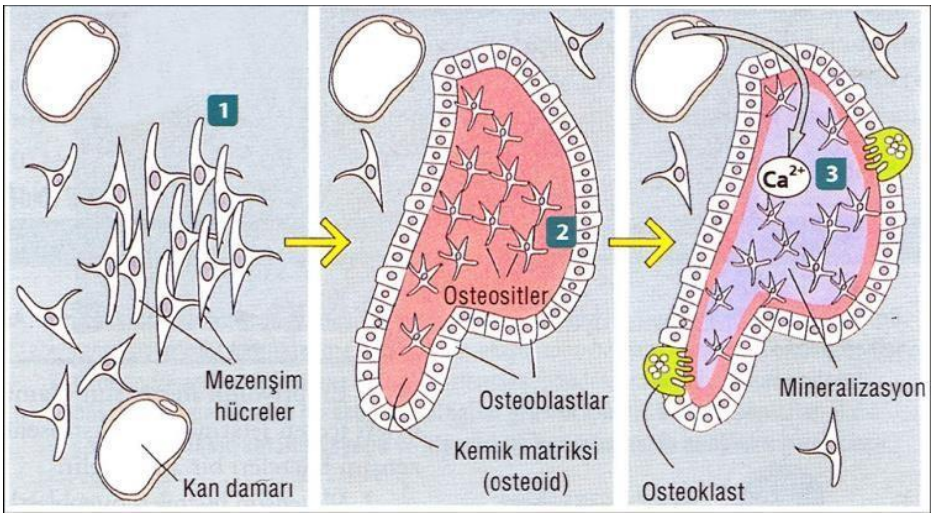
Kemik oluşumu, osteoblastlar tarafından sentezlenen matriksin doğrudan mineralizasyonu (intramembranöz kemikleşme) veya mevcut kıkırdak matriksinin üzerine kemik matriksinin çökmesi (endokondral kemikleşme) yoluyla gerçekleşir. Her

iki süreçte de önce primer kemik dokusu oluşur, ardından bu dokunun yerini sekonder kemik alır. Kemik dokusunun oluşumu ve yıkımı, sadece gelişim döneminde değil, yaşam boyunca yavaşlayarak devam eden bir süreçtir (Ripamonti & Duneas, 1998).

2.4.1. İntramembranöz Kemikleşme

Frontal, temporal, pariyetal ve mandibular kemiklerde gözlenen bu kemikleşme süreci, bağ dokusundan kaynaklanan bir mekanizma ile gerçekleşir. Osteoblastlar tarafından salgılanan matriksin doğrudan mineralizasyonuyla oluşur.

Mezenşimal hücrelerin damarlar çevresinde toplanıp çoğalmasıyla başlayan bu kemikleşme sürecinde, mezenşimal hücreler hem hücreler arası madde hem de lif sentezi yaparak osteoblast ve osteositlere dönüşür. Bu bölgeler primer kemikleşme merkezi olarak adlandırılır. İlk oluşan kemik yapısı, trabeküler bir formda olup lamel içermez ve kalsiyumun çökelmediği bu yapı osteoid doku olarak bilinir. Damar etrafında toplanan osteoblastlar osteositlere dönüşür ve boşalan alanlara yeni hücreler yerleşir. Bu süreç anastomozlarla trabeküllerin büyümesini ve çoğalmasını sağlar ve sonunda spongioz kemik yapısı oluşur. Trabeküller arası boşluklarda bulunan bağ dokusu ise kemik iliğinin myeloid veya hematopoetik dokusuna dönüşür (Şekil 2.3) (Weiner & Traub, 1992).



Şekil 2.3: (1) İntramembranöz kemikleşme. (2) Mezenkimal bağ dokusundan direkt olarak kemik şekillenmesi. (3) Mezenşim hücreleri hızlı bölünme gösterir ve osteoprogenitör hücrelere farklılaşarak, sonra da osteoblastlara dönüşerek kemik matriksini şekillendirirler.

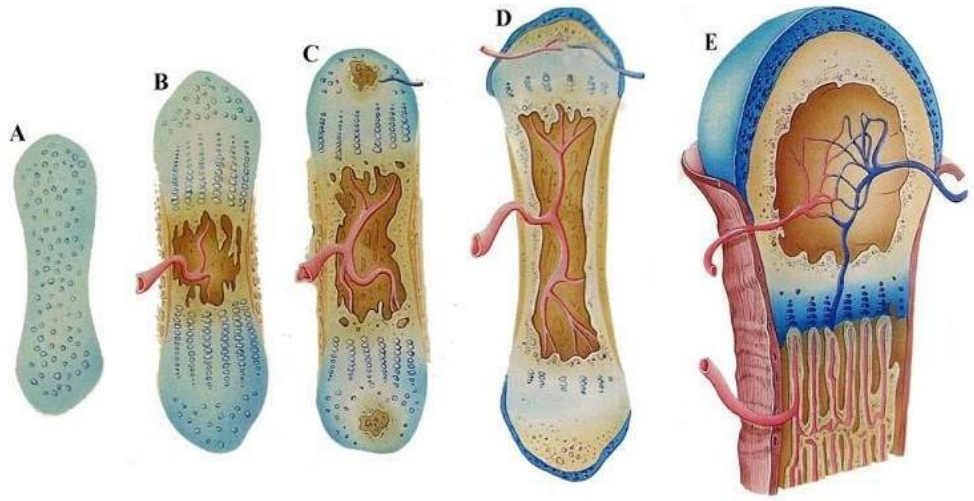
(Gokturk, 1997)

Kalsifiye olmamış mezenşimal hücreler periost ve endost dokularına dönüşür. Periostun iç tabakası ve duranın periosteal tabakası, kompakt kemik dokusuna dönüşerek kemikte iç ve dış tabakaları oluşturur (Weiner & Traub, 1992).

2.4.2. Endokondral Kemikleşme

Endokondral ossifikasyon, özellikle uzun kemiklerin diyafiz bölgelerinde kıkırdak matriksin üzerine kemik matriksin birikmesiyle gerçekleşir. Bu ossifikasyon iki aşamalı olarak meydana gelir. İlk aşamada hiyalin kıkırdaktan bir yapı oluşur; ikinci aşamada ise kıkırdak yapı genişler ve kemik için bir model oluşturur, ardından rezorbe edilerek yeni kemik dokusunun oluşumuna zemin hazırlar.

Uzun kemikler, uzun bir diyafiz ve epifizden oluşur. İlk kemik, diyafizi çevreleyen perikondriumda intramembranöz bir yöntemle meydana gelir ve periost şekillenir. Uzun kemiklerin oluşumu sürecinde, önce hyalin kıkırdaktan bir taslak meydana gelir; ardından apozisyonel büyüme ile uzunca bir şekil alır ve perikondriumla sarılı epifiz ile diyafiz oluşur. Bu kıkırdak taslağın içindeki kondrositler olgunlaşır, sitoplazmalarında glikojen biriktirir ve vakuolize hale gelirler. Çevrelerindeki kıkırdağı rezorbe ederek trabeküllü bir kıkırdak matriksi oluştururlar. Matriksin kalsifiye olmasıyla birlikte, kıkırdak taslağın üzerinde yeni kemik gelişir. Taslağın içindeki boşluklar ise daha sonra kemik iliği hücreleri ve osteoblastlara dönüşen mezenkim dokusu ile kan damarları tarafından doldurulur (Şekil 2.4) (Özer, 2017).



Şekil 2.4: Enkondral kemikleşme. **(A)** Hyalin kıkırdak modeli **(B)** Diyafiz kıkırdağını saran perikondriyumun iç katmanındaki mezenkim hücrelerinin osteoprogenitör hücrelere,

onların da osteoblastlara dönüşmesi. Osteoblastlar üst üste yığılan kemik lamellerini oluşturur. Böylece yeni oluşan kemiğin periosteumu ile kıkırdak dokusu arasında kemik manşet oluşur. **(C)** Kemik manşet, kondrositlerin beslenmesini engelleyerek, kondrositlerde hipertrofiye ve ardından ölümlerine sebep olur. Kıkırdak modelin ortasında kemik iliği kavitesi oluşur. **(D)** Kıkırdak modelin epifizleri ile diyafizi arasında kondrositler çoğalarak alt alta dizilen grupları oluşturur. **(E)** Eski ve yeni kemikleşme bölgeleri arasında sadece epifiz plağı kalır.

(Gartner & Hiatt, 2000)

Primer kemikleşme merkezi olan kıkırdak taslağın uçları birbirinden ayrılır ve bu uçlar büyümeye devam ederek kemikleşme sürecine girer. Bu aşamada, kemik, uzun bir diyafiz ve uçlarında yarım ay şeklinde epifizlerden oluşur. Büyüme plağı, diyafiz ile epifiz arasındaki alana verilen isimdir. Bu bölgedeki kıkırdak hücrelerinin çoğalması, kemiğin boyunun uzamasını sağlar. Diyafizde ise osteoprogenitör hücreler, olgunlaşan kondrositlerin yerini alır. Perikondrium, zamanla periosteuma dönüşür. Büyüme ve gelişme sürecinin sona ermesiyle birlikte, hormonlardaki değişiklikler büyüme plaklarının kemikleşmesine neden olur ve epifiz ile diyafiz birleşir. Sekonder kemikleşme merkezi, epifiz içinde diyafize benzer şekilde oluşan yeni kemik dokusunu ifade eder (Gartner & Hiatt, 2007; Weiner & Traub, 1992).

2.5. Kalsifikasyon Mekanizması

Kalsiyum fosfat bileşiğinin kemik matriksi üzerine çökmesini tam olarak açıklayan genel bir hipotez olmasa da, kalsiyum tuzlarının kollajen fibriller üzerine çökerek bu süreci başlattığı bilinmektedir. Bu mekanizma, glikoproteinler ve proteoglikanların kalsiyumu bağlama konusundaki yüksek afiniteleri sayesinde tetiklenir. Ayrıca, kemik yüzeylerinde bulunan ve osteoblastlar tarafından üretilen alkalen fosfatazın da bu sürece katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Osteoid maddenin oluşumundan 4-8 gün sonra gerçekleşen kalsifikasyon, kalsifikasyon çizgileri olarak adlandırılan tabakaların oluşmasına yol açar (Gartner & Hiatt, 2007; Weiner & Traub, 1992).

2.6. Kemik Büyümesi ve Şekillenmesi

Kemik büyümesi, önceki kemik dokusunun yıkımı ve eşzamanlı olarak yeni kemik dokusunun yapımıyla gerçekleşir. Kemik büyümesi sırasında, yapım hızı yıkım hızından daha yüksek olduğundan, kemiğin şekli de korunur. Periostun bir bölgesinde

apozisyon, aynı anda başka bir bölgede rezorpsiyon meydana gelirken, kemiğin şekli korunur (Cowin, 2001).

Kemik dokusu, üzerine etki eden farklı kuvvetlere bağlı olarak iç yapısını yeniden düzenleyebilir. Bunun en belirgin örneği, ortodontik apareylerdir. Kuvvetin çektiği bölgelerde kemik oluşumu, ittiği bölgelerde ise kemik rezorpsiyonu gerçekleşir. Bu yeniden şekillenme süreci, remodelasyon olarak adlandırılır ve tüm kemikler için geçerli olup yaşam boyu devam eder (Borovecki vd., 2007; Cowin, 2001).

2.7. Kemiğin Hücresel İşlevlerinde Etkili Sistemik Düzenleyiciler

Kemik oluşumu, şekillenmesi, yıkımı ve tamiri gibi hücresel işlevlerin uyum içinde gerçekleşebilmesi, çeşitli düzenleyici faktörlerin etkisiyle sağlanır. Bu nedenle, tüm kemik hücre işlevleri hücreler arası düzenlemeleri sağlayan parakrin faktörler ve aynı hücre içinde düzenlemeleri sağlayan otokrin faktörler tarafından kontrol edilir.

Kırık iyileşmesi, yaş, diyabet, anemi ve tüberküloz gibi sistemik hastalıklar; paratiroid hormonu, kalsitonin, insülin ve büyüme hormonu gibi hormonlar; A, C ve D vitaminleri; kondroitin sülfat ve egzersizler gibi genel faktörlerin yanı sıra travmanın derecesi, yara bölgesinin kanlanması, yara uçlarının hizalanması, immobilizasyon derecesi, kemiğin tipi, yaralanma bölgesindeki lokal nekroz ve yumuşak doku hasarının boyutu, ilgili bölgede enfeksiyon varlığı gibi yerel faktörlerden de etkilenir (Comproresi, 1999; Kabaca, 2007).

2.7.1. Sistemik Düzenleyiciler

Farklı hormonlar ve bileşikler, reseptörleri aracılığıyla hedef hücrelere etki ederler. Bunlar arasında parathormon, kalsitonin, vitamin D, glukokortikoidler, cinsiyet hormonları, tiroit hormonları, vitamin A ve vitamin K gibi maddeler bulunmaktadır.

2.7.1.1. Paratiroid Hormon (PTH) ve Kalsitonin

Paratiroid hormon, genellikle 4 adet olan paratiroid bezlerden salgılanan peptid yapılı bir hormondur. Vücudun kalsiyum, fosfat ve magnezyum dengesini düzenlemede kritik bir rol oynar (Guyton & Hall, 2020). PTH, paratiroid hücrelerindeki kalsiyum algılayıcı reseptörler (CaSR) sayesinde kandaki kalsiyum seviyesini düzenler (Hall,

2021). PTH'nin aşırı salgılanması hiperkalsemiye ve kemik rezorpsiyonuna neden olurken, yetersizliği hipokalsemiye ve kas spazmlarına yol açar (Guyton & Hall, 2020).

Paratiroid hormon temel olarak üç ana organ üzerine etki eder; bunlar kemikler, böbrekler ve bağırsaklardır. PTH, kemiklerde osteoblastlar aracılığıyla dolaylı olarak osteoklast aktivitesini arttırır. Sonuç olarak kemik mineralizasyonu azalır, kalsiyum ve fosfat kana verilmiş olur (Feldman vd., 1996). Böbreklerde kalsiyumun distal tübüllerde geri emilimini arttırarak idrarla kalsiyum kaybını azaltır. Ayrıca fosfatın proksimal tübülerden atılımını teşvik ederek hipofosfatemiye neden olur. PTH aynı zamanda inaktif haldeki D vitamininin aktif formu olan kalsitriole dönüşmesini sağlar. Dolaylı olarak aktif D vitamini aracılığıyla kalsiyum ve fosfat emilimini arttırır (H-w & Y-z, 2005).

Kalsitonin, tiroid bezinin parafoliküler C hücreleri tarafından sentelenen peptid yapılı bir hormondur . Kalsitonin, özellikle kandaki kalsiyum seviyeleri yükseldiğinde salgılanır ve PTH'nin etkilerine zıt olarak çalışır (H-w & Y-z, 2005).

Kalsitonin, osteoklast aktivitesini inhibe ederek kemik rezorpsiyonunu azaltır. Böylece kalsiyumun kemik matriksine daha fazla depolanmasını sağlar ve serum kalsiyum seviyesini düşürür (Ganong, 2016). Böbreklerde kalsiyum ve fosfatın idrarla atılımını arttırır. Bu etki kalsiyum düzeylerini düşürmeye yardımcı olur (Vander vd., 2015). Kalsitonin, özellikle çocukluk döneminde ve hamilelik sırasında kemik metabolizmasını düzenlemede daha aktif rol oynar. Yetişkinlerde ise kalsiyum dengesi üzerindeki etkisi sınırlı olup, klinik olarak hiperkalsemi tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabilir (Martini vd., 2017).

2.7.1.2. Steroid Reseptörleri, Glukokortikoidler, Östrojen ve Androjen

Yağda çözünebilen maddeler, hücre çekirdeğinin steroid bağlanma bölgelerine taşıyıcı proteinler yardımıyla taşınır.

Glukokortikoidlerin, kemik yıkımını engellediği ve PTH ile IGF gibi hormonların etkinliğini artırdığı bildirilmiştir. Ancak, glukokortikoidlerin aktif osteoblastlar üzerindeki etkileri genellikle engelleyici yöndedir. Glukokortikoidlerin osteoblastlarda apoptoz sürecini tetiklediğini ve sert dokularda ciddi yapısal ve hücresel bozulmalar oluşturduğunu göstermektedir (Özer, 2017).

In vivo çalışmalarda östrojenin kemik yapımını teşvik ettiği ve kemik rezorpsiyonunu engellediği bulunmuştur. Androjenlerin ise büyüme ve gelişme döneminde kemik dokusunun büyümesini desteklediği, eksikliğinde ise kemikte rezorpsiyonun arttığı belirlenmiştir. Osteoblast hücreleri, östrojen ve androjen reseptörlerini barındırır. Östrojen azalması, kemik rezorpsiyonunu artıran TNF-α ve interlökinlerin biyosentezini belirgin ölçüde arttırır. Ayrıca, östrojenlerin TGF sentezini artırarak osteoklast apoptozisinde bir artış sağladığı öne sürülmektedir (N. N. Yang vd., 1996).

2.8. Kan Kaynaklı Biyomateryallerin Gelişimi

Kan, hücresel elemanlar ve plazma olmak üzere iki temel bileşenden oluşan, klinik açıdan önemli bir biyolojik referans materyalidir. Hücresel fraksiyonu ise eritrositler, trombositler ve lökositleri içermektedir. Plazma bileşenlerinin %90'ı sudan, geri kalan %10'u ise iyonlar, proteinler, atık maddeler ve çözünmüş gazlardan meydana gelir. Kan kökenli ürünlerin tedavi amaçlı kullanımı, tarihsel süreç boyunca süregelen bir uygulamadır.

Yaklaşık yarım yüzyıl önce, kan kaynaklı biyomateryaller ilk kez “fibrin yapıştırıcı” adıyla, hasarlı bölgeyi onarmak amacıyla klinik kullanıma girmiştir. Plazma türevlerinden trombin ve fibrinojenin karışımı ise, 1944 yılında Cronkite ve arkadaşları tarafından, yanık tedavisinde deri greftinin basınçla birlikte tutunmasını artırmak amacıyla ilk kez uygulamışlardır (Anitua vd., 2007; Cronkite vd., 1944).

Fibrin yapıştırıcılar, hemostazı sağlamakla kalmayıp, aynı zamanda kan hücrelerinin infiltre olmasına yardımcı olarak hasarlı bölgenin onarımına katkıda bulunur (Jackson, 2001; Matras, 1970). Matras ve çalışma arkadaşları (1972), deneysel çalışmaları neticesinde sinir hasarını onarmak amacıyla fibrin yapıştırıcıyı kullanmaya başlamışlardır (Matras, 1970).

Fibrin yapıştırıcılar, allojenik ve otojenik olarak elde edilebilir. Otojenik olanlar, kontaminasyon riski açısından allojenik olanlara göre terapötik kullanım için daha güvenlidir. Ancak, üretim protokollerinin karmaşıklığı ve yüksek maliyeti nedeniyle otojenik fibrin yapıştırıcıların kullanımı oldukça sınırlıdır (Gibble & Ness, 1990). Ayrıca, biyomateryal içeriğinde trombositlerin yer almamasının, hem biyolojik hem de fiziksel

özellikleri üzerinde olumsuz etkilere yol açtığı görülmüştür (Sunitha Raja & Munirathnam Naidu, 2008). Bu dezavantajlar nedeniyle, fibrin yapıştırıcılar klinik alanda sınırlı bir şekilde kullanılmıştır.

İlerleyen yıllarda, trombosit hücrelerinin yara iyileşmesindeki temel rolünün anlaşılmasıyla birlikte, trombosit içeren fibrin yapıştırıcıları geliştirilmiştir. Bu yeni formülasyonlar, "Trombosit-Fibrinojen-Trombin Karışımı" olarak adlandırılmıştır. Bu şekilde, fibrinin mekanik özellikleri doğal bir yolla desteklenmiş, aynı zamanda trombositlerin yara iyileşmesini teşvik edici özelliklerinden etkin şekilde yararlanılmıştır. Son dönemde, trombosit konsantreleri, kan kaynaklı biyomalzemeler arasında öne çıkmıştır (Rosenthal vd., 1975, 1978).

2.9.Trombosit Konsantreleri

Trombosit konsantreleri, yapılan çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar doğrultusunda birçok cerrahi dalında kullanımı yaygınlaşmıştır.

Trombositten zengin kan konsantrelerinin klinik yararları, içerdiği çok sayıda hücre bölünmesini teşvik edici trombosit kaynaklı büyüme faktörleriyle ilişkilendirilmektedir. 1970'li yıllarda, trombositlerde bulunan yoğun miktardaki büyüme faktörlerinin rejenerasyon üzerinde yararlı olduğu gösterilmiş olsa da, uzunca bir süre kanama durdurucu olarak kullanılmıştır (Jackson, 2001; Tawes vd., 1994). Ancak, son zamanlarda yara iyileşmesi üzerine yapılan çalışmalarda kullanılmaya başlanmıştır (Dohan Ehrenfest, Diss, vd., 2009; Tunalı vd., 2013).

Trombosit konsantrelerinin iyileşmeyi hızlandırıcı etkisine dair ilk klinik bulgu, 1986'da Knighton ve ekibi tarafından raporlanmıştır. "Trombosit Kaynaklı Yara İyileşme Faktörleri" olarak tanımlanan bu biyomateryal, kronik ülserli hastalarda başarılı sonuçlar vermiştir (Knighton vd., 1986).

Trombositten zengin plazma (TZP) ve büyüme faktöründen zengin plazma (PRGF) birinci nesil trombosit konsantresidir. Otojen kaynaklı TZP, santrifüj ile tam kandan elde edilir ve bulaşıcı hastalık riski taşımaz. Bu yöntem, diş hekimliğinde ilk kez 1998 yılında Marx ve ekibi tarafından çene yüz cerrahisinde uygulanmıştır (Ferrari vd., 1987; Marx vd., 1998; Matras, 1970). Trombosit konsantreleri, transfüzyon tıbbında ve

özellikle lösemi gibi hastalıklarda gelişen ciddi trombositopeniyi önlemek için de kullanılmıştır (Arora & Agnihotri, 2017; Dohan vd., 2006b).

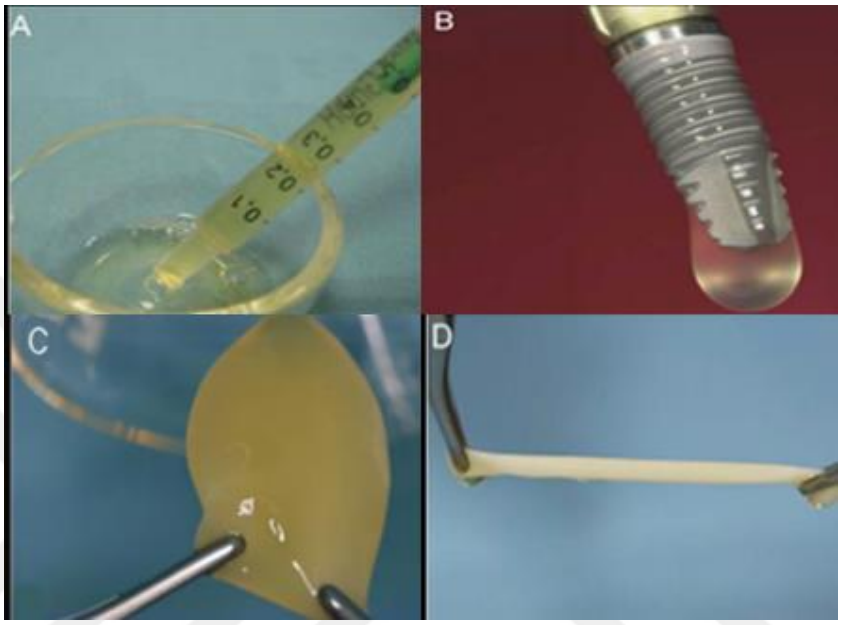
TZP, içerdiği yüksek trombosit, pıhtılaşma ve büyüme faktörleri sayesinde biyolojik olarak aktif bir yapı olarak kabul edilmektedir. Trombinle aktive edilen trombositler, yara iyileşmesini destekleyen büyüme faktörleri ve sitokinleri serbest bırakır. Bu faktörlerin miktarı trombosit sayısıyla ilişkili olup, doku iyileşme yanıtını güçlendirir. TZP, doğrudan osteoindüktif olmasa da, kök hücre çoğalmasını destekleyerek kemik rejenerasyonunu teşvik eder ve ayrıca doku iyileşmesini hızlandırarak ağrı ve enfeksiyonu azalttığı bildirilmiştir (Marx vd., 1998; Marx, 2001).

TZP'nin hazırlanması için genellikle iki aşamalı bir santrifüj yöntemi kullanılmaktadır. Hazırlık sürecinde, dışarıdan ek materyal eklenmesi fibrinin polimerizasyonunu olumsuz etkilediği ve bundan dolayı sitokinlerle fibrin arasındaki etkileşimin istenilen seviyede oluşmadığı bildirilmiştir (Dohan vd., 2006a).

Yüksek maliyet, karmaşık hazırlık süreci ve kimyasal katkı gereksinimi gibi dezavantajları azaltmak ve materyalin etkinliğini artırmak amacıyla, farklı santrifüj süre ve kuvvetlerine dayalı çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. TZP hazırlama sürecinde kullanılan pıhtılaşma maddelerinin türü ve miktarındaki değişiklikler de birçok TZP yönteminin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Ticarileştirilen bu hazırlama kitlerinin etkinliği ve güvenilirliği, trombosit zenginliği, uygulama protokolü, lökosit ve protein içerip içermemesi gibi faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (Anitua vd., 2015).

PRGF (Büyüme Faktörlerinden Zengin Plazma) birinci nesil trombosit konsantresidir ve Anitua tarafından 1999'da tanımlanmıştır. Tek aşamalı santrifüjle elde edilen, büyüme faktörlerinden zengin plazma kaynaklı bir materyaldir. Pıhtılaşmanın başlatılmasında kalsiyum klorid kullanılır. Bu, trombine kıyasla daha yavaş polimerizasyon sağlayarak üç boyutlu fibrin matriks oluşumuna ve büyüme faktörlerinin daha kontrollü salınımına olanak tanır (Anitua vd., 2012; Marx, 2001; Sunitha Raja & Munirathnam Naidu, 2008). PGRF'nin bileşiminden fibrin ağ yapısının parçalanmasına sebep olan lökositler çıkarılarak olumsuz etkileri azaltılmaya çalışılmıştır (Weibrich vd., 2005).

Gonshor ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada PGRF'nin farklı varyasyonlarını elde etmişlerdir. PRGF'nin çeşitli varyasyonlarını ortaya koyan Gonshor ve ark. bu materyalin geniş bir alanda kullanılabileceğini savunmuştur (Şekil 2.5) (Gonshor, 2002).



Şekil 2.5: A: PRGF süpernatantı. B: Aktif sıvı PRGF. C: PRGF pıhtı. D: Otojen fibrin membran. (Anitua vd., 2007)

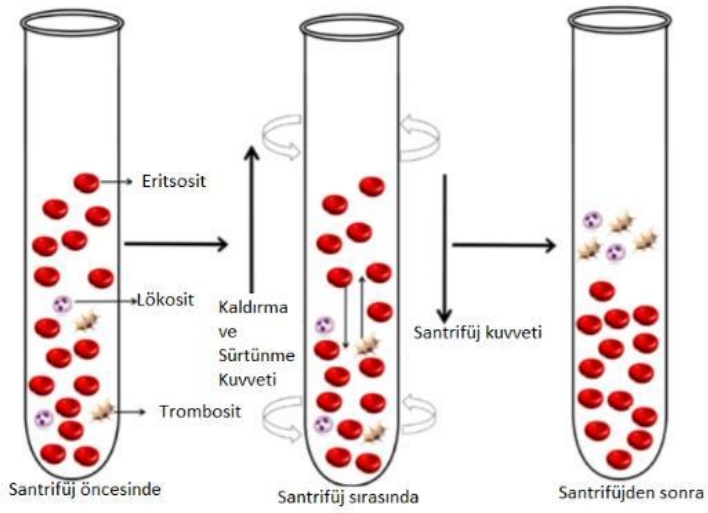
Birinci nesil trombosit konsantrelerinin dezavantajlarının fazlalığı sebebiyle, 2001 yılında Joseph Choukron ve ekibi tarafından TZF (Trombositten Zengin Fibrin) olarak isimlendirilen ikinci nesil konsantresi üretilmiştir (Choukroun vd., 2001).

Trombosit konsantrelerinin en yaygın gruplandırılması, Dohan ve arkadaşları tarafından 2009 yılında ortaya konulmuştur (Dohan Ehrenfest, Rasmusson, vd., 2009) **(Tablo 2.2)**.

Tablo 2.2: Trombosit konsantrelerinin çeşitleri ve kısaltmaları

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

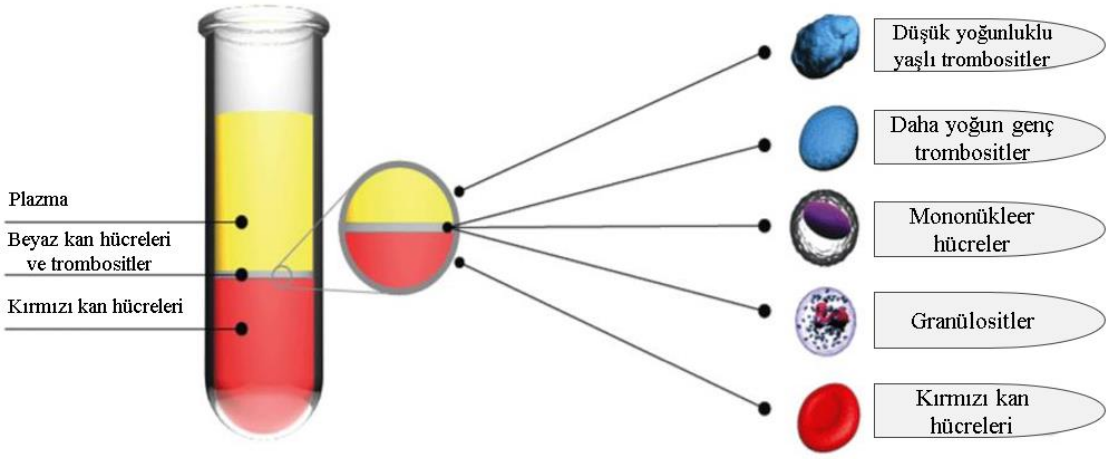
Trombosit konsantrelerini elde etmek için uygulanan yöntem, tam kanın santrifüjlenerek bileşenlerine ayrılmasıdır (Arnoczky vd., 2011). Belirli santrifüj kuvvetleri altında kanın bileşenlerine ayrılması, Stokes yasasına dayanmaktadır. Bu yasaya göre, santrifüj işlemi sırasında tüpte bulunan kana bir dizi kuvvet etki eder. Santrifüj işlemi sırasında, kan bileşenleri merkezkaç kuvvetinin etkisiyle tüpün tabanına doğru hareket ederken, sürtünme ve kaldırma kuvvetleri bu hareketi dengelemeye çalışır. Yüksek hızlarda, santrifüj kuvveti bu dirençleri aşarak partiküllerin aşağıya yönlenmesini sağlar. Partikül ve sıvı yoğunlukları eşit olduğunda sedimentasyon gerçekleşmez; ancak, yoğunluk farkı ve santrifüj kuvveti arttıkça çökelme hızı da artar. Parçacık boyutuna bağlı olarak, eritrosit ve lökositler tüpün altına çökerken, trombositler plazma içinde üst kısımda toplanır ve bu sayede seçici olarak ayrıştırılır (Şekil 2.6) (Arnoczky vd., 2011; Arora & Agnihotri, 2017; Griffith, 2010).



Şekil 2.6: Santrifüj kuvveti altında kanın bileşenlerine ayrılması

(Shah vd., 2017)

TZF gibi antikoagülan kullanılmadan üretilen trombosit konsantrelerinde, santrifüj işlemi sırasında hem pıhtılaşma hem de kan bileşenlerinin ayrılması paralel olarak gerçekleşir (Shah vd., 2017). Santrifüj işlemi sonucunda oluşan pıhtı trombositler, lökositler ve fibrin ağından meydana gelirken, eritrositler bu yapının dışında kalacak biçimde ayrıştırılır (Şekil 2.7) (Marx, 2001; Shah vd., 2017).



Şekil 2.7: Santrifüj sonrasında, kanın parçacık kütlesine bağlı olarak bileşenleri ayrılır. En altta eritrositler, ortada lökositler ve üstte plazmanın içinde azalan yoğunlukta dağılmış trombositler tüpün üst kısmında bulunur.

(Parrish & Roides, 2017)

2.9.1. Saf Trombositten Zengin Plazma (S-TZP)

Lökosit içermeyen ve düşük yoğunlukta fibrin ağına sahip biyomateryaller, aktivasyon sonrası sıvı veya jel formunda elde edilebilir. Sıvı form enjekte edilebilirken, jel form yara yüzeylerine uygulanabilir. Her ne kadar plazmaferez gibi hücre ayırma teknikleri kullanılsa da, bu yöntemler günlük uygulamalarda pratik değildir. Bu tür ürünler genellikle PRGF adıyla bilinen S-TZP yöntemiyle elde edilmektedir (Anitua vd., 2007).

2.9.2. Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma (L-TZP)

S-TZP ve benzeri ürünler hem sıvı hem de aktif jel formunda kullanılabilmektedir. Aktivasyon sonrasında lökosit içermeleri ve düşük yoğunlukta fibrin ağına sahip olmalarıyla tanımlanırlar. Bu özellikleri sayesinde, ortopedi ve genel cerrahi hekimliğinde kullanılan çeşitli sistemler geliştirilmiştir (Dohan Ehrenfest, Rasmusson, vd., 2009; Everts vd., 2006).

2.9.3. Saf Trombositten Zengin Fibrin (S-TZF)

Lökositlerden yoksun ve yoğun fibrin ağ yapısına sahip materyallerdir. Bunlar aktive edilmiş jel formunda bulunur ve enjekte edilemezler. Ancak, sağlam fibrin matriksi sayesinde, diğer uygulamalarda katı materyal olarak kullanılabilir. Bu yöntemin temel

dezavantajı, lökosit ve trombositten zengin fibrine göre maliyetli olması ve uygulama protokolünün karmaşık yapısıdır (Dohan Ehrenfest, Rasmusson, vd., 2009).

S-TZF üretim yöntemi, genel hatlarıyla L-TZP ile benzerlik taşısa da, daha yoğun bir ürün elde edebilmek için pıhtılaştırıcı ajan santrifüj işleminden önce tüpe eklenerek süreçte belirgin bir ayrım oluşturur (Dohan Ehrenfest vd., 2012).

2.9.4. Lökosit ve Trombosit Zengin Fibrin (L-TZF)

Bileşimi yüksek oranda lökosit içerir ve yoğun bir fibrin ağına sahiptir (Dohan Ehrenfest vd., 2010). Bu biyomateryallerin yalnızca aktif jel formu mevcuttur ve L-TZF, geleneksel fibrin yapıştırıcıların aksine enjeksiyon yoluyla uygulanamaz. Ancak, sahip oldukları sağlam fibrin matrisi sayesinde, farklı klinik uygulamalarda işlev görebilirler. (Dohan Ehrenfest, Rasmusson, vd., 2009).

L-TZF ve S-TZF'nin santrifüj protokolleri farklıdır. S-TZP, L-TZP ve S-TZF'lerin tümü birden fazla santrifüj ile gerçekleştirilir ve içeriğine çeşitli antikoagülan materyaller eklenir. Bu nedenle trombosit sayısı fizyolojik değerlerin çok üzerindedir. Araştırmalar, hücre çoğalmasını en iyi şekilde uyarmak için, trombosit sayısının kandaki doğal seviyenin 2.5 katı kadar yüksek olduğu kan konsantrelerinin en etkili olduğunu göstermiştir (Graziani vd., 2006). Daha yüksek trombosit içeriğinin olumsuz etkileri olabileceği belirtilmiştir (Dohan Ehrenfest vd., 2012).

TZF, TZP'den farklı olarak, santrifüj işlemi sırasında doğal ve aşamalı bir polimerizasyonla oluşur. Bu sayede ortaya çıkan pıhtı, daha homojen ve yapışkan bir yapıya sahip olur (Dohan Ehrenfest, Rasmusson, vd., 2009). Polimerizasyon sürecinde dolaşan sitokinler, esnek fibrin ağına hapsolur ve zamanla serbest kalırlar. TZP uygulamalarında trombin ve kalsiyum kloridin ani polimerizasyonu, sitokinlerin fibrin ağı içinde tutulmasını zorlaştırırken, TZF'deki yavaş polimerizasyon, salınan sitokinlerin fibrin ağı ile daha iyi bütünleşmesini sağlar. Bu durum, elastik bir matriks yapısının oluşumunu destekler. Bu sayede, TZF'nin fibrin ağı içerisinde yer alan çözünür molekülleri daha kontrollü ve uzun süreli bir şekilde salma potansiyeline sahip olduğu ileri sürülmüştür (Weibrich vd., 2005).

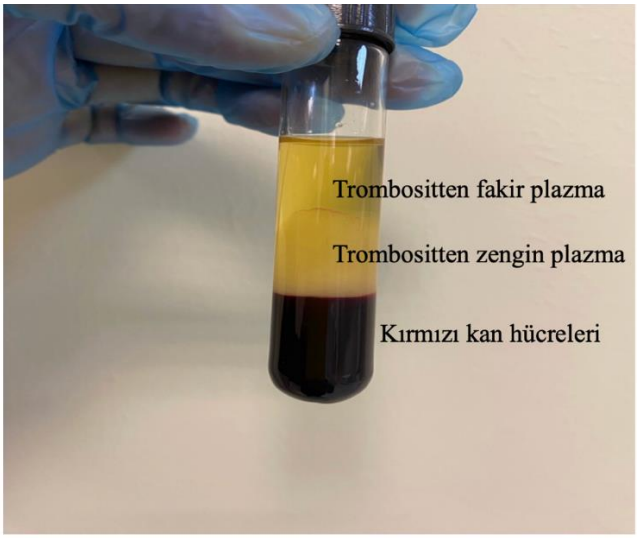
2.10. Yakın Zamanda Geliştirilen Trombosit Konsantreleri

Santrifüj süresi ve hızında değişiklikler yaparak büyüme faktörleri ile hücre miktarını optimize etmeyi hedefleyen araştırmacılar, çeşitli otojen biyolojik materyaller geliştirmişlerdir (Fujioka-Kobayashi vd., 2017).

2.10.1. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (L-TZF)

L-TZF, 2001 yılında Fransa'da Choukron ve ekibi geliştirmiştir (Dohan Ehrenfest, Rasmusson, vd., 2009). Hazırlık protokolü son derece basittir ve yalnızca bir santrifüj işlemiyle elde edilir (Aroca vd., 2009). Koagülasyon süreci yapay değildir ve antikoagülan gibi ek materyal eklenmeden L-TZF kolaylıkla hazırlanabilir (Dohan vd., 2006a).

L-TZF santrifüj protokolü, 12 dakika boyunca 2700 rpm hızında, 700 g (RCF) kuvvetinde yapılmasıdır. Bu işlem, üst katmanda pıhtılaşma faktörlerinden arındırılmış bir trombosit konsantresinin oluşmasını sağlar. Santrifüj işlemi sonucunda tüpte üç katman oluşur: en alt kısımda eritrositler, orta kısımda TZF pıhtısı ve en üst kısımda hücre içeriği düşük plazma yer alır. TZP'nin aksine, TZF uygulamadan sonra hızlıca çözünmez. Bu düşük maliyetli ve pratiktir. Kan örneği cam veya cam kaplı plastik tüplere alınarak bekletilmeden düşük hızda santrifüj edilir. Böylece, tüpte üç belirgin tabaka elde edilir (Şekil 2.8) (Dohan vd., 2006d).

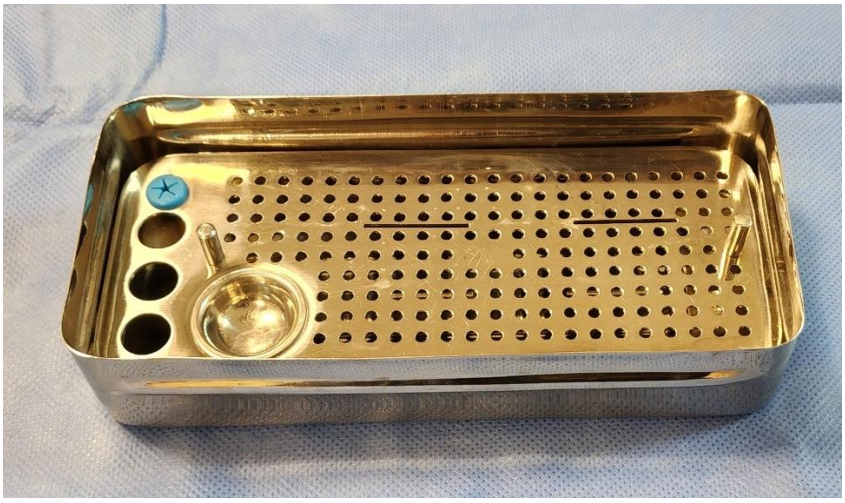


Şekil 2.8: L-TZF bölümleri

L-TZF, öncül hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını destekleyen biyoaktif bir materyaldir. Büyüme faktörlerini kademeli olarak serbest bırakarak inflamasyonu kontrol etme kapasitesine sahip olup, bağışıklık sistemini düzenleyici bir rol üstlenir. Cerrahi işlemler inflamasyona yol açabileceği için, TZF'nin kullanımı yaralı dokuların iyileşme sürecinde olumlu katkılar sağlamaktadır (Dohan vd., 2006d).

TZF içinde bulunan fibrin matriksin, trombositlerden salınan büyüme faktörlerinin etkinliğini artırdığı kanıtlanmıştır. Pıhtı dikkatlice sıkıştırılarak yaklaşık 1 mm kalınlığında bir membran haline getirilebilir. Ancak, membran oluşturma sürecinde pıhtıya uygulanan basıncın nazik ve kontrollü olması büyük önem taşır. Manuel olarak uygulanan basıncın, TZF'nin içeriğini olumsuz etkileyebileceği varsayılmaktadır (Dohan Ehrenfest vd., 2010).

TZF materyalinin kullanılacağı zamana kadar steril bir şekilde ve nemli olması gerekmektedir. TZF'nin özelliklerini kaybetmeden belirli bir süre bekletilebilmesi için Choukron ve ekibi tarafından 'TZF KUTUSU' üretilmiştir **(Şekil 2.17)**. TZF yapısındaki büyüme faktörleri ve sitokinlerin kaybının, manuel basınç uygulamasına kıyasla daha kontrollü yöntemlerle yapılan işlemlerde daha az olduğu ifade edilmiştir.



Şekil 2.9: TZF kutusu

2.10.2. Otojen Fibrin Yapıştırıcı (OFG)

2010 yılında Sohn ve çalışma arkadaşları, 20–60 cc venöz kanı Medifuge (Silfradent, Sofia, İtalya) adlı özel bir santrifüj cihazında 2400–2700 rpm hızla 2 dakika

santrifüj ederek, enjeksiyonla uygulanabilir bir trombosit konsantresi olan "Otolog Fibrin Glue" (OFG) üretmişlerdir. Bu biyomateryali allogreft veya ksenogreft ile karıştırarak, greftlerin defekt bölgelerinde daha stabil kalmasını sağlamak amacıyla “Sticky Bone” adı verilen yapışkan kemik grefti konseptini ortaya koymuşlardır. Kısa sürede santrifüj edilmesi sayesinde, elde edilen materyalin daha yüksek oranda büyüme faktörü içerdiği düşünülmektedir (Pavan Kumar vd., 2015; Sohn vd., 2015).

2.10.3. Gelişmiş Trombositten Zengin Fibrin (A-TZF)

A-TZF L-TZF’ye kıyasla daha düşük hızda (1500 rpm) ve daha uzun sürede (14 dakika) santrifüje tabi tutularak hazırlanır. A-TZF santrifüj protokolünün, trombositlerin daha dengeli dağılmasını sağladığı ve immün sistem hücrelerinin düzeylerini artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca, bu formülasyonun büyüme faktörleri ve sitokinleri daha uzun süre boyunca salabildiği de rapor edilmiştir (Dohan Ehrenfest vd., 2018; Ghanaati vd., 2014; E. Kobayashi vd., 2016).

Fujioka-Kobayashi ve ekibi, 2017 yılında A-TZF üretiminde kullanılan santrifüj parametrelerini değiştirerek yeni bir protokol geliştirmiştir. Bu protokolde, santrifüj süresi 8 dakikaya, hız ise 1300 rpm’e düşürülmüştür. Araştırmacılar, yüksek santrifüj hızının trombositleri ve lökositleri TZF pıhtısından uzaklaştırdığını ileri sürmüştür. Hızın azaltılmasıyla, TZF pıhtısı içinde trombositlerin daha homojen ve yoğun bir dağılım göstermesi amaçlanmıştır. Bu yöntemle, elde edilen TZF matriksindeki hücre sayısının ve salınan büyüme faktörlerinin artacağı öne sürülmüştür. Bunun sonucunda, biyouyumluluğu ve hücresel aktivitesi daha yüksek bir biyomateryalin üretilebileceği savunulmaktadır (Fujioka-Kobayashi vd., 2017).

Bununla birlikte, Pinto ve arkadaşları, 2014 yılında yaptıkları çalışmada, A-TZF protokolüyle daha kompakt bir pıhtı elde edilebildiğini, ayrıca A-TZF’den salınan büyüme faktörlerinin L-TZF’ye kıyasla daha düşük seviyede olduğunu rapor etmişlerdir. A-TZF’nin histolojik incelemesinde, gevşek bir fibrin yapısı içerdiği tespit edilmiştir (Ghanaati vd., 2014).

2.10.4. Titanyum Tüplerle Hazırlanmış Trombositten Zengin Fibrin (T-TZF)

O'Connell, geleneksel tüpler kullanılarak hazırlanan TZF’de, fibrin pıhtısının silika ile temasının engellenemez olduğunu belirtmiştir. Silika partiküllerinin kırmızı kan

hücreleriyle birlikte çökelmesine rağmen, trombosit ve fibrinden fakir üst tabakada ince, beyaz bir tabaka şeklinde askıda kalabildiğini vurgulamıştır. Ayrıca bu partiküllerin, uygulama sırasında doğrudan hastaya geçebileceğini de rapor etmiştir. (O'Connell, 2007). Tunalı ve çalışma arkadaşları, silikaya bağlı olası kısa ve uzun vadeli yan etkileri önlemek amacıyla, titanyum tüpler kullanarak trombositten zengin fibrin (T-TZF) geliştirmiştir. Titanyum tüplerin cam veya cam kaplı plastik tüplere kıyasla daha yüksek biyouyumluluk sunmasının temel nedeni, silika içerikli materyallere maruziyeti engellemesi ve trombosit aktivasyonunu daha etkili şekilde sağlamasıdır. Yapılan araştırmalarda, titanyum tüplerle elde edilen pıhtının histolojik olarak cam tüplerle üretilenlere benzer olduğu, ancak T-TZF'in fibrin ağının daha yoğun bir yapı sergilediği gözlemlenmiştir. Ayrıca, silika partikülleri içermemesi nedeniyle biyouyumluluğunun daha yüksek olduğu düşünülmektedir (Shah vd., 2017; Tunalı vd., 2014).

Titanyum, korozyona karşı dayanıklı, dirençli ve doku uyumlu bir materyal olarak bilinir. T-TZF protokolü, standart TZF protokolüyle aynıdır. Tek farkı kullanılan tüp titanyumdan üretilmiştir. Tunalı ve arkadaşları, yayımladıkları çalışmalarında, fibrin yapısının geleneksel TZF'ye göre daha yoğun bir ağ yapısına, ayrıca daha yoğun bir hücresel içeriğe sahip olduğunu bu nedenle dokuda rezorpsiyon süresinin daha uzun olduğunu belirtmişlerdir. Titanyumla üretilen TZF'nin, doku içinde 30 gün boyunca rezorbe olmadan kalabildiği gözlemlenmiştir (Tunalı vd., 2013, 2014).

2.10.5. Enjekte Edilebilen Trombositten Zengin Fibrin (I-TZF)

TZF'in enjekte edilebilir bir formunun bulunmaması, kullanım alanlarını kısıtlayan önemli bir dezavantaj olarak görülmekteydi. Antikoagülan ajan kullanılmaksızın, lökosit ve trombositlerin yoğunlaştırıldığı sıvı formülasyonlar üzerine yapılan çalışmalar sonucunda ise I-TZF geliştirilmiştir.

I-TZF, diğer TZF türlerinden farklı olarak, akışkan yapıda olup enjeksiyonla uygulanabilir formdadır. İçeriğinde yalnızca lökositler ve trombositler değil, aynı zamanda kök hücreler ve endotel hücrelerinin de bulunduğu düşünülmektedir. I-TZF'nin elde edilmesinde, antikoagülan içermeyen steril tüplere alınan kan örneği, oda ısısında 700 rpm hızda 3 dakika (60 g) santrifüj edilerek hazırlanır (Miron vd., 2017).

Santrifüj işleminden sonra tüp içerisinde iki belirgin katman oluşur: üst kısımda turuncu renkte I-TZF yapısı, alt kısımda ise diğer kan elemanlarını içeren kırmızı tabaka yer alır. Homojenliğin bozulmaması adına tüp dikkatlice açılır ve en üstteki I-TZF kısmı, enjektörle nazikçe toplanır. I-TZF'nin önemli avantajlarından biri, enjeksiyon sonrası hızlı şekilde pıhtılaşarak biyomateryal formuna geçmesidir. Ayrıca, farklı biyomateryallerle kombinlenebilir özellikte olması klinik kullanım alanını genişletir. Sadece 3 dakikalık santrifüj sonrası elde edilen lökosit açısından zengin I-TZF'nin, yumuşak dokuya enjekte edildiğinde vaskülarizasyonu artırabileceği öngörülmektedir. Greft materyalleriyle karıştırıldığında ise, 5–10 dakikalık bir polimerizasyon süreci sonucunda ortaya çıkan rijit yapı "sticky bone" olarak tanımlanır ve cerrahide pratik bir kullanım sunar (Mourão vd., 2015).

2.10.6. Yatay Trombositten Zengin Fibrin (Y-TZF)

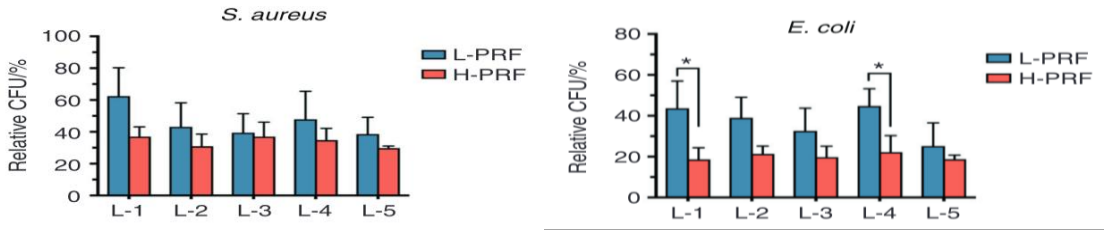
TZF, doku rejenerasyonunu teşvik etme yeteneği sayesinde geniş bir kullanım alanı bulmuştur. TZF 'nin antibakteriyel özelliklerini ele alan çalışmalar sınırlı olsa da bugüne kadar birkaç araştırma yapılmıştır. Daha önceki çalışmalarda, yatay santrifüj yöntemiyle hazırlanan TZF 'nin (Y- TZF), lökosit ve trombositten zengin fibrinden (L-TZF) daha yüksek düzeyde bağışıklık hücresi içerdiği tespit edilmiştir (Feng vd., 2020). Ağız boşluğu mikrobiyal flora açısından oldukça zengindir (Sampaio-Maia vd., 2016). Bu nedenle, cerrahi işlemler sonrasında doku rejenerasyonu aksayabilir ve iyileşme süreci olumsuz etkilenebilir. Özellikle Staphylococcus aureus ve Escherichia coli, bu tür enfeksiyonlarla ilişkilendirilen başlıca patojenlerdir (Subbiahdoss vd., 2011). TZF, enfeksiyonu engelleyebilecek bir dizi bağışıklık hücresi içerir ve antibakteriyel özelliklere sahiptir. Farklı santrifüj yöntemleri ve protokollerinin uygulanması, TZF'nin antibakteriyel etkilerinin güçlendirilmesine yardımcı olabilir (Feng vd., 2020).

Son dönemde yapılan araştırmalar, TZF'nin yatay santrifüjleme yöntemiyle (Y-TZF) daha belirgin bir hücre katmanı ayrımı sağladığını ve santrifüj tüplerinin distal yüzeylerinde hücre birikimini en aza indirdiğini göstermektedir (Kubesch vd., 2019; Miron vd., 2019). Yatay santrifüjleme protokolünde, venöz kan antikoagülan içermeyen 10 ml'lik tüplere alınır ve 8 dakika boyunca 2200 rpm hızında, 700 g (RCF) kuvvetinde santrifüj edilerek hazırlanır . Y-TZF'de, hücrelerin yoğunluklarına göre daha hızlı ve belirgin bir şekilde ayrılmasını sağlayan yatay santrifüjleme protokolü kullanılmaktadır

(Fujioka-Kobayashi vd., 2021). Yatay santrifüj yöntemiyle üretilen TZF bazlı materyallerin, yaygın olarak kullanılan sabit açılı santrifüjlerle kıyaslandığında, daha yüksek trombosit ve lökosit konsantrasyonlarına sahip olduğu tespit edilmiştir (Miron vd., 2019). Y-TZF, bol miktarda lökosit ve biyoaktif protein içerdiğinden, büyüme faktörlerinin yavaş ve düzenli bir şekilde salınmasını sağlar. Bazı araştırmalar, Y-TZF'nin kemik bloğu uygulamalarında anjiyogenez ve osteogenez gibi yüksek biyoaktivite gösterdiğini ifade etmektedir (Yu, Tian, vd., 2023).

Yatay santrifüjleme yapmanın en önemli avantajı tüpün iki ucu arasındaki RCF(göreceli santrifüj kuvveti- g kuvveti) farkının maksimuma yakın olmasıdır. Bu farkın fazla olması hücre katmanlarının daha belirgin şekilde ayrılmasına neden olur. Geleneksel santrifüj uygulamalarında bu durum olmadığından hücreler daha çok travmaya maruz kalır.

Yatay santrifüj yöntemiyle üretilen TZF, hücreler arasında doğrudan akışa olanak tanır. Bu, hücre tiplerinin daha iyi ayrılmasını sağlayarak, trombositler ve lökositler gibi istenilen hücrelerin uygun katmanlarda yoğunlaşmasını artırır. Yatay santrifüjleme metodu ile elde edilen TZF materyalleri, yüksek yapısal stabilite ve zengin hücre içeriğine sahip olup, büyüme faktörleri ve antiinflamatuar sitokinlerin uzun süreli salınımını gerçekleştirebilir (Lourenço vd., 2018). Bazı araştırmalar, L-TZF ile karşılaştırıldığında Y-TZF'deki etkili hücre sayısının neredeyse on kat daha fazla olduğunu doğrulamıştır. Ayrıca, Y-TZF'deki artan lökosit sayısının, geleneksel L-TZF protokollerine göre TZF'nin antimikrobiyal özelliklerini önemli ölçüde artırdığı gösterilmiştir. L-TZF ve Y-TZF, *S. aureus* ve *E. coli* gibi patojenlere karşı antibakteriyel etkiler göstermektedir. Ancak, Y-TZF, L-TZF ile kıyaslandığında bu mikroorganizmalara karşı çok daha etkili bir koruma sunmaktadır. **(Şekil 2.18)** (Feng vd., 2020).



Şekil 2.10: 4 saat boyunca inkübe edilen E. coli ve S.aureus bakteri kolonisinin L-TZF ve Y-TZF katmanıyla kantitatif analizi

(Feng vd., 2020)

2.11. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Hazırlanışı

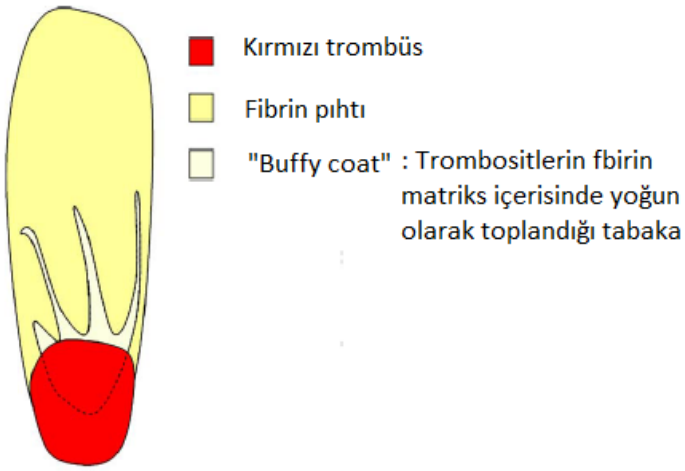
Basit ve tek aşamada hazırlanma protokolü en büyük avantajıdır.

Otojen venöz kan, herhangi bir antikoagülan içermeyen steril cam tüplere veya cam kaplı plastik tüplere alındıktan hemen sonra, yaklaşık 400g kuvvetinde 3000 rpm'de 10 dakika ya da 2700 rpm'de 12 dakika santrifüj edilerek hazırlanır. Trombin kullanılmaması, oluşan fibrin dokusunun doğal yapısını muhafaza etmesine yardımcı olurken, büyüme faktörlerinin enzimatik yıkıma uğramasını da engeller (Clark, 2001; Dohan Ehrenfest vd., 2012).

Uygulamanın etkinliği ise, kanın toplanma süreci ve santrifüj hızının doğru ayarlanmasına bağlıdır. Kan örneği alındıktan sonra, santrifüj işlemine gecikmeden geçilmesi gereklidir. Gecikme durumunda, tüpün orta kısmında fibrinojen yoğunlaşır ve bu durum fibrin ağının düzensiz şekilde polimerize olmasına neden olur. Bunun sonucunda, elde edilen TZF yapısı, zayıf ve düzensiz bir fibrin matriksi içerir.

Santrifüj işlemi sonucunda tüpte üç ayrı tabaka meydana gelir: en altta eritrositlerden oluşan kırmızı kan hücreleri fraksiyonu, en üstte trombositten fakir asellüler plazma ve bu iki katman arasında fibrin pıhtısı yer alır. Trombositlerin ve lökositlerin bu fibrin ağı içerisinde hapsolduğu, böylece TZF'nin parçalanmaya (degradasyona) karşı daha dirençli bir yapı kazandığı öne sürülmektedir (Arora & Agnihotri, 2017).

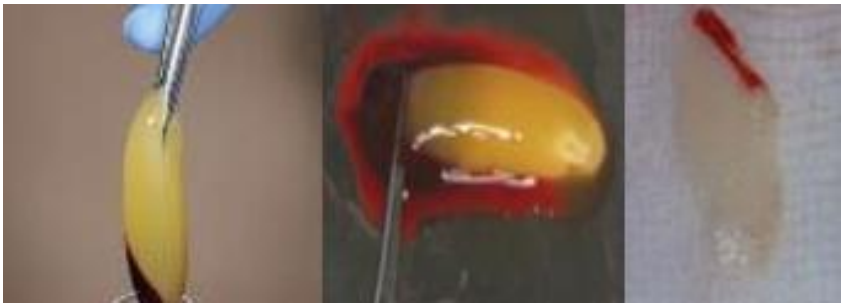
Santrifüj edilmiş tüplerde trombosit dağılımını inceleyen çalışmalar, trombositlerin en çok fibrin pıhtısının alt kısmında, özellikle kırmızı hücrelerle fibrin pıhtısı arasındaki bağlantı bölgesinde toplandığını göstermiştir. Ayrıca, kırmızı kan hücreleri tabakası ile bağlantı yerinde yoğunlaşan trombositlerin, fibrinin üst kısmındaki trombositlerden daha etkili olduğu öne sürülmektedir (Şekil 2.11) (Dohan vd., 2006b).



Şekil 2.11: L-TZF protokolünü takiben tüpte oluşan tabakalar

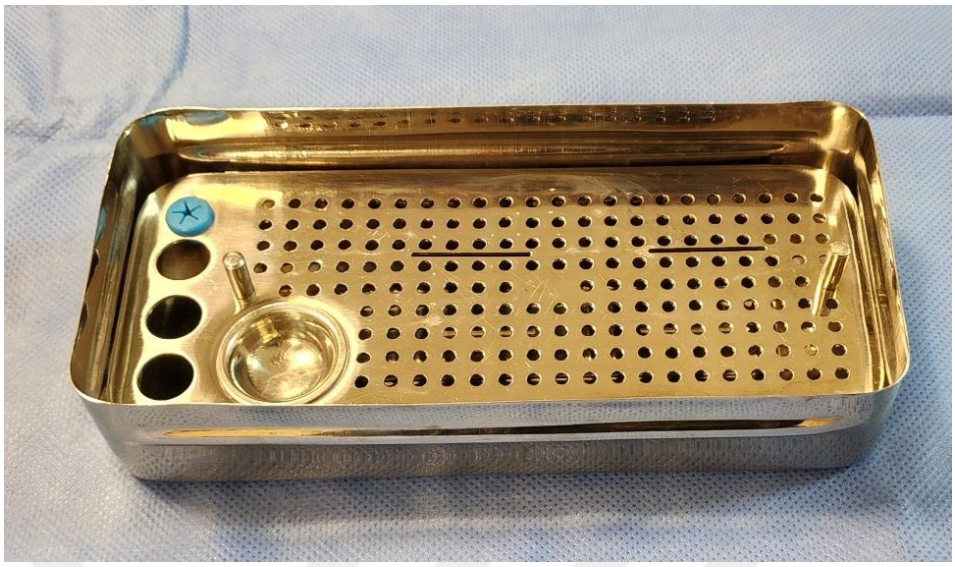
(Dohan vd., 2006b)

Basınç uygulanmadan fibrin pıhtının serumu ayrıştırıldığında, otojen kaynaklı fibrin materyal kalır (Şekil 2.12). Pıhtıdan membran elde etme işleminin standardizasyonunu sağlamak amacıyla TZF hazırlama kutusunu geliştirmiştir (Dohan Ehrenfest, 2010).



Şekil 2.12: Santrifüj işlemi sonrasında TZF'nin doğal görünümü ve membran formuna dönüştürülmüş hali

Pıhtı, bu kutudaki metal ızgaraya yerleştirilip kapağı kapatılarak işlenir (Şekil 2.13). Kutunun alt bölümünde TZF'nin preslenmesiyle biriken eksuda, greft materyallerini nemlendirme ve greftleri muhafaza etme amaçlarıyla kullanılabilir (Toffler vd., 2009).



Şekil 2.13: Choukroun'un geliştirdiği TZF kutusu

Elde edilen TZF'ler, TZF kutusu kullanılarak eşit ölçülerde membranlara dönüştürülebilir ve operasyon süresince bu kutu içinde muhafaza edilebilir. Küçük, kalın L-TZF diskleri veya "tıkaçlar" elde etmek için TZF pıhtısı, TZF kutusundaki silindirik çukurlara yerleştirilir ve pistonun ağırlığı ile yavaşça sıkıştırılır **(Şekil 2.14)**. Sonuç olarak, çapı 1 cm olan küçük silindirik diskler elde edilir; bu diskler, işlem bölgelerinde kullanılabilir (Toffler vd., 2009).

Şekil 2.14: TZF'in TZF kutusunda silindir disk haline getirilmesi

2.12. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin İçeriği

Joseph Choukroun'un TZF'si olarak bilinen L-TZF, kan kaynaklı ürünler arasında geliştirilen en yeni formülasyonlardan biridir. Lökosit ve trombosit yönünden zengin olup, büyüme faktörleri, sitokinler ve dolaşımdaki kök hücreleri içeren bir yapıya sahiptir.

2.12.1. Trombositler

Trombositler, kemik iliğindeki megakaryositlerden köken alan çekirdeksiz hücrelerdir. Dolaşımda ortalama 150.000-450.000/mm³ oranında bulunurlar. Sayılarının yüksek olması sebebiyle, damar bütünlüğünün muhafa edilmesinde kritik bir görevleri vardır. Küçük yapıları ve diskoidal şekilleri sayesinde kan akışı, trombositleri damar duvarına doğru iter ve onları endotel hasarını algılayacak en uygun pozisyona getirir. Kan dolaşımında yaklaşık 8-10 gün yaşayan trombositlerin sitoplazmaları, aktifleştiklerinde çevreye salınan granüller içerir.

Trombositlerde alfa, delta (yoğun granüller) ve lambda (lizozomlar) olmak üzere üç ana granül türü bulunur. Trombositler, hücre içi granüllerinde sentezlenen, depolanan ve dış ortama salınan proteinler aracılığıyla fonksiyonlarını gerçekleştirir. Elektron mikroskobu ile görülebilen bu granüller arasında, ışık mikroskobu altında gözlemlenebilenleri alfa granüller oluşturur (Arnoczky vd., 2011).

Trombositlerin temel görevi, doku hasarı oluşan bölgede hemostazı sağlamaktır. Yaralanma ya da cerrahi müdahaleyle damar endoteli hasar gördüğünde, kanamayı durdurmak için trombositler, endotel altındaki kolajenle temas ederek aktifleşirler. Temas sonrası yapışarak kümelenir ve tıkaç görevi üstlenirler. Aktif hale gelen ve şekil değiştiren trombositlerin merkezi kısmında biriken granüller, membran bağlantılı kanal sistemi ya da doğrudan membran ile füzyona uğrar (Clark, 2001). Degranülasyon süreciyle birlikte trombositler; delta granüllerinde depolanan ADP (adenozin difosfat), ATP (adenozin trifosfat), serotonin, histamin ve kalsiyumu ve fibrin matriksine salmaktadır (Blair & Flaumenhaft, 2009; Foster vd., 2009). Salınan protein yapısındaki moleküller, hedef hücrelerin yüzeyindeki transmembran reseptörlerle etkileşime girerek hücre içi sinyal iletim mekanizmalarını tetikler. Bu etkileşim, yara iyileşme sürecini yöneten genlerin ekspresyonunun başlamasını sağlar (Marx, 2004). Yara bölgesindeki trombosit yoğunluğunun artması, iyileşme sürecinin daha hızlı ve etkili olmasını sağlar.

Bu biyolojik özelliklerinden faydalanılarak TZP ve TZF gibi biyomateryaller geliştirilmiştir (Choukroun vd., 2006a; Dohan Ehrenfest, Rasmusson, vd., 2009).

2.12.2. Alfa Granüller

Trombositlerde yer alan alfa granüller, hemostazdan inflamasyona, yara iyileşmesinden anjiyogeneze kadar pek çok fizyolojik süreçte rol alan çeşitli biyolojik molekülleri içermektedir. Diğer granül türlerine kıyasla daha fazladır. Bu granüller, heterojen yapıları, büyük boyutları ve sayıca fazlalıkları nedeniyle trombositlerin başlıca (majör) granülleri olarak kabul edilir. İçlerinde hemostaz ve yara iyileşmesine katkıda bulunan 30'dan fazla biyoaktif protein taşırlar (Harrison & Cramer, 1993).

Adeziv proteinlerden özellikle fibronektin ve trombospondin gibi moleküller hücreler arası bağlantının kurulması, hemostazın sağlanması, pıhtılaşma süreci ve ekstraselüler matriksin oluşumunda görev alan proteinlerdir. Koagülasyon faktörleri ve inhibitörleri; trombinin aktivasyonunu ya da inhibisyonunu sağlayan moleküllerdir ve hücre çoğalmasında önemli bir rol üstlenirler.

Büyüme ve mitojenik faktörler, hücrelerin proliferasyonu, migrasyonu, farklılaşması ve doku onarım süreçlerinin düzenlenmesinde kritik rol oynayan biyolojik sinyal molekülleridir. Bu proteinler, yara iyileşmesi, anjiyogenez ve rejeneratif süreçler sırasında çeşitli hücresel yanıtları tetikler. Öne çıkan üyeleri arasında; hücre bölünmesini ve damar oluşumunu destekleyen trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), hücre proliferasyonu ve ekstraselüler matriks üretimini düzenleyen transforme edici büyüme faktörü beta (TGF-β), epitel dokuların yenilenmesinde etkili epidermal büyüme faktörü (EGF), yeni damar oluşumunu teşvik eden vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), bağ dokusu hücrelerinin çoğalmasını sağlayan fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve metabolik aktiviteyi artıran insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) yer almaktadır (Anitua vd., 2015; Choukroun vd., 2006b; Nurden, 2011).

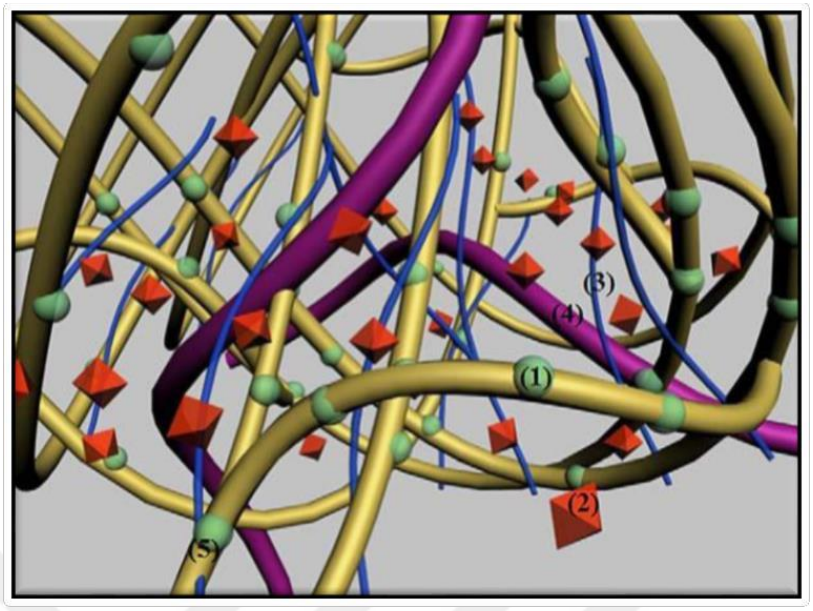
2.12.3. Lökositler

Lökositler, hasarlı alana ilk göç eden hücrelerdir. İnflamatuar reaksiyonları düzenler ve iyileşme sürecini destekleyen sitokinleri salgılarlar (P. Martin & Leibovich, 2005). İnflamatuar süreçlerde etkin rol oynayan başlıca sitokinler arasında interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve tümör nekroz faktörü alfa (TNF-α) yer almaktadır. IL-1,

özellikle yardımcı T lenfositlerin aktivasyonunu sağlayarak bağışıklık yanıtının şekillenmesinde kilit bir görev üstlenir. TNF-α ile birlikte, akut faz proteinlerinin sentezini uyarır, inflamatuar bölgede lökosit infiltrasyonunu artırır ve fagositik hücrelerin aktivitesini güçlendirir. Bu sitokinlerin sinerjik etkisi, inflamasyonun şiddetlenmesine ve kemik yıkımının artmasına neden olurken, aynı zamanda osteoblast aktivitesini baskılayarak yeni kemik oluşumunu olumsuz yönde etkiler (Gaur & Aggarwal, 2003). TNF-α, inflamatuar hücrelerin fagositoz yeteneğini geliştirir ve nötrofillerin hücre hasarı oluşturma kapasitesini artırır. Bununla birlikte, IL-1 ve IL-6 gibi temel proinflamatuar mediatörlerin sentezini modüle ederek, inflamatuar yanıtın yoğunluğunu ve etkinliğini artırıcı bir etki gösterir (Aggarwal, 2003). IL-6'nın salınımı, TNF-α, IL-1 ve bakteriyel endotoksinler tarafından indüklenir. Bununla birlikte, IL-6 inflamasyon sürecinde çift yönlü bir rol üstlenerek kendi üretimini artırabilir ya da baskılayarak inflamatuar yanıtın şiddetini dengeleyebilir (Kamimura vd., 2003).

Lökositler, iyileşme sürecinde kritik rol üstlenen TGF-β, PDGF, VEGF, IGF ve FGF gibi birçok büyüme faktörünün salınımını düzenler. Ayrıca, serin ve matriks metalloproteinazlar (MMP) gibi enzimlerin salınımında da etkilidirler, bu da dokuların yeniden şekillenmesine ve iyileşmesine katkı sağlar (Barrientos vd., 2008; Tsirogianni vd., 2006). Trombosit ve lenfositlerin uyarılması, enfeksiyonlara karşı antimikrobiyal savunma, sitokin dengesinin sağlanması ve fibrin-trombosit tıkacının meydana gelmesi gibi çok sayıda fizyolojik süreçte önemli işlevler üstlenirler (Hayashi vd., 2000; Tiggelman vd., 1995).

Yavaş polimerize olan TZF matriksinde; trombositlerden salınan sitokinler ve büyüme faktörlerinin yanı sıra, heparin, hyaluronik asit ve glikanik zincirler gibi biyomoleküller gömülü şekilde yer alır (Şekil 2.15) (Dohan vd., 2006b).



Şekil 2.15: TZF'nin polimerizasyonu sonucunda meydana gelen fibrin ağının bilgisayar ortamında tasarlanmış üç boyutlu modeli. 1: Fibrin ağı içindeki sitokinler. 2: Fibrin polimerlerinin dışında kalan solüsyondaki trombosit sitokinleri. 3: Fibrin ile ilişkili glikanik zincirler. 4: Dolaşımdaki glikoproteinler (fibronektin). 5: Glikanik zincirler ve sitokinler ile bağlantılı fibriller

(Dohan vd., 2006b)

2.12.4. Fibrin

Fibrinojen, plazmada serbest dolaşan çözünür bir protein olarak bulunmasının yanı sıra, trombositlerin α-granüllerinde de depolanır. Pıhtılaşma sürecinde, trombosit agregasyonu sırasında açığa çıkan trombin tarafından aktive edilerek görev alır. Bu süreçte kalsiyum iyonlarının varlığında fibrin iplikleri oluşur. Başka bir deyişle, fibrin, plazmadaki inaktif fibrinojenin aktif formudur. Fibrin iplikleri, kanın şekilli elemanlarını aralarına alarak çözünemeyen bir fibrin ağı meydana getirir. Bu ağ, vasküler hasarın bulunduğu alanda trombosit kümelerinin etrafında polimerize fibrin jelinden oluşan bir duvar oluşturur. Bu süreç, vasküler defekt boyunca ilk skatrisyel matriksin oluşumunu sağlar. Bu matriks içerisindeki hücreler, yara iyileşmesini teşvik eden büyüme faktörleri ve sitokinler salgılar. Bu mekanizma, normal koagülasyon sürecinin bir parçasıdır ve fibrin oluşumu, iyileşmenin ilk aşamasını temsil eder (Dohan vd., 2006b, 2006a).

2.13. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Biyolojik Etkileri

L-TZF, fibrin matriksi içerisinde rejenerasyon ve immün yanıtları için gerekli olan hücresel ve moleküler unsurları barındıran, terapötik potansiyele sahip bir

biyomateryaldir. Lökosit ve trombosit bakımından zengin olması, bu materyalin biyolojik etki mekanizmalarını doğrudan şekillendirmektedir. Fibrin matriksin bileşimsel özellikleri, yalnızca L-TZF için değil, tüm trombosit konsantrasyonları açısından belirleyici bir parametre olarak kabul edilmektedir (Choukroun vd., 2006b; Dohan vd., 2006a, 2006d).

2.13.1. Anjiyogenezin Düzenlenmesi

Anjiyogenez, hasarlı dokularda yeni damar oluşumunu sağlayan bir süreçtir ve bu süreçte fibrin matriks hem mekanik destek sunar hem de büyüme faktörleri ile sitokinlerin kontrollü salınımını sağlar. FGF, VEGF ve PDGF gibi faktörler fibrine bağlanarak endotel hücrelerinin göç, çoğalma ve farklılaşmasını destekler. Ayrıca fibrin, integrin sentezini uyararak hücre-matriks etkileşimini güçlendirir. L-TZF'nin bu etkileri, yara rejenerasyonunu desteklerken enfeksiyon riskini azaltır (Choukroun vd., 2006a).

2.13.2. Bağışıklığın Desteklenmesi

Fibrin ve fibrinojenin parçalanma ürünleri, nötrofillerin göçünü teşvik eder. Aynı zamanda, fagositoz ve enzimatik yıkım gibi immün fonksiyonları da düzenleyerek bağışıklık yanıtının etkinliğini yükseltirler. Nötrofiller, yara bölgesinde serbest radikal üretimi ve fagositoz yoluyla bakterileri elimine ederken; onları takiben gelen monositler, makrofajlara dönüşerek bölgeye yerleşir. Fibrin matriks içerisindeki kemotaktik faktörler ve fibronektin, bu hücrelerin yönelim ve dağılımını kontrol eder (Kazura vd., 1989; Lanir vd., 1988). Ayrıca, monosit ve makrofajların fibrin matriks ile etkileşimi, integrin reseptörü aracılığıyla fagositozun düzenlenmesini sağlar. Bu mekanizma sayesinde, makrofajlar inflamasyon ve fibrin tarafından düzenlenen doku tamiri arasındaki geçiş aşamalarında kritik bir rol oynar (Clark, 2001; R. V. Kumar & Shubhashini, 2013).

2.13.3. Yara Örtücülüğü

Fibrin matriksi, yara iyileşme sürecinde epitel hücreleri ve fibroblastların metabolik faaliyetlerini destekleyerek hasarlı bölgenin örtülmesini sağlar. Yara kenarında bulunan epitel hücreleri, matriks boyunca uzanarak geçici protein yapılar doğrultusunda hareket eder. PDGF ve TGF-β gibi büyüme faktörleri, fibrin ve fibronektin ile etkileşime girerek fibroblastların aktive olmasını ve integrinler aracılığıyla hasarlı bölgeye yönelmelerini sağlar. Bu hücreler, fibrinle doğrudan temas kurarak iyileşme sürecine

katılır. Fibrin yapısının yıkımı sonrası, fibroblastlar kolajen üretimine geçer ve böylece doku, iyileşmenin ilerleyen evrelerinde yeniden yapılanarak güç kazanır (Clark, 2001; Tuan vd., 1996).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu araştırmanın etik kurul onayı için Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 08.11.2023 tarih ve 51879863-65 sayılı kararıyla etik onay alarak yürütülmüştür. Çalışmamızın deney aşamaları Tokat Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Birimi'nde gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız, ağırlıkları 200-400 gr arasında olan 24 adet genç-erişkin dişi Wistar-Albino Rat üzerinde yapılmıştır.

3.2. Deney Hayvanlarının Hazırlanması

Ratlar Gaziosmanpaşa Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırmaları Birimi'nde üretilmiştir. Çalışma öncesi bütün ratlar sistemik enfeksiyon açısından muayene edilip değerlendirilmiştir. Deney öncesi ve sonrası dönemlerde ratlar hijyenik kafeslerde ortalama 21°C'de ve %40-60 nemli ortamda tutulmuştur. Denekler, gün ve gece sürelerinin eşit olacak şekilde ayarlandığı, 12 saatlik aydınlık ve 12 saatlik karanlık periyotlara sahip kontrollü yapay aydınlatma koşullarında tutulmuştur. Hayvanların beslenmesinde kullanılan yemler hazır peletler şeklinde günlük 20 gr olacak şekilde su ise 40 ml olacak şekilde düzenli olarak verilmiştir. Çalışma kapsamındaki bütün uygulamalar Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun izni ile Gaziosmanpaşa Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırmaları Birimi Yönergesi, Gaziosmanpaşa Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Kuruluş ve İşleyiş Yönergesi ve Helsinki Deklarasyonu Hayvan Deneyleri ile İlgili Etik Yasaları'na uygun olarak yapılmıştır.

3.3. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmanın verileri incelendiğinde etki büyüklüğünün 2.80 olduğu hesaplanmıştır. Alfa hata payı 0.05, %80 güç ile, 4 grup ve her bir grup 6 denek örneklem büyüklüğünün gerekli olduğu hesaplanmıştır. (Analiz için G-Power 3.1.9.7 programı kullanılmıştır)

Deney grupları:

- G1 (Kontrol grubu): Bu grupta 6 adet rastgele seçilmiş rat bulunmaktadır. Bu denekler opere edilmemiş ve ilaç verilmemiştir.

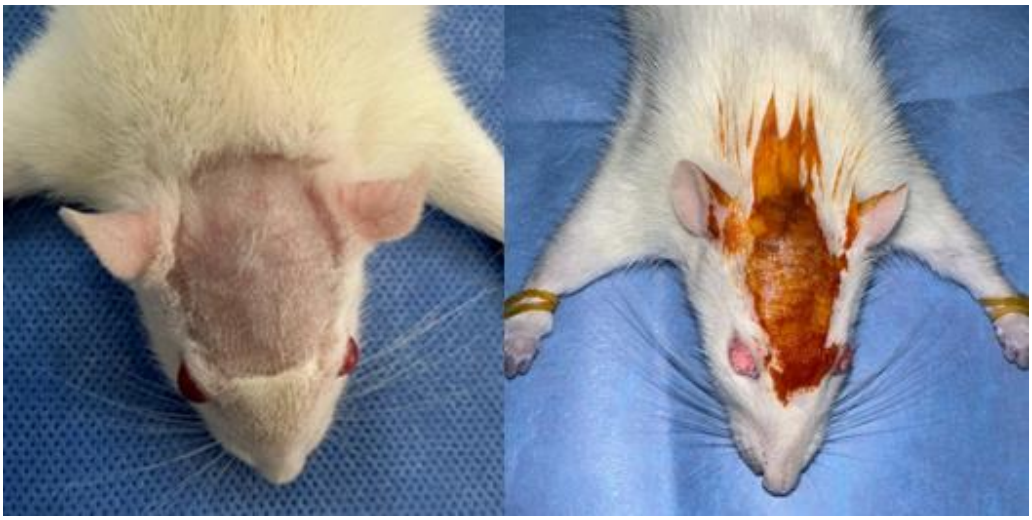
- G2: Ratın frontal kemiğinde defekt oluşturulan fakat herhangi bir biyomateryal koyulmayan gruptur. Bu grupta 6 adet rat yer almaktadır.
- G3: Ratın frontal kemiğinde defekt oluşturulmuş, defekt bölgesine L-TZF yerleştirilmiştir. Bu grupta 6 adet rat yer almaktadır. Kullanılan cihaz bilgisi: Electromag M815P santrifüj cihazı.(2700 RPMx12 dk,700g)
- G4: Ratın frontal kemiğinde defekt oluşturulmuş, defekt bölgesine Y-TZF yerleştirilmiştir. Bu grupta 6 adet rat yer almaktadır. Kullanılan cihaz bilgisi: Electromag M815 A2(açılır başlık) santrifüj cihazı.(2200 RPMx8 dk,700g)

Ratlar, deney grupları oluşturulurken rastgele bir şekilde seçilerek deney gruplarına alınmıştır.

3.4. Deneye Hazırlık

Anestezi öncesi uygun doz ayarlaması için bütün ratlar tek tek elektronik tartı ile tartılarak ağırlıkları belirlenmiştir. Anestezik ilaç olarak %10'luk Ketamin HCl (10mg/kg) (Ketalar®, Pfizer, New York, ABD) ve %2'lik Ksilazin (10 mg/kg) (Xylazinbio, Bioveta, Çek Cumhuriyeti) kombine edilerek kullanıldı. Anestezik, sol kasık bölgesine intraperitoneal teknikle uygulandı.

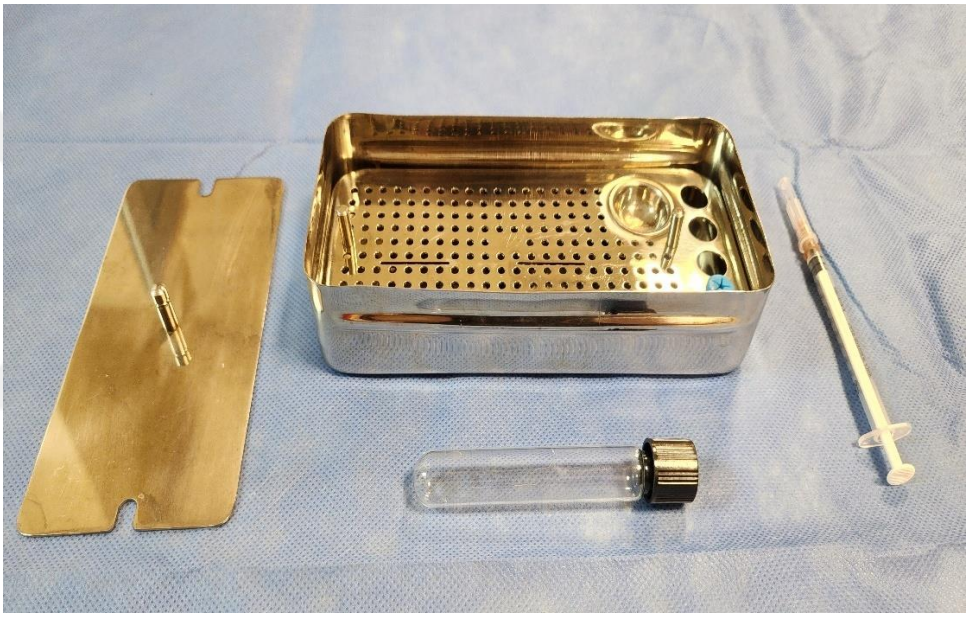
Anestezi uygulandıktan sonra ratın frontal bölgesi traşlanıp, antisepsi amacıyla bölge povidon iyot (Betadine® sol. Kansuk, Türkiye) uygulanmıştır. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1: Ratların frontal bölgelerinin traş edilmesi ve antisepsisi

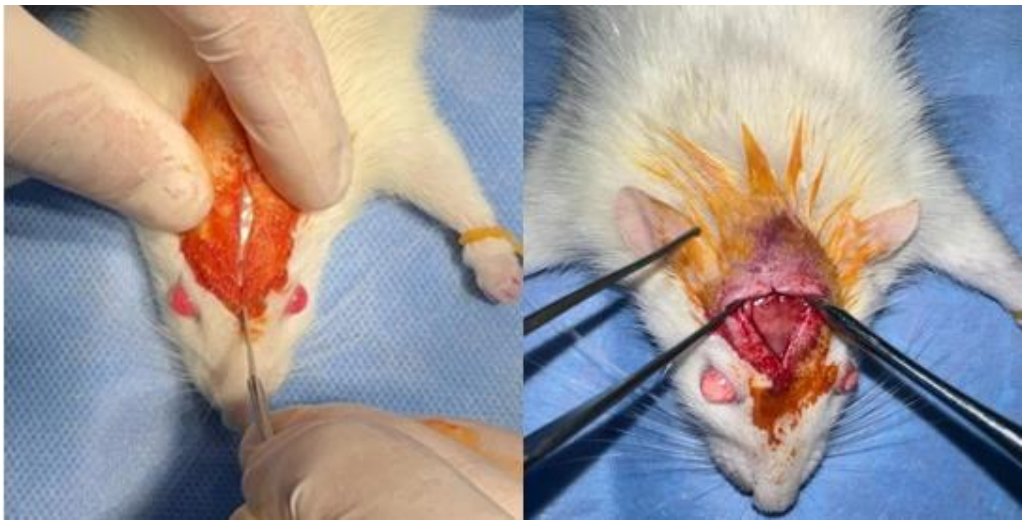
3.5. Deneklerin Opere Edilmesi

Cerrahi işleme başlamadan önce ratların kuyruklarından kan alınmıştır. Kan, ratların kuyruk toplardamarı veya atardamarından alınmıştır. Kuyruktaki damarın görünür hale getirilmesi için kuyruk 5-10 sn sıcak suya daldırılmıştır. Görünür hale gelen damardan 25-30 gaugelik iğne ile 1,5-2 ml kan alınmıştır. Alınan kan, trombositten zengin fibrin elde etmek için cam tüpe dikkatli bir şekilde konulup, elde edilmek istenen trombositten zengin fibrin türüne göre cihazlara yerleştirilmiştir. (Şekil 3.2)



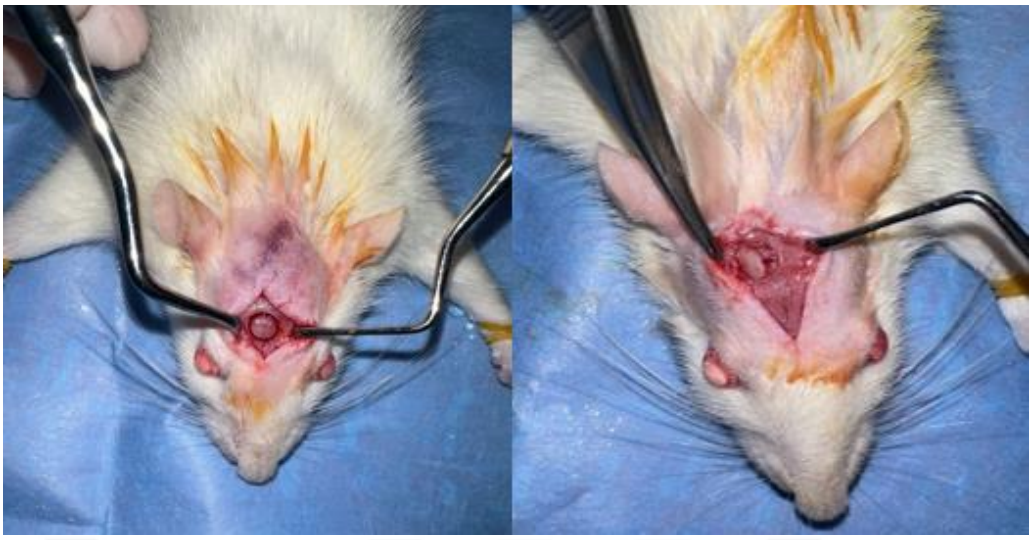
Şekil 3.2: Kullanılan TZF(trombositten zengin fibrin) kutusu, cam tüp ve kan almak için enjektör

Opere edilmek üzere hazırlanan ratların frontal bölgesinde 15 numaralı bistüri ile dikey kesi hattı oluşturulmuştur. Periost elevatörü kullanılarak kemik yüzeyi açığa çıkarılmış (Şekil 3.3) ve defekt oluşturmak için 5 mm çapında trefan frez, serum fizyolojik ile soğutma yapılarak kullanılmıştır. (Şekil 3.4) Ratın frontal kemiğinde trefan frez ile defekt hattı oluşturulduktan sonra dikkatli bir şekilde defekt hattındaki kemik çıkarılmıştır. (Şekil 3.5)



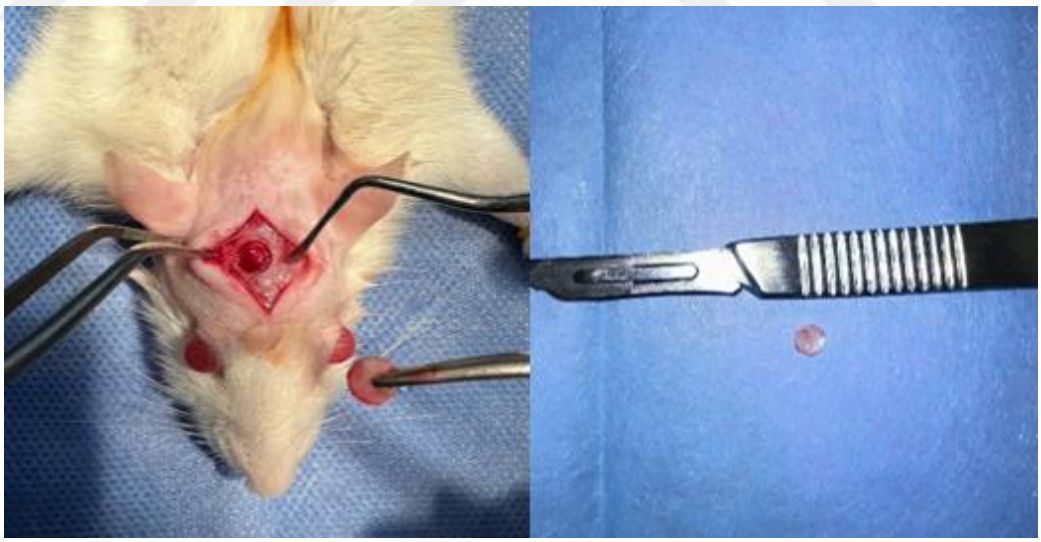
Şekil 3.3: İnsizyon ve elevasyonun ardından kemik dokusunun açığa çıkarılması

Şekil 3.4: Defekt oluşturmak için kullanılan trefan frez kullanılması



Şekil 3.5: Trefan frez kullanılarak defekt hattının oluşturulması ve defekt hattındaki kemiğin çıkarılması

Ratın kalvaryasında oluşturulan defekt alanından çıkarılan kemik başka bir işleme tabi tutulmamıştır. **(Şekil 3.6)**

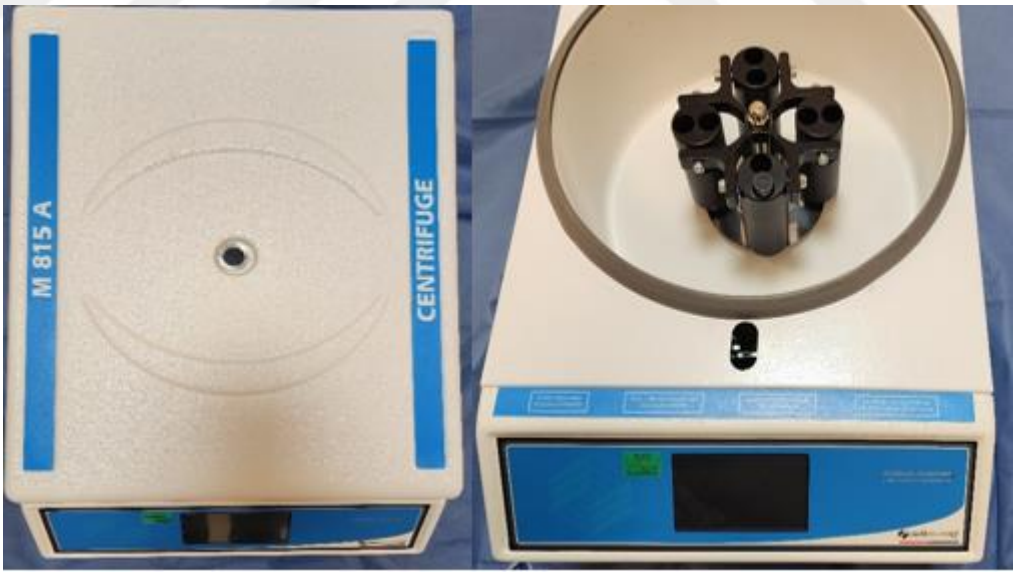


Şekil 3.6: Kafatasındaki defektin görünümü ve çıkarılan kemik parçası

G3 ve G4 gruplarındaki ratların kalvaryasında oluşturulan defekte, kuyruğundan alınan kanın cihazlarda santrifüj edilmesinden sonra elde edilen trombositten zengin fibrin uygulaması yapılmıştır. G3 grubundaki ratlardan alınan kan L-TZF elde etmek için Electromag M815P santrifüj cihazına (2700 RPMx12 dk,700g) konulmuştur.**(Şekil 3.7)**

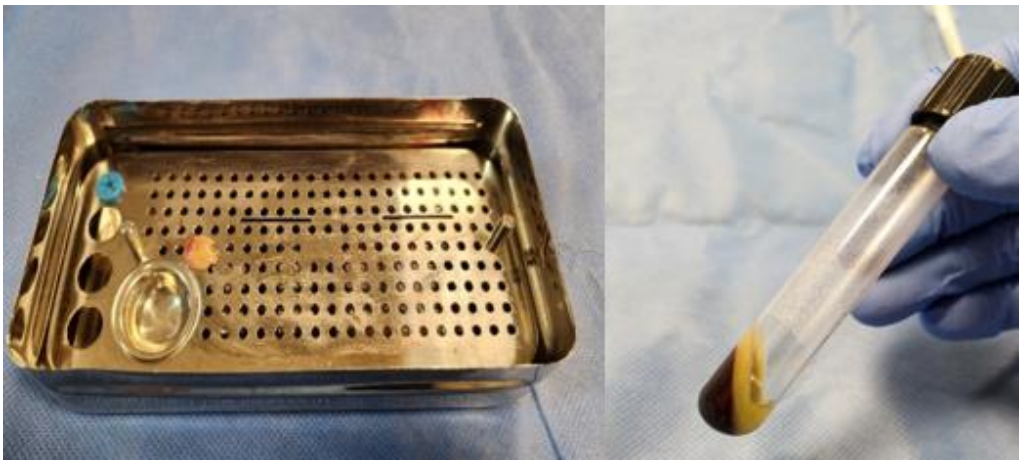
G4 grubundaki ratlardan alınan kan Y-TZF elde etmek için Electromag M815 A2(açılır başlık) santrifüj cihazına(2200 RPMx8 dk,700g) konulmuştur. **(Şekil 3.8)**

Şekil 3.7: L-TZF elde etmek için kullanılan Electromag M815P santrifüj cihazı



Şekil 3.8: H-TZF elde etmek için kullanılan Electromag M815 A2(açılır başlık) santrifüj cihazı

G3 ve G4 gruplarındaki ratlarda oluşturulan defektlere kuyruklarından alınan kandan başarılı bir şekilde elde edilen sırasıyla L-TZF ve Y-TZF, TZF kutusunda diğer bileşenlerinden arındırılmıştır. **(Şekil 3.9)**



Şekil 3.9: Elde edilen TZF ve TZF kutusuna konulması

Ratların kendi kanlarından santrifüj cihazları kullanılarak elde edilen L-TZF (2700 RPMx12 dk,700g) ve H-TZF(2200 RPMx8 dk,700g), frontal bölgede oluşturulan defektlere nakledilmiştir.**(Şekil 3.10)** Ratlar opere edildikten sonra kesi hatları 3.0 ipek sütur ile kapatılmıştır. Uygulanan cerrahi müdahale, ratlar tarafından sorunsuz bir şekilde tolere edilmiştir. Operasyon sırasında ve sonrasında herhangi bir olumsuz tablo ile karşılaşılmamıştır. Uygulanan TZF'ler otolog biyomateryal olduğundan ratlar üzerinde toksik bir etki oluşturmamıştır.

Tüm ratlar operasyon gününden itibaren 35 gün sonra sakrifiye edilmiştir. Sakrifiye edilene kadar post-operatif bakımda ratlar günlük tek doz olacak şekilde 1-2 mg/ml asetaminofen ve 1 gr+4 ml serum fizyolojik ile sulandırılarak(1 ml'de 250 mg sefazol bulunur) oral yoldan verilmiştir. Sakrifiye edilene kadar her gün ratların yara bölgeleri povidon iyot ile temizlenmiştir.

Şekil 3.10: Elde edilen TZF'nin defekt bölgesine uygulanışı

3.6. Sakrifikasyon

Tüm gruptaki ratlar opere edildikten 35 gün sonra ötenazi amacıyla ketamin-ksilazin karışımı yüksek doz uygulanıp uyutuldu. Dekapitasyon (baş kesme) yapılıp, doku örneklerinin alınması için ratların kafa derileri tamamen yüzüldü.

3.7. Doku Örneklerin Hazırlanması

Kafa derisi tamamen yüzülmüş ratların işlem yapılmış olan frontal bölgeleri yüksek devir turlu piyasemen yardımıyla serum fizyolojik soğutma altında ve makas kullanılarak çıkartıldı.**(Şekil 3.12)** Alınan örnekler %4 lük tamponlu nötral formalin solüsyonuna konularak Histoloji Embriyoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarına gönderilmiştir.

Şekil 3.11: Alınan doku örneklerinin bazıları

3.8. Histopatolojik Değerlendirme

3.8.1. Doku Takibi

Deney sonunda ratların işlem gören kafatası kemikleri çıkarılıp %4'lük tamponlu nötral formalin solüsyonunda fikse edildikten sonra EDTA'lı dekalsifikasyon solüsyonunda 1 ay süre ile dekalsifiye edildi. Rutin histolojik doku takibi işlemler sonrasında hepsi aynı yönelimde olacak şekilde parafin bloklara gömülerek sabitlendi. Parafin bloklardaki kemik dokularından rotary mikrotom (Leica RM2135, Germany) ile 5µm kalınlıkta ardışık seri kesitler alınıp lamlara yerleştirildi. Hematoksilen eosin ve immünohistokimyasal olarak boyanacak preparatlar haline getirildi.

3.8.2. Hematoksilen-Eozin Boyama

Formalinle fikse edilip parafin bloklara gömülen kemik dokusu kesitlerinin hematoksilen eozin boyaması özetle şu şekilde yapıldı: Deparafinizayon, rehidratasyon, hematoksilen solüsyonunda bekletme, akarsuda yıkama, asit alkole daldırma, distile su, eosin boya solüsyonunda bekletme, distile suda yıkama, alkol serilerinden (%70,80,90,96,99) ve ksilenlerden geçirildikten sonra lamel ile kapatma işlemleri yapıldı.

3.8.3. Histopatolojik Analiz

Hematoksilen eozin boyalı kafatası kemik doku kesiti preparatları araştırma için ışık mikroskobu (Nikon Eclipse 200; Japonya) ile değerlendirildi. Her bir grupta kafatası kemiği defekt alanında oluşan doku, çevre sağlam doku ile birlikte mikroskop altında görüntülenip yeni oluşan dokunun kapladığı alan kalitatif olarak değerlendirildi.

3.8.4. İmmünohistokimyasal Boyama

Formalinle fikse edilip parafin bloklara gömülen kafatası kemik dokularından alınan 5 µm kalınlıktaki ince doku kesitleri ALP, BMP ve ONC moleküllerin immün ekspresyonlarını tespit etmek amacıyla indirekt immünohistokimyasal boyama protokolüne göre boyandı. İmmünohistokimyasal boyama prosedürü özetle şu şekilde uygulandı. Polilizinli lamlara alınmış olan 5 µm kalınlıktaki ince doku kesitleri 60^0C etüvde parafini eritilip ksilenlerde deparafinize edildikten sonra gittikçe seyrelen alkol serilerinden (%100,90,80,70) geçirilerek distile suda rehidrate edildi. 10 mM sitrikasit

içerisinde mikrodalga ile antijen retrival işlemi sonrasında %3'lük hidrojen peroksit (H2O2) solüsyonunda (10 dk) endojen peroksidaz blokajı yapıldı. Fosfat buffer solüsyonunda (PBS) yıkanıp (3x5 dk) çevresi hidrofobik kalem ile sınırlandıktan sonra non-immün bloklama serumu damlatılarak nemli karanlık ortamda 15 dk bekletildi. Doku kesitler üzerine ALP (Biorbyt 1/100, USA), BMP (Elabscience Biotecnology 1/200, USA) ve ONC (Elabscience 1/50, USA) primer antikorlar eklenip kapalı nemli bir ortamda $\pm 4^0$C de gece boyu inkübe edildi. PBS ile yıkama işlemi (3x5dk) sonrası biyotinli sekonder antikor ile kapalı nemli karanlık ortamda 45 dk oda ısısında inkübe edildi. PBS ile yıkama (3x5dk) sonrasında ikinci bir sekonder antikor streptavidin-horseradish peroxidase conjugated reagent (HRP) damlatılıp kapalı nemli bir ortamda 30 dk inkübe edildiler. PBS yıkama işlemi (3x5dk) sonrası amino etil karbozol kromojen (AEC) solüsyonu ile renklendirildi. Hematoksilen ile zıt boyama yapılıp distile sudan geçirildikten sonra su bazlı (aquose mount reagen) kapama solüsyonu aracılığı ile lamelle kapatıldı. Negatif kontrol kesiti için birkaç kesite primer antikor yerine PBS damlatıldı ve bu kesitlerde immune boyanma olmadı.

3.8.5. İmmünohistokimyasal Analiz

İmmün boyanma şiddetlerinin tespiti, araştırma ışık mikroskobu (Nikon Eclipse 200; Nikon) ile 40X büyütmede NIS-Element programında (Hasp ID:6648AA61; Nikon) Tablo 4.1'deki immün boyanma şiddeti skorlaması kriterleri temel alınarak yapıldı. Bu amaçla ALP, BMP ve ONC moleküller için immunohistokimyasal boyalı kesitlerde boyanmamış ve boyanmış hücreler / alanlar Tablo 3.1'deki boyanma reaksiyonu şiddetlerine göre kategorik olarak sayıldı. Elde edilen grup ortalama sonuçları [$\sum$Pi(i+l)] formülü ile H-skor değerlerine dönüştürüldü. Formülde; i: boyanma yoğunluğu skorunu, Pi: boyanan hücrelerin yüzdesini göstermektedir. Analizler iki histolog tarafından yapıldı.

Tablo 3.1: İmmün boyanma şiddeti derecelendirme kriterleri

Skor	İmmün Reaktivite
0+	Negatif boyanma
1+	Zayıf şiddette boyanma
2+	Orta şiddette boyanma
3+	Şiddetli boyanma

3.8.6. İstatistiksel Analiz

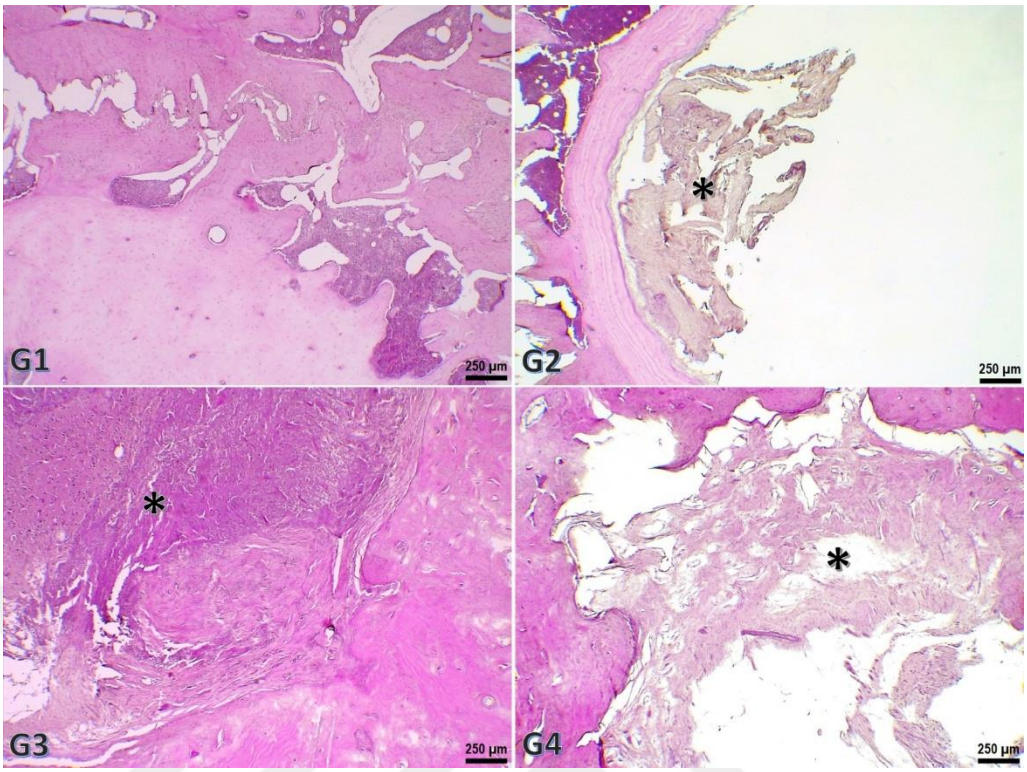
İstatistiksel analizler IBM SPSS-22 Windows istatistik paket programı One-Way ANOVA ile yapıldı. Gruplar arası varyans homojenliği sağlandığında ALP, BMP ve ONC moleküllerin immün histokimyasal boyanma H-skor değerlerinin karşılaştırılması One-Way ANOVA Post Hoc çoklu testlerden Tamhane testi ile yapıldı. Grup ortalama değerleri ± standart error mean (SEM) şeklinde ifade edildi. $p < 0.05$ olması istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Histopatolojik Analiz Sonucu

Histopatolojik incelemeler sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.1 ‘ de gösterildiği gibidir.

G1 (Kontrol) grubu normal kafatası kemik görüntüsüdür. G2 grubunda etrafta normal kemik dokusu, orta kısımda ise defekt alanı mevcuttur. Defekt alanında, intakt kemik doku sınırlarının bazı yerlerinde çok az alan işgal eden, hücresel içeriği yoğun, çoğunlukla gevşek / areolar kıvamlı yeni oluşan rejeneratif doku gözlemlendi. G3 grubunda intakt kafatası kemik doku ortasındaki defekt alanının büyük çoğunluğunda, bazı örneklerde neredeyse tamamını dolduracak miktarda kemikleşmesi henüz tamamlanmamış, ancak daha kompakt yapıda yeni oluşan rejeneratif doku gözlemlendi. G4 grubunun görüntülerinde ise intakt kafatası kemiği ortasındaki defekt alanında, defekt alanının yaklaşık olarak yarıya yakınını dolduracak düzeyde kimi yerlerde areolar kimi yerlerde bir miktar kompakt kıvamlı yeni oluşmuş rejeneratif doku gözlemlendi. Özetle Hematoksilen-Eozin boyamada, G2’ye kıyasla rejeneratif doku oluşumu mikroskopik olarak G3 ve G4’te anlamlı derecede daha belirgindir ve G3’ün de G4’e göre üstünlüğü gözlemlenmiştir.



Şekil 4.1: Gruplardan temsili örnek kafatası kemiği defekt alanı ve defekt bölgesinde oluşan rejeneratif doku mikroskobik görüntüleri. G1 de normal histolojik yapıda sıçan kafatası kemik doku, G2 de çevre intakt kemik doku ve ortada yeni oluşmuş olan rejeneratif doku, G3 de çevre intakt kemik doku ve ortada defekt alanında yeni oluşmuş büyükçe yer kaplamış olan rejeneratif doku, G4 de çevre intakt kemik doku ve ortadaki defekt alanında yeni oluşmuş orta düzeyde yer kaplamış olan rejeneratif doku görülmekte. *****: defekt alanında yeni oluşmuş rejeneratif dokuyu işaret etmekte (Hematoksilen eozin, Scale bars: 30 µm).

4.2. İmmün histokimyasal Analiz Sonuçları

ONC, BMP ve ALP moleküllerin immün ekspresyonlarının immün histokimyasal boyanma şiddeti H-skor değerleri Tablo 4.1'de toplu olarak verilmiştir. Şekil4.2, Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te ayrı ayrı karşılaştırmalı grafiksel olarak verilmiştir. Ayrıca immün histokimyasal boyalı her gruptan temsili birer mikroskobik resimleri Şekil 4.5'te gösterilmiştir.

ONC molekülünün immün histokimyasal boyanma şiddetinin yoğunluğu H-skor değeri en az G2 grubunda bulundu. G4, G1 ve G3 gruplarında sırası ile artmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.2). ONC molekülünün immün ekspresyonunda, G2 grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede G1, G3 ve G4'ten düşüktür. Ayrıca ONC

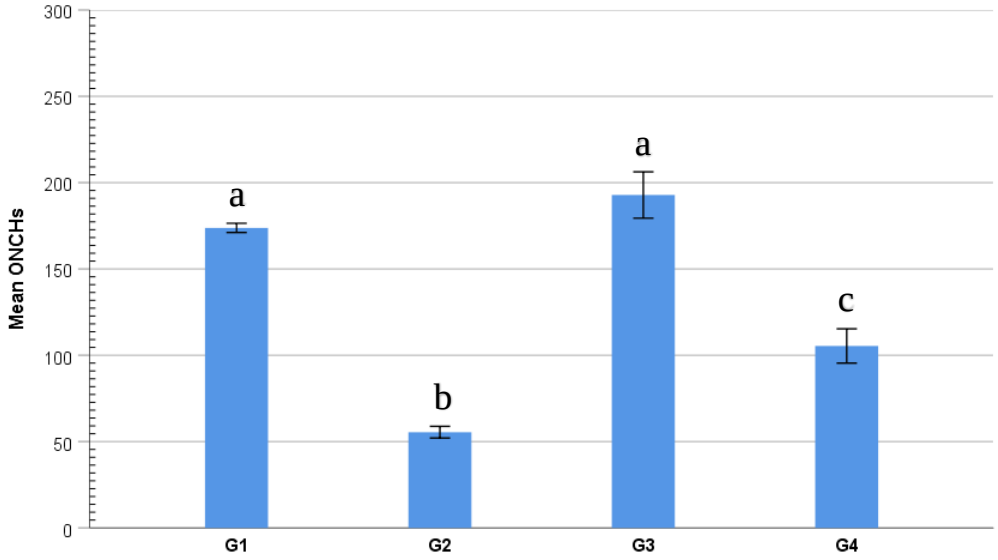
molekülünün immün ekspresyonu G4'e kıyasla G3 grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir.

BMP molekülünün immün histokimyasal boyanma şiddetinin yoğunluğu H-skor değeri en az G2 grubunda bulundu. G3, G1 ve G4 gruplarında sırası ile artmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.3). BMP molekülünün immün ekspresyonunda, G2 grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede G1,G3 ve G4'ten düşüktür. İstatistiksel olarak G3 ile G4 grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

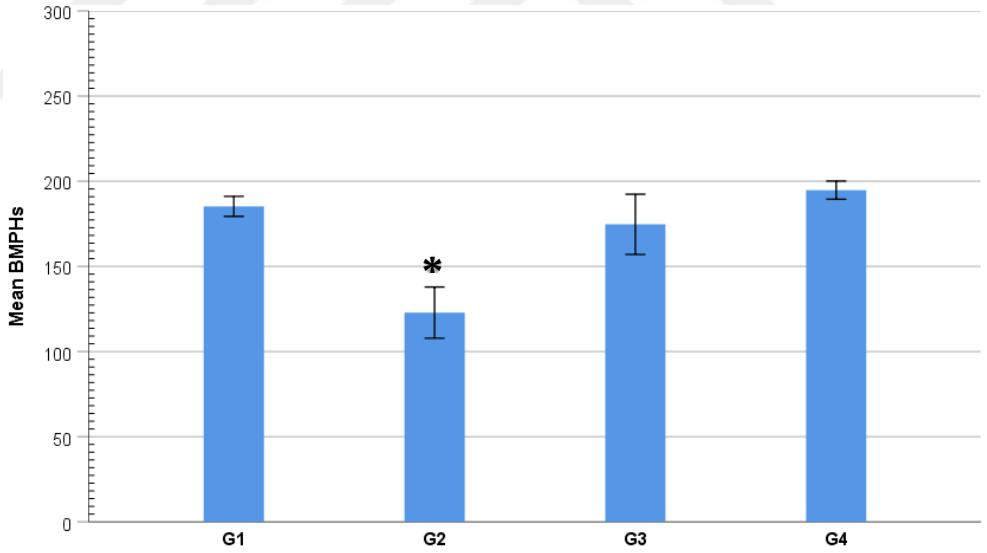
ALP molekülünün immün histokimyasal boyanma şiddetinin yoğunluğu en az G2 grubunda bulundu. G4, G1 ve G3 gruplarında sırası ile artmış olduğu tespit edildi (Şekil 4.4). ALP molekülünün immün ekspresyonunda, G2 grubu istatistiksel olarak anlamlı derecede G1,G3 ve G4'ten düşüktür. İstatistiksel olarak G3 ile G4 grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo 4.1: ONCHs, BMPHs, ALP moleküllerin immün boyanma şiddeti H-skorları grup ortalama değerleri

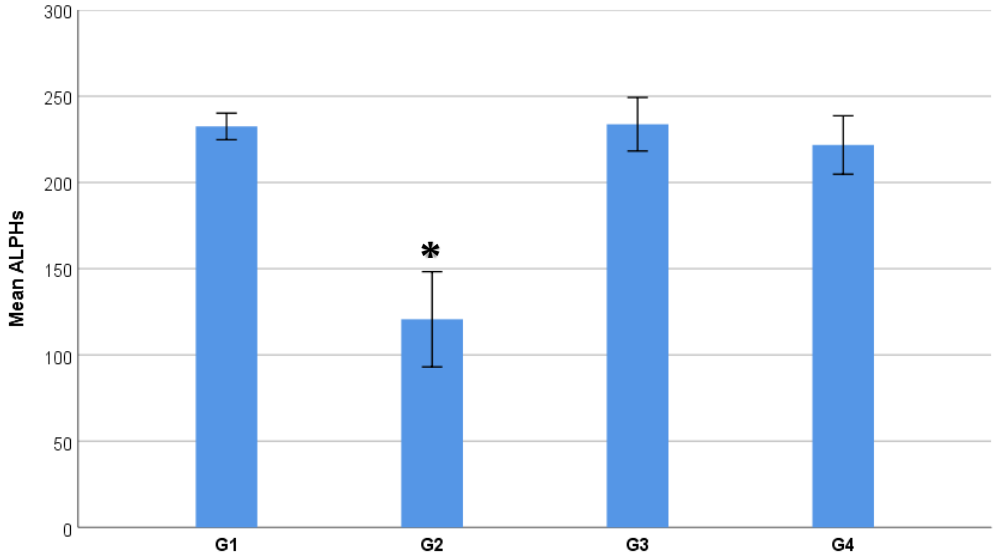
	Gruplar							
	G1		**G2**		**G3**		**G4**	
	Mean	**sem**	**Mean**	**sem**	**Mean**	**sem**	**Mean**	**sem**
ONCHs	173,78	2,66	55,43	3,39	192,82	13,42	105,37	9,94
BMPHs	185,24	5,88	122,86	15,04	174,68	17,66	194,78	5,31
ALPHs	232,47	7,69	120,63	27,63	233,73	15,53	221,71	16,96



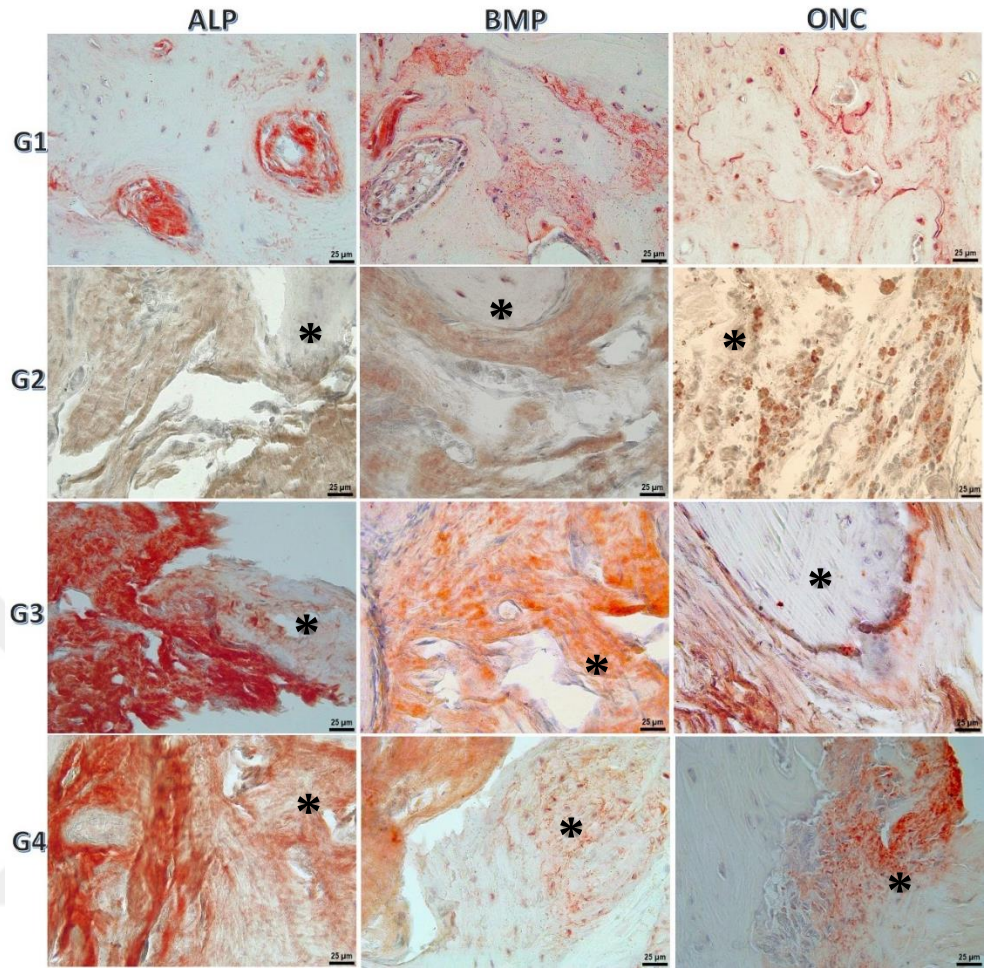
Şekil 4.2: Gruplarda ONC molekülü immün ekspresyonlarının immün histokimyasal boyanma şiddeti H-skor değerleri karşılaştırmalı grafiksel görünümü. Barlar üzerindeki harfler istatistiksel olarak farklılık ve benzerlikleri gösterir.



Şekil 4.3: Gruplarda BMP molekülü immün ekspresyonlarının immün histokimyasal boyanma şiddeti H-skor değerleri karşılaştırmalı grafiksel görünümü. *: $p < 0.05$ (G2 istatistiksel olarak diğer gruplardan farklı; G1, G3 ve G4 istatistiksel olarak benzer)



Şekil 4.4: Gruplarda ALP molekülü immün ekspresyonlarının immün histokimyasal boyanma şiddeti H-skor değerleri karşılaştırmalı grafiksel görünümü. *: $p < 0.05$ (G2 istatistiksel olarak diğer gruplardan farklı; G1, G3 ve G4 istatistiksel olarak benzer)



Şekil 4.5: Her bir gruptan ONC, BMP, ALP molekülleri için immünohistokimyasal boyalı temsili mikroskobik resimler bulunmaktadır. (IHC- AEC, Scale bars: 25 µm).

ONC molekülün immün boyanma yoğunluğu en az G2 grubunda olup G4, G1 ve G3 gruplarında sırası ile artmış olduğu görülmektedir. BMP molekülünün immün boyanma yoğunluğu G2 de en az G3, G1 ve G4 gruplarında sırası ile artmış olduğu görülmektedir. ALP molekülünün immün boyanma yoğunluğu G2 de en az G4, G1 ve G3 gruplarında sırası ile artmış olduğu görülmektedir. (Şekil 4.5)

5. TARTIŞMA

Kemik dokusu üzerine araştırmalar yapan pek çok bilim insanı, doku rejenerasyonunu teşvik etmek ve rekonstrüksiyona katkı sağlamak üzere uygulanabilecek alloplastik veya biyomateryallerin kemik iyileşmesini hızlandıracak yöntemler üzerinde çalışmalar yapmaktadır.

Özellikle maksillofasiyal cerrahilerde, büyük kemik kayıplarının onarımı oldukça güçtür. Bu nedenle, araştırmacılar kemik onarımıyla ilgili yaşanan zorlukları aşmak niyetiyle, hayvan bazlı araştırma modelleri geliştirerek bu modeller üzerinde çeşitli çalışmalar yürütmektedir. Kemik defektlerinin onarımını incelemek amacıyla literatürde çeşitli defekt modelleri üzerinde araştırmalar gerçekleştirilmiştir (Bodde vd., 2008; Kim vd., 2010).

Deneysel çalışmalarda en sık tercih edilen modellerin başında tavşan ve sıçan kafatası defekt modelleri gelmektedir. Histing ve arkadaşları, rat ve farelerin kafatasının haversian kanal sistemi olmaması sebebiyle bazı eksiklikler olsa da, bu hayvanların küçük boyutları, oda sıcaklığı, nem ve yemin kolayca standardize edilebilmesi ve düşük maliyetleri gibi avantajlara sahip olduklarını vurgulamışlardır (Histing vd., 2011). Bu olumlu özellikler dikkate alınarak, bu çalışmanın deneysel uygulamalarında hayvan modeli olarak rat kullanılmıştır. Sunulan çalışmanın verileri analiz edilip, istatistiksel ve etik kurallara uygunluğu sebebiyle 24 adet rat üzerinde deney gerçekleştirilmiştir.

Anatomik olarak kemirgen iskeletinin femur, omurga, mandibula ve kalvaryum gibi birçok bölgesi bilimsel çalışmalara hizmet edebilir. Sıçan kalvaryum defekti, hızlı bir şekilde oluşturulabilen ve genellikle femoral defektlerdeki gibi iskeletin stabilizasyonu için fiksasyon gerektirmeyen bir defekt modelidir. Dolayısıyla, biyomateryal veya kemik rejenerasyon stratejisinin amacı göz önünde bulundurulduğunda, sıçan kalvariyal defekti kemik rejenerasyonunun in vivo değerlendirilmesi için hızlı ve yüksek verimli bir yöntem olarak tercih edilebilir. Bununla birlikte, uzun kemiklere kıyasla daha az yüke maruz kalan bir anatomik bölge olarak, biyomekanik kuvvetlere dayanması amaçlanan bir kemik rejenerasyon stratejisinin işlevsel olarak test edilmesi kalvaryum defektinin dezavantajıdır (Spicer vd., 2012). Embriyolojik ve morfolojik olarak membranöz ossifikasyon süreciyle şekillenen kalvarya, bu yönüyle yüz kemikleriyle gelişimsel benzerlik göstermektedir. İki kortikal

tabakadan oluşan anatomik yapısı ise, mandibula ile yapısal paralellik taşır (Frame, 1980). Atrofik mandibulaya benzer fizyolojik yapısı nedeniyle, maksillofasiyal alanda gerçekleştirilen deneysel cerrahi çalışmalarda tercih edilen başlıca bölgelerden biri olarak kabul görmektedir (Prolo vd., 1984). Kafatası defekt modeli, operasyon esnasında histolojik ve radyografik analizlerinde kolaylık sunması, anatomik olarak erişiminin rahat olması, cilt yapısının ve altındaki dokuların biyomateryaller için fiksasyon gerektirmemesi, greftlenmiş bölgelerin kontrol edilip karşılaştırılabilmesi gibi avantajlar nedeniyle araştırmacılar tarafından sıkça tercih edilmektedir (An & Friedman, 2020; Ozdemir vd., 2013). Parietal bölgede oluşturulan defektlerin alt yüzeyinde yer alan dura mater ve periost, osteoprogenitör hücreler içerdiğinden duranın kemikleşme sürecinde etkin bir rol oynadığı bildirilmiştir (Greenwald vd., 2000). Tüm bu olumlu yönler, sunduğumuz çalışmanın rat kalvaryal defekt modelinin seçilmesinde etkili olmuştur.

Kafatasında defekt oluşturulan çalışmalarda önemli faktörlerden biri, defektin boyutudur. Hayvanlarda kemik defektleri, altı ay gibi bir süre zarfında tedavi edilmeden kendiliğinden iyileşebilir. Ancak, kendiliğinden iyileşemeyen kritik boyutlarda bir defekt oluşturmak, modelin ana odak noktasıdır (An & Friedman, 2020). Defekt boyutunun belirlenmesi üzerine pek çok araştırma yapılmıştır. Schmitz ve arkadaşları, 3, 4 ve 8 mm'lik defektler oluşturarak gerçekleştirdikleri çalışmada, ideal defekt boyutunun 8 mm olduğunu belirtmişlerdir (Schmitz vd., 1990). Aybar Odstrcil ve ark. yaptıkları bir çalışmada ise ratlar için kritik defekt boyutunun yaklaşık 5 mm olarak belirtmiştir (Aybar Odstrcil vd., 2005). Hudieb ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, yaşın defekt boyutlarına etkisini değerlendirmiş 3 mm,4 mm,5 mm ve 7 mm defektler cerrahi olarak oluşturulmuştur. Cerrahiden 8 hafta sonra radyolojik inceleme sonucunda 4 mm defekt grubunda yaşlılarda kemik oluşumu gözlenmez iken gençlerde gözlenmiştir. Sonuçlar 5 mm defektin genç yetişkin sıçanlarda kalvaryal kemik defektleri için kritik bir boyut olarak kabul edildiğini doğrulamıştır (Hudieb vd., 2021). Sunulan çalışma, literatürün ışığında yaşın defekt boyutuna etkisi göz önünde bulundurularak genç yetişkin rat kullanılarak yapılmıştır. Defekt boyutuyla ilgili literatürde ortak bir görüş olmamakla birlikte, çalışmaların çoğunda kritik defekt boyutu 5 mm olarak belirtilmiştir. Bu tez çalışmasında literatürle uyumlu olarak 5 mm'lik defektler tercih edilmiştir.

Chen ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kritik boyut kafatası defektine TZF içeren 3 boyutlu yazıcı ile elde edilmiş polikaprolakton iskeleti yerleştirmiş ve kemik

oluşumunu değerlendirilmiştir. 4.hafta ve 8.hafta da sakrifiye edip hem dental hem mikro bilgisayarlı tomografi ile ölçümler yapmış 4.haftada kemik oluşumunun gözlendiğini ortaya koymuştur (Chen vd., 2021). Wähnert ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada rat kafatası kritik boyut defektlerinde farklı materyallerin iyileşme oranlarını karşılatırmış ve ratları 30 gün sonunda sakrifiye etmiştir (Wähnert vd., 2021). Bu çalışmada literatüre uyumlu olarak ratlar cerrahi prosedür uygulandıktan 4 hafta sonra sakrifiye edilmiştir.

Oral ve maksillofasiyal cerrahi alanında trombosit konsantrasyonlarından biri olan TZF sıkça kullanılmaktadır. TZF ilk olarak, 2001 yılında Choukroun ve ark. tarafından ek ajanlara ihtiyaç duyulmadan geliştirilmiştir (Choukroun vd., 2001). TZF hazırlanırken protokolü TZP'ye göre daha basittir ve antikoagülan ajanlara ihtiyaç duyulmaması gibi avantajları bulunmaktadır. Bundan dolayı, TZF'nin kullanımı zaman içinde giderek artmış ve cerrahi işlemlerde TZP'nin yerini almıştır (Jo vd., 2013).

Bir araştırmada TZF'nin içeriğinde TZP'ye kıyasla daha yüksek oranda trombosit, granülosit, sitokin, enzim ve büyüme faktörü bulunduğu ortaya konmuştur (Choi vd., 2005). TZF, yüksek trombosit ve lökosit seviyelerine sahip olup, içeriğinde trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), epidermal büyüme faktörü (EGF) ve dönüştürücü büyüme faktörü (TGF) gibi çeşitli büyüme faktörlerinin yüksek konsantrasyonlarını barındıran, fibrin matriksinden oluşan otolog bir biyomateryaldir (Weibrich vd., 2003). Biyokimyasal herhangi bir madde eklenmeden elde edilmesi nedeniyle, TZF'in yalnızca kanın santrifüj edilerek elde edildiği, bu sayede kanın daha yoğun fibrin yapısı içerdiği ve ayrıca bireylerde herhangi bir immün yanıt oluşturmadığı otolog bir ürün olduğu kanıtlanmıştır. Fibrin içindeki trombositler, α-granülleri aracılığıyla düşük hızda büyüme faktörü salınımı yapar. Bu büyüme faktörlerinin salınımı, kemik yapımının ilk 7 günü boyunca artarak devam eder ve 14. günde maksimum seviyeye ulaşır. Sonrasında ise 28. güne kadar azalarak sürer (Dohan vd., 2006c, 2006d). Ratlar üzerinde yapılan bir çalışmada, TZF'in sürekli büyüme faktörü salınımı sağladığı ve bunun sonucunda ratların osteoblast proliferasyonu ve diferansiyasyonuna etkisinin daha güçlü ve uzun süreli olduğu ortaya konmuştur (He vd., 2009).

TZF'nin, yoğun hücre içeriğine sahip olması ve daha yüksek rejeneratif kapasiteye sahip olması, araştırmacıları TZF üzerine daha fazla çalışma yapmaya teşvik etmiştir. Bu

bağlamda, Carroll ve arkadaşları yaptıkları histolojik bir incelemede, TZF içerisinde hiyalüronik asit ve heparin gibi glikozaminoglikanların (GAG) bulunduğunu tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, GAG'ların peptit yapıdaki sitokinlere yüksek bir bağlanma afinitesine sahip olduğunu ve bu bağlanmanın hücre göçünü teşvik ederek iyileşmeyi desteklediğini ifade etmişlerdir (Carroll vd., 2005). Bu bulguları destekleyen bir başka çalışmada, Dohan ve arkadaşları, TZF içerisindeki GAG'ların fibrin yapısının polimerizasyonunu artırdığını ve bu durumun, TZF'deki sitokin seviyelerinin yükselmesine neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Dohan Ehrenfest vd., 2014). Başka bir histolojik çalışmada ise, doku onarımında kritik rol oynayan GAG'ların salınımını etkileyen FGF ve VEGF'nin, TZF içinde yüksek yoğunlukta bulunduğu belirtilmiştir (Anitua, 1999).

Miron ve arkadaşları, gerçekleştirdikleri in vitro çalışmada, TZF'nin içeriğindeki sitokinler ve büyüme faktörleri aracılığıyla endotel, osteoblast, kondroblast ve fibroblast gibi doku rejenerasyonu ve anjiyogenezde rol oynayan hücreleri uyararak, rejenerasyonu hızlandırdığını öne sürmüşlerdir (Miron vd., 2021). Literatürdeki bir çalışmada, bir TZF türü olan L-TZF'nin anjiyogenez ve yara iyileşmesinde rol oynayabilecek Nötrofiller ve Makrofajlar dahil olmak üzere L-TZF'de bulunan beyaz kan hücrelerinin pro-anjiyogenik moleküller salgıladığı ortaya konulmuştur (Ratajczak vd., 2018). Bu bulguları destekleyen bir diğer in vitro çalışmada, Vahabi ve arkadaşları, TZF'nin kültürlenmiş fibroblastların mitojenik özelliklerini artırarak, hücre büyümesini hızlandırdığını belirtmişlerdir (Vahabi vd., 2015). Buna benzer başka bir in vitro çalışmada, Clipet ve arkadaşları, TZF'nin fibroblast hücrelerinin rejenerasyon ve proliferasyonunu artırdığını, bunun da TZF içeriğindeki TGF-β, PDGF, FGF, IGF gibi büyüme faktörleri aracılığıyla gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir (Clipet vd., 2012). Kemik rejenerasyonu hakkında yapılan bir başka çalışmada da TZF'nin büyüme faktörleri ve sitokinler bakımından oldukça zengin olan matriksinin kemik grefti ile birleştiğinde, osteoprogenitör hücrelerin greftin merkezine migrasyonunu desteklediği ve aynı zamanda anjiyogenezisle ilgili büyüme faktörlerinin bölgeye yoğunlaşmasına yardımcı olduğu gösterilmiştir (Zhou vd., 2018). Başka bir çalışmada, otojen kan kaynaklı trombosit konsantrelerinin içinde bulunan fibrin matrikste depolanan büyüme faktörlerinin, belirli bir süre boyunca sürekli salınım yaparak yara iyileşmesini hızlandırdığı gösterilmiştir (M. Kobayashi vd., 2015). İnvitro bir çalışmada, ışık ve taramalı elektron mikroskobu kullanılarak TZF'nin

osteoblastların farklılaşmasını uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca yapılan kültür analizlerinde, TZF membranında mineralizasyonun 14 gün sonra başladığı belirlenmiştir. Bunun yanı sıra, TZF içerisinde bulunan lökositlerin çoğalıp osteoblastlarla etkileşime girdiği gözlemlenmiştir. Biyolojik özellikleri ve kolayca hazırlanabilirliği göz önüne alındığında, TZF güvenli bir tedavi seçeneği olarak öne çıkmaktadır (Castro vd., 2017; Dohan Ehrenfest, Diss, vd., 2009). Chang ve arkadaşları, insan osteoblastlarıyla yaptıkları çalışmada, TZF'in ekstraselüler bölgede sinyal düzenleyici olarak görev yapan protein kinaz ekspresyonunu düzenleyerek osteoblastların proliferasyonunu teşvik ettiğini göstermiştir. Ayrıca, TZF'in osteoprotegerin (OPG) salınımında artışa yol açarak osteoklastogenezi baskıladığı ve böylece yeni kemik oluşumunu artırıcı bir etki gösterdiği belirtilmiştir (Chang vd., 2010). Literatürdeki bu bilgiler ışığında, TZF'nin iyileşmedeki baskın rolü tespit edilmiştir. Özellikle kemik iyileşmesine olan katkılarından dolayı çalışmamızda TZF kullanımına yer verilmiştir.

Literatürde, çeşitli santrifüj hız ve sürelerinin kullanıldığı pek çok TZF uygulamasına yönelik çalışmaya yer verildiği görülmektedir. Choukroun'un ilk tanımladığı TZF protokolünde, venöz kanın 3000 rpm hızında 10 dakika süreyle santrifüj edilmesi gerektiği belirtilmiştir. Ancak sonraki çalışmalarda, venöz kanın 2700 rpm devirde ve 12 dakika santrifüj edilmesiyle daha yoğun kıvamda TZF elde edildiği rapor edilmiştir (Choukroun vd., 2001; Rodella vd., 2011). Daugela ve ark. L-TZF elde etmek için 2800 rpm hızında 12 dakika süreyle santrifüj uygulamasıyla trombosit konsantresi elde etmişlerdir (Daugela vd., 2018). Gürler ve ark. L-TZF elde ederken 3000 rpm 12 dakika santrifüj yöntemini kullanmışlardır (Gürler vd., 2015). Caruana ve ark. ve Ritto ve ark. L-TZF eldesi için 2700 rpm hızında 12 dakika santrifüj yöntemini uygulamışlardır (Caruana vd., 2019; Ritto vd., 2019). Kumar ve ark. L-TZF elde edebilmek için 3000 rpm 10 dakika süreyle santrifüj yöntemini uygulamışlardır (N. Kumar vd., 2015). Kobayashi ve ark. Y-TZF ile ilgili yaptıkları çalışmada 700 g'de 8 dk boyunca 2200 rpm uygulayarak Y-TZF elde etmişlerdir (E. Kobayashi vd., 2016). Zamanla gelişen TZF üretim protokolleri sayesinde, santrifüj süresi ve uygulanan g-kuvveti üzerinde yapılan değişikliklerle; TZF'nin hücre içeriği, büyüme faktörlerinin salınımı ve fibrin matriks yoğunluğunun en verimli seviyeye ulaşması hedeflenmiştir (Ghanaati vd., 2014). Literatürde ortak santrifüj değerleri ve süreleri bulunmamaktadır. Sunulan tez çalışmamızda firmaların önerdiği santrifüj değerleri kullanılmıştır. L-TZF için 2700 rpm,

12 dk, 700 g; Y-TZF için 2200 rpm, 8 dk, 700 g değerleri kullanılarak trombosit konsantreleri elde edilmiştir.

Birçok TZF türü bulunmasına rağmen, Y-TZF ‘nin literatürdeki çalışmalarının az sayıda olması gerekçesiyle çalışmamız planlanmış ve uygulanmıştır. Yu. ve ark’nın histolojik bir çalışmasında Y-TZF’nin blok kemik uygulamalarında ve sinüs yükseltme işlemlerinde kan damarı oluşumunu hızlandırdığı, kemik remodelasyonunu desteklediği gösterilmiştir (Yu, Tian, vd., 2023). Çalışmalarda Y-TZF’nin histolojik özellikleri incelenmiş olup, içeriğinde bol miktarda lökosit ve biyoaktif protein bulundurduğu, blok kemik uygulamalarında yüksek biyoaktivite gösterdiği belirtilmektedir. Miron ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Y-TZF’nin içeriğinde sabit açılı santifüjleme yöntemlerine göre daha fazla etkili trombosit ve lökosit konsantrasyonuna ulaştığı gösterilmiştir (Miron vd., 2019). Gheno ve ark. yaptıkları bir çalışmada Y-TZF’nin L-TZF’ye göre büyüme faktörleri salınımının daha yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır (Gheno vd., 2021). Feng. ve ark. Y-TZF içeriğinin daha fazla immün sistem hücresine sahip olduğundan, L-TZF’ye göre antibakteriyel özelliklerinin daha baskın olduğunu göstermiştir (Feng vd., 2020). Literatürdeki bu bilgiler ışığında Y-TZF’nin dönüş esnasında yatay açılanması sebebiyle oluşacak olan fibrin içeriğinin L-TZF’ye kıyasla kemik iyileşmesine daha olumlu etki edeceğini düşünmekteyiz. Bu tez çalışmasında son yıllarda kullanımı yaygınlaşan L-TZF ve Y-TZF’nin rat kalvarya defektlerinde kemik iyileşmesi üzerine etkileri karşılaştırılmıştır.

Kemik oluşumunu tetikleyen proteinler, ilk kez 1979 yılında Urist tarafından keşfedilerek iskelet dokusunun biyolojik temellerine dair önemli bir bulgu olarak tanımlanmıştır. Bu proteinlerin, demineralize kemikten daha yüksek kemik morfogenetik aktiviteye sahip olduğu gözlemlenmiş ve bu nedenle Kemik Morfogenetik Protein ya da Osteojenik Protein (OP) olarak adlandırılmıştır (Cook vd., 1998). Embriyonik gelişim ve doğum sonrası dönem boyunca kemik ve çeşitli diğer dokularda bulundukları tespit edilmiştir (Wozney, 2002).

Osteoindüksiyon, diferansiye olmamış pluripotent kök hücrelerin kemik oluşturan hücrelere dönüşümünü teşvik eden bir süreçtir. Kemik morfojenik proteinlerin uyarıcı etkisiyle, mezenkimal hücrelerin osteoprogenitör hücrelere dönüşmesi süreci osteoindüksiyon olarak tanımlanır. En çok bilinen örneği TGF-β üst ailesine ait glikoprotein olan kemik morfogenetik proteinlerlerdir (Albrektsson & Johansson, 2001).

BMP'lerin yapılan bir çalışmada, osteoblast farklılaşmasında etkili olduğu kanıtlanmıştır. Yapılan bir araştırmada, BMP'lerin pluripotent kök hücrelerinin osteoblastlara dönüşümünde önemli bir rol oynadığı ve bu süreçle birlikte diferansiye olmamış mezenkimal hücrelerin osteojenik hücrelere dönüşerek yeni oluşan kemiğin ekstraselüler matriksinin sentezi ve kalsifikasyonunda görev aldığı belirtilmiştir (Tuskan & Yaltırık, 2002). Ayrıca, BMP'lerin matür osteoblastlar ile kemik iliği kaynaklı osteoprogenitör hücreler üzerinde kemotaktik etkiler oluşturduğu bilinmektedir. Kemik dokusunda meydana gelen travmanın, mezenkimal hücre popülasyonlarını etkileyerek bu hücrelerin hasar bölgesine yönlendirilmesini sağlayan biyolojik süreçleri harekete geçirdiği düşünülmektedir. Literatürde, travma sonrası bozulan kemik dokusu veya rezorbe olan matriksten ortama salınan BMP'lerin, mezenkimal hücre göçünde önemli bir düzenleyici rol üstlendikleri ifade edilmektedir (L. J. Yang & Jin, 1990). Rasubala ve ekibi, yürüttükleri çalışmada BMP-2'nin kemik kırıklarının iyileşme süreci üzerindeki potansiyel etkilerini araştırmıştır. Çalışmada 30 ratın mandibulalarında tek taraflı kırık modeli oluşturulmuş ve hayvanlar 3., 7., 14. ve 21. günlerde sakrifiye edilerek BMP-2'nin etkileri immünohistokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiştir. Yapılan analizlerde, BMP-2'nin iyileşmenin tüm evrelerinde aktif olarak salındığı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, BMP-2'nin mezenkimal hücrelerin osteoblast ve kondroblast hatlarına farklılaşmasında rol oynadığını ve kırık iyileşme süreci üzerinde belirgin bir düzenleyici etkiye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Rasubala vd., 2003). Literatürde, membranöz kemik iyileşmesinin erken döneminde BMP-2'nin yüksek oranda gözlendiği, özellikle osteotomi hattı çevresindeki periosteal hücrelerde, osteotomi sonucu oluşan defekte yerleşmiş mezenkimal hücrelerde ve iyileşme ilerledikçe yeni oluşan kemik adacıklarında bulunan aktif osteoblastlarda BMP-2 ekspresyonunun saptandığı bildirilmektedir (Song vd., 2011; Sun vd., 2011). Sonuç olarak çok sayıda bulgu BMP-2'nin kırık iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunu uyardığını açıklamıştır (Betz, 2002; Reddi, 1992). İncelenen literatür önderliğinde sunulan çalışmada, kemik iyileşme belirteçlerinden biri BMP-2 olarak seçilmiştir.

Kemik iyileşme belirteçlerinden biri olan osteonektin, kemik mineralizasyonunda, hücre-matris etkileşimlerinde ve kolajen bağlanmasında hayati bir rol oynayan asidik bir ekstraselüler matris glikoproteinidir (Guweidhi vd., 2005). Laçin ve arkadaşlarının ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, defekt bölgelerinde kemik

iyileşmesini histolojik ve immünohistokimyasal analizlerle değerlendirmiş ve yeni oluşan kemik trabeküllerinde osteonektin varlığını tespit etmişlerdir (Laçin vd., 2019). Touri ve arkadaşları ek oksijen desteği sağlayarak kemik iyileşmesini inceledikleri bir çalışmada, osteojenik belirteçlerden osteonektin ve osteokalsinin eksprese olmasına göre kemik kalsifikasyonunu değerlendirmiştir (Touri vd., 2020). He ve arkadaşları tavşanlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada, osteonektin ve osteokalsinin ekspresyonunu değerlendirerek, elektrik yükünün kırık iyileşmesine etkisini incelemişlerdir (He vd., 2022). Ozon ve propolisin ratlardaki kemik iyileşmesini değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, immünohistokimyasal boyamada osteonektinin ekspresyonuna bakmışlardır (Durmuş & Gunes, 2024). Bir başka çalışmada Tanık ve arkadaşları ratlarda defekt oluşturarak farklı materyallerin kemik iyileşmesini osteonektin ve osteopontin ekspresyonuna bakarak yorumlamışlardır (Tanık vd., 2018). İncelenen literatür ışığında sunulan çalışmada, kemik iyileşmesini değerlendirmek için immünohistokimyasal boyamada osteonektin belirtecine yer verilmiştir.

ALP, kemik iyileşmesi sürecinde kritik bir rol oynar. Bu enzim, özellikle osteoblastlar tarafından üretilir ve kemik mineralizasyonu için gereklidir (Orimo, 2010). ALP'nin yüksek ekspresyonu, osteoblastların olgunlaşma ve mineralize olmuş kemik oluşturma yeteneklerini artırır. Ayrıca, ALP'nin ekspresyonu, osteoblastların kemik matrisini üretme yeteneğiyle doğrudan ilişkilidir. Kemik iyileşmesi sırasında ALP'nin seviyesi genellikle artar, bu da osteoblastların farklılaşma sürecinin bir göstergesidir (McComb vd., 2013). Stucki ve ark. yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu ile ilgili yaptıkları bir çalışmada, kemik iyileşmesi ve neogenezdeki olayları alkalen fosfatazın ekspresyonuna bakarak histokimyasal incelemede bulunmuşlardır (Stucki vd., 2001). Wojdasiewicz ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bir bitkiye ait bileşik olan salidrosid adlı maddenin kemik iyileşmesine etkisini araştırmışlar ve incelenen kemik örneklerinde ALP'nin ekspresyonunu değerlendirmişlerdir (Wojdasiewicz vd., 2024). İncelenen literatür ışığında alkalen fosfatazın kemik iyileşmesinin her aşamasında, özellikle osteoblastların aktivitesini arttırma ve kemik mineralizasyonunu sağlamada kritik öneme sahip olduğu görülmüştür. Sunulan çalışmada kemik iyileşmesini değerlendirmek amacıyla ALP'nin ekspresyonuna da bakılmıştır.

Kosmidis ve ark. yaptıkları bir çalışmada L-TZF, A-TZF ve i-TZF'nin osteogenez potansiyellerini alkalen fosfataz, osteokalsin ve osteonektin ekspresyonlarına bakarak

değerlendirmişlerdir. Üç TZF türünün de osteoblast benzeri hücrelerin osteojenik potansiyelini artırma kapasitesine sahip olduğunu bulmuşlardır (Kosmidis vd., 2023). Smania Neto ve ark. yaptıkları çalışmada osteoblastın farklılaşmasını engelleyen Semaforin 4D faktörünün etkisini ortadan kaldırabilmek için L-TZF'yi kullanarak enzim bağlantılı immünosorbent testi (ELISA) uygulamışlardır. L-TZF kullanılmayan grupta Semaforin 4D'ye maruz kalan osteoblastların osteonektin, osteokalsin ve alkalen fosfataz ekspresyonlarında azalma olduğunu göstermişlerdir (Smanio Neto vd., 2023). Kyyak ve ark. yaptıkları çalışmada İ-TZF içeren sığır kemiği materyalinin insan osteoblastlarının metabolik aktivitesini arttıracağını düşünerek ONC, ALP ve BMP-2 ekspresyonlarını değerlendirmiştir. ALP ve BMP-2 ekspresyonun kemik rejenerasyonun erken safhasında, ONC ekspresyonun geç safhasında arttığını ortaya koymuşlardır (Kyyak vd., 2021). Yu ve ark. tavşanların sinüs augmentasyonuyla ilgili yaptıkları çalışmada Y-TZF'nin kemik grefti ile kombinasyonunda hücre infiltrasyonunu arttırarak osteoblast göçünü hızlandırdığını, böylece kemik metabolizmasını olumlu yönde etkilediğini ifade etmişlerdir (Yu, Bd, vd., 2023). Literatürde sunulan çalışmamıza benzer şekilde Ferreira ve ark. ratlardaki kafatası defektlerine uyguladıkları A-TZF, L-TZF ve Y-TZF'nin mikrotomografik ve histomorfometrik analiz sonuçlarında, üç TZF türlerinin de kemik neoformasyonunu güçlendirdiği ve Y-TZF'nin kemik iyileşmesi için biyolojik potansiyele sahip olduğunu öne sürmüşlerdir (Ferreira Sávio vd., 2023). Apaza Alccayhuaman ve ark. rat kafatası defekt modeli çalışmasında TZF'nin kemik rejenerasyonu üzerindeki etkisini araştırmışlardır. Kemiğin histolojik ve mikro bilgisayarlı tomografik incelemelerinde yeni oluşan kemiği ve mineralize kollajen matris alanlarını gözlemlemişlerdir (Apaza Alccayhuaman vd., 2024). Siying Li ve ark. tavşanların diş çekim soketlerine TZF yerleştirerek yaptıkları çalışmada kemik rezorpsiyonunun TZF grubunda daha az olduğu sonucuna varmıştır. Osteojenik belirteçlerin ekspresyonu polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile tespit edilip BMP-2 ve ALP ekspresyonlarının TZF grubunda daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir (S vd., 2022). Sunulan çalışmanın sonuçlarına bakıldığında ONC ekspresyonun L-TZF'de, Y-TZF'ye kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede üstün görüldüğü, BMP ve ALP ekspresyonunda L-TZF ile Y-TZF arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark elde edilemediği ortaya konmuştur. TZF gruplarındaki (G3 ve G4) osteojenik belirteçlerin G2 grubundaki değerlere oranla ekspresyon seviyeleri anlamlı ölçüde daha yüksek olarak

değerlendirilmiştir. Bunun sebebinin TZF içerisindeki dönüştürücü büyüme faktörlerinin osteoblastların çoğalması ve farklılaşmasına etkisinden dolayı olduğu düşünmekteyiz. Hematoksilen-eozin boyamanın kalitatif incelemesinde G3 grubunun G4'e kıyasla daha fazla kemik rejenerasyon alanı görülmesinin, Y-TZF'deki büyüme faktörlerinin daha yavaş ve daha uzun süreli salınım yapmasının bir sonucu olarak düşünülmektedir.

Çalışma bulguları, literatürdeki benzer araştırmalarla örtüşen bir nitelik taşımakta ve L-TZF ve Y-TZF uygulamasının osteojenik belirteçler üzerinde olumlu etkiler yarattığını ortaya koymaktadır. Özellikle, L-TZF ve Y-TZF uygulanan deney gruplarında kemik rejenerasyonu ile ilişkili olan ALP, BMP ve ONC ekspresyonunun bir artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, L-TZF ve Y-TZF uygulamasının osteoblastik aktiviteyi teşvik ederek kemik rejenerasyonunu desteklediğini göstermektedir. TZF'nin kemik doku yenilenmesi üzerindeki olumlu hücresel etkileri, mevcut çalışmada da belirgin bir şekilde gözlemlenmiş olup, özellikle kemik kaybını önleyici ve kemik rejenerasyonunu destekleyici rolü ile literatürde daha önce bildirilen bulgularla uyumlu olduğu görülmüştür.

Yapılan bu çalışma L-TZF ve Y-TZF'nin ratların kafatasında oluşturulan kritik defektlerinde kullanıldığı ve birbirleriyle kıyaslandığı bir çalışmadır. Çalışmamızda bu iki TZF ürününü kullanma amacımız yatay santrifüj yönteminin yeni keşfedilmiş olması ve hakkında çok az çalışma yapılmış olmasına rağmen, histolojik özelliklerinin geleneksel açılı santifüj ürünlerinden daha iyi olduğunun kanıtlanmış olmasıdır. Özellikle yatay açılanmayla elde edilen Y-TZF içeriğinin kemik iyileşmesine etkisinin diğer TZF türlerinden daha etkili olabileceğini düşünülmüştür. Elde ettiğimiz sonuçlarda Y-TZF ile L-TZF'nin kemik iyileşmesindeki rolünde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ortaya koyduk. Bunun sebebinin kullanılan cihazların özellikleriyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak hem L-TZF hem de Y-TZF gruplarında kemik rejenerasyonunda anlamlı derecede bir fark gözlemledik. Bunun ardındaki neden TZF içeriğinin hücre göçünü hızlandırması ve içeriğindeki materyallerin kemik oluşumunu teşvik ederek osteoblast farklılaşmasını pozitif yönde etkilemesi sonucu olabilir.

Bu çalışmanın çeşitli limitasyonları bulunmaktadır. Bunların içerisinde en önemlisi örneklem büyüklüğünün az olmasıdır. Yapılan güç analizi denek sayısının yeterli olduğunu gösterse de daha fazla sayıda denek kullanılarak yapılan çalışma sonuçlarının gerçeğe daha yakın değerler vereceğini düşünmekteyiz. Kas ve yumuşak

doku dahil edilmeden sadece kemik dokunun incelenmesi ve hayvan çalışması olması sebebiyle ağrı parametresinin değerlendirilmesinin mümkün olmayışı bu çalışmanın diğer limitasyonlarıdır. Literatür incelendiğinde belirtilen limitasyonlara rağmen bu iki trombosit ürününün denek hayvanları üzerinde beraber kullanıldığı az sayıda çalışma vardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada Y-TZF ve L-TZF uygulamalarının kemik dokusu üzerindeki iyileştirici etkileri değerlendirildi ve bulgular doğrultusunda şu sonuçlara varıldı:

- Literatürde Y-TZF'nin kemik metabolizmasına etkilerinin incelenmesine yönelik deneysel çalışmaların sayısı sınırlıdır. Çalışmamızda ratların kafatasında oluşturulan kritik boyutlu kemik defektlerinde en başarısız iyileşmenin G2 grubunda olduğu görülmüş, bu gruptan elde edilen kesitlerde hem hematoksilen-eozin hem de immünohistokimyasal boyamada TZF gruplarına göre kemik iyileşmesinin anlamlı derecede daha düşük olduğu tespit edilmiştir.
- Çalışmamızın immünohistokimyasal incelemesinde ONC, ALP ve BMP'nin ekspre olup olmamasına göre değerlendirme yapılmıştır. Tüm osteojenik belirteçlerde kemik rejenerasyonu anlamlı derece G2 grubunda en düşüktür. ONC ekspresyonu G3 grubunda G4'e göre daha belirgin olup anlamlı bir fark gözlemlenmiştir. ALP ve BMP ekspresyon sonucunda kemik rejenerasyonu açısından G3 ile G4 grupları karşılaştırıldığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. Bu araştırmada, rat modelinde oluşturulan kritik boyuttaki kemik defektlerine uygulanan L-TZF ve Y-TZF'nin kemik iyileşmesine katkıda bulunduğu, kemik rejenerasyonunda görevli osteojenik belirteçlerle hem histopatolojik analiz hem immünohistokimyasal analiz sonuçlarında gösterilmiştir.
- Bu çalışmadan elde edilen bilgiye dayanarak; kalvaryal kemik defektlerinin iyileşmesinde Y-TZF ve L-TZF kullanımının kemik iyileşmesi üzerinde pozitif bir etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir. Yeni nesil trombosit konsantrasyonu olan Y-TZF'nin, hücre proliferasyonu ve kolonizasyonu açısından L-TZF'ye göre üstün olduğu düşünülmekte; ancak bu konuda daha net sonuçlara ulaşılabilmesi için Y-TZF'nin etkinliğini değerlendiren kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Hem Y-TZF kullanımının yara iyileşmesi üzerindeki etki mekanizmasının tam olarak anlaşılabilmesi hem bu çalışmadan elde edilen bilgilerin doğrulanması hem de klinik uygulamada hekimlere rehber olabilmesi için kapsamlı deneysel ve klinik çalışmaların yapılmasına ihtiyaç olduğu kanaatindeyiz.
- Bu çalışmada elde edilen verilerin yalnızca mevcut literatüre katkı sunmakla kalmayıp, aynı zamanda yeni tedavi yaklaşımlarına yönelik yapılacak araştırmalar için

bir temel oluşturacağı düşünülmektedir. İlerleyen çalışmalarda kemik iyileşmesini değerlendirmek için osteokalsin ve osteoprotegrin gibi farklı antikorlara yer verilmesi, ayrıca biyokimyasal incelemede özellikle VEGF'nin incelenmesi önerilir. Bu alanda gerçekleştirilecek araştırmaların, histomorfometrik analizlerin yanı sıra bilgisayarlı tomografiyle desteklenmesi, kan kaynaklı materyallerdeki gelişmelerin izlenmesi ve bu materyallerin kullanım alanlarının detaylı bir şekilde incelenmesi ile örnek sayısının artırılarak istatistiksel analizlerin yapılması, literatüre önemli katkılar sağlayabilir.

7. KAYNAKÇA

Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Reviews. Immunology*, *3*(9), 745-756. https://doi.org/10.1038/nri1184

Albrektsson, T., & Johansson, C. (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *European Spine Journal: Official Publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*, *10 Suppl 2*(Suppl 2), S96-101. https://doi.org/10.1007/s005860100282

An, Y. H., & Friedman, R. J. (2020). Animal models of bone defect repair. In Animal models in orthopaedic research. *CRC Press*, 241-260.

Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *14*(4), 529-535.

Anitua, E., Muruzabal, F., Tayebba, A., Riestra, A., Perez, V. L., Merayo-Lloves, J., & Orive, G. (2015). Autologous serum and plasma rich in growth factors in ophthalmology: Preclinical and clinical studies. *Acta Ophthalmologica*, *93*(8), e605-614. https://doi.org/10.1111/aos.12710

Anitua, E., Prado, R., Sanchez, M., & Orive, G. (2012). Platelet-rich plasma: Preparation and formulation. *Operative techniques in orthopaedics*.

Anitua, E., Sánchez, M., Orive, G., & Andía, I. (2007). The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*, *28*(31), 4551-4560. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.06.037

Apaza Alccayhuaman, K. A., Heimel, P., Tangl, S., Lettner, S., Kampleitner, C., Panahipour, L., Kuchler, U., & Gruber, R. (2024). Human versus Rat PRF on Collagen Membranes: A Pilot Study of Mineralization in Rat Calvaria Defect Model. *Bioengineering (Basel, Switzerland)*, *11*(5), 414. https://doi.org/10.3390/bioengineering11050414

Arnoczky, S. P., Delos, D., & Rodeo, S. A. (2011). What is platelet-rich plasma? *Operative techniques in sports Medicine*.

Aroca, S., Keglevich, T., Barbieri, B., Gera, I., & Etienne, D. (2009). Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: A 6-month study. *Journal of Periodontology*, *80*(2), 244-252. https://doi.org/10.1902/jop.2009.080253

Arora, S., & Agnihotri, N. (2017). Platelet Derived Biomaterials for Therapeutic Use: Review of Technical Aspects. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion: An Official Journal of Indian Society of Hematology and Blood Transfusion*, *33*(2), 159-167. https://doi.org/10.1007/s12288-016-0669-8

Aybar Odstrcil, A., Territoriale, E., & Missana, L. (2005). An experimental model in calvaria to evaluate bone therapies. *Acta Odontologica Latinoamericana: AOL*, *18*(2), 63-67.

Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, *2*(4), 169-183. https://doi.org/10.1002/term.83

Balcı, H., & Toker, H. (2012). Trombositten zengin fibrin: Özellikleri ve diş hekimliğinde kullanımı. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*.

Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H., & Tomic-Canic, M. (2008). Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration: Official Publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, *16*(5), 585-601. https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x

Bayar, G. R. (2004). *G. R. Ooforektomi uygulanmış tavşanlarda periosteal distraksiyon ile elde edilen yeni kemik dokularının değerlendirilmesi.*

Becker, K. L. (2001). *Principles and practice of endocrinology and metabolism*. JB Lippincott Co, Philadelphia.

Betz, R. R. (2002). Limitations of autograft and allograft: New synthetic solutions. *Orthopedics*, *25*(5 Suppl), s561-570. https://doi.org/10.3928/0147-7447-20020502-04

Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., & Martin, J. (2008). *Principles of Bone Biology, Two-Volume Set, Third Edition*. Academic Press.

Blair, P., & Flaumenhaft, R. (2009). Platelet alpha-granules: Basic biology and clinical correlates. *Blood Reviews*, *23*(4), 177-189. https://doi.org/10.1016/j.blre.2009.04.001

Bodde, E. W. H., Spauwen, P. H. M., Mikos, A. G., & Jansen, J. A. (2008). Closing capacity of segmental radius defects in rabbits. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *85*(1), 206-217. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31549

Borovecki, F., Pecina-slaus, N., & Vukicevic, S. (2007). *Biological mechanisms of bone and cartilage remodelling—Genomic perspective. International orthopaedics*.

Caplan, A. I. (1987). *The celler and moleculer embryology of bone formation*.

Carroll, R. J., Arnoczky, S. P., Graham, S., & O'Connel, S. M. (2005). Characterization of autologous growth factors in Cascade platelet rich fibrin matrix (PRFM). *Edison, NJ: Musculoskeletal Transplant Foundation.*

Caruana, A., Savina, D., Macedo, J. P., & Soares, S. C. (2019). From Platelet-Rich Plasma to Advanced Platelet-Rich Fibrin: Biological Achievements and Clinical Advances in Modern Surgery. *European Journal of Dentistry*, *13*(2), 280-286. https://doi.org/10.1055/s-0039-1696585

Castro, A. B., Meschi, N., Temmerman, A., Pinto, N., Lambrechts, P., Teughels, W., & Quirynen, M. (2017). Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part B: Sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, *44*(2), 225-234. https://doi.org/10.1111/jcpe.12658

Chang, I.-C., Tsai, C.-H., & Chang, Y.-C. (2010). Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *95*(1), 327-332. https://doi.org/10.1002/jbm.a.32839

Chen, M.-C., Chiu, H.-C., Kuo, P.-J., Chiang, C.-Y., Fu, M. M., & Fu, E. (2021). Bone formation with functionalized 3D printed poly-ε-caprolactone scaffold with plasma-rich-fibrin implanted in critical-sized calvaria defect of rat. *Journal of Dental Sciences*, *16*(4), 1214-1221. https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.01.015

Choi, B.-H., Zhu, S.-J., Kim, B.-Y., Huh, J.-Y., Lee, S.-H., & Jung, J.-H. (2005). Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: An in vitro study. *International Journal of Oral and*

Maxillofacial Surgery, *34*(4), 420-424. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2004.10.018

Choukroun, J., Adda, F., Schoeffler, C., & Vervell, A. P. R. F. (2001). Une opportunité en paro-implantologie: Le PRF. *Implantodontie*.

Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.-O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Dohan, D. M. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics, 101*(3), e56-60. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.011

Choukroun, J., Diss, A., Simonpieri, A., Girard, M.-O., Schoeffler, C., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Dohan, D. M. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *101*(3), 299-303. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.012

Cibicková, L., Palicka, V., Cibicek, N., Cermáková, E., Micuda, S., Bartosová, L., & Jun, D. (2007). Differential effects of statins and alendronate on cholinesterases in serum and brain of rats. *Physiological Research*, *56*(6), 765-770. https://doi.org/10.33549/physiolres.931121

Clark, R. A. (2001). Fibrin and wound healing. *Annals of the New York Academy of Sciences, 936*, 355-367. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03522.x

Clipet, F., Tricot, S., Alno, N., Massot, M., Solhi, H., Cathelineau, G., Perez, F., De Mello, G., & Pellen-Mussi, P. (2012). In vitro effects of Choukroun's platelet-rich fibrin conditioned medium on 3 different cell lines implicated in dental

implantology. *Implant Dentistry*, *21*(1), 51-56. https://doi.org/10.1097/ID.0b013e31822b9cb4

Comproresi, E. M. (1999). *Hyperbaric Oxygen Therapy: A Committee Report*. Undersea and Hyperbaric Medical Society, North Palm Beach.

Cook, S. D., Salkeld, S. L., Brinker, M. R., Wolfe, M. W., & Rueger, D. C. (1998). Use of an osteoinductive biomaterial (rhOP-1) in healing large segmental bone defects. *Journal of Orthopaedic Trauma*, *12*(6), 407-412. https://doi.org/10.1097/00005131-199808000-00007

Cowin, S. C. (2001). *Bone mechanics handbook*.

Cronkite, E. P., Lozner, E. L., & Deaver, J. M. (1944). Use of thrombin and fibrinogen in skin grafting: Preliminary report. Journal of the American Medical Association. *Journal of the American Medical Association*.

Daugela, P., Grimuta, V., Sakavicius, D., Jonaitis, J., & Juodzbalys, G. (2018). Influence of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) on the outcomes of impacted mandibular third molar removal surgery: A split-mouth randomized clinical trial. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, *49*(5), 377-388. https://doi.org/10.3290/j.qi.a40113

Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006a). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *101*(3), e37-44. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.008

Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006b). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet

concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *101*(3), e45-50. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009

Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006c). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *101*(3), e45-50. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.009

Dohan, D. M., Choukroun, J., Diss, A., Dohan, S. L., Dohan, A. J. J., Mouhyi, J., & Gogly, B. (2006d). Platelet-rich fibrin (PRF): A second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *101*(3), e51-55. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2005.07.010

Dohan Ehrenfest, D. M. (2010). How to optimize the preparation of leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun's technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *110*(3), 275-278; author reply 278-280. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.05.048

Dohan Ehrenfest, D. M., Andia, I., Zumstein, M. A., Zhang, C.-Q., Pinto, N. R., & Bielecki, T. (2014). 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 and Tendons Journal*, *4*(1), 3-9.

Dohan Ehrenfest, D. M., Bielecki, T., Mishra, A., Borzini, P., Inchingolo, F., Sammartino, G., Rasmusson, L., & Everts, P. A. (2012). 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. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, *13*(7), 1131-1137. https://doi.org/10.2174/138920112800624328

Dohan Ehrenfest, D. M., Del Corso, M., Diss, A., Mouhyi, J., & Charrier, J.-B. (2010). Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of Periodontology*, *81*(4), 546-555. https://doi.org/10.1902/jop.2009.090531

Dohan Ehrenfest, D. M., Diss, A., Odin, G., Doglioli, P., Hippolyte, M.-P., & Charrier, J.-B. (2009). In vitro effects of Choukroun's PRF (platelet-rich fibrin) on human gingival fibroblasts, dermal prekeratinocytes, preadipocytes, and maxillofacial osteoblasts in primary cultures. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *108*(3), 341-352. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.04.020

Dohan Ehrenfest, D. M., Pinto, N. R., Pereda, A., Jiménez, P., Corso, M. D., Kang, B.-S., Nally, M., Lanata, N., Wang, H.-L., & Quirynen, M. (2018). The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*, *29*(2), 171-184. https://doi.org/10.1080/09537104.2017.1293812

Dohan Ehrenfest, D. M., Rasmusson, L., & Albrektsson, T. (2009). Classification of platelet concentrates: From pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and

platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, *27*(3), 158-167. https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.11.009

Durmuş, H. İ., & Gunes, N. (2024). Investigation of the Effects of Ozon and Propolis on the Healing of Bone Defects: An Experimental Study. *The Journal of Craniofacial Surgery*. https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000010722

Eriksen, E. F., Axelrod, D. W., & Melsen, F. (1994). *Bone histomorphometry.*

Everts, P. a. M., Hoffmann, J., Weibrich, G., Mahoney, C. B., Schönberger, J. P. a. M., van Zundert, A., & Knape, J. T. A. (2006). Differences in platelet growth factor release and leucocyte kinetics during autologous platelet gel formation. *Transfusion Medicine (Oxford, England)*, *16*(5), 363-368. https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00708.x

Fawcett, D. W., & Bloom, W. (1975). *A Textbook of Histology 10th Edition.*

Feldman, D., Malloy, P. J., & Gross, C. (1996). *Vitamin D: Metabolism and action. En: Osteoporosis.*

Feng, M., Wang, Y., Zhang, P., Zhao, Q., Yu, S., Shen, K., Miron, R. J., & Zhang, Y. (2020). Antibacterial effects of platelet-rich fibrin produced by horizontal centrifugation. *International Journal of Oral Science*, *12*(1), 32. https://doi.org/10.1038/s41368-020-00099-w

Ferrari, M., Zia, S., Valbonesi, M., Henriquet, F., Venere, G., Spagnolo, S., Grasso, M. A., & Panzani, I. (1987). A new technique for hemodilution, preparation of autologous platelet-rich plasma and intraoperative blood salvage in cardiac surgery. *The International Journal of Artificial Organs*, *10*(1), 47-50.

Ferreira Sávio, D. de S., Silva, L. M. P. da, Reis, G. G. D., Denardi, R. J., Costa, N. M. M. da, Chaves Furlaneto, F. A., Souza, S. L. S. de, Mourão, C. F. de A. B., Miron,

R. J., Okamoto, R., & Messora, M. R. (2023). Effects of platelet-rich fibrin produced by three centrifugation protocols on bone neoformation in defects created in rat calvaria. *Platelets*, *34*(1), 2228417. https://doi.org/10.1080/09537104.2023.2228417

Foster, T. E., Puskas, B. L., Mandelbaum, B. R., Gerhardt, M. B., & Rodeo, S. A. (2009). Platelet-rich plasma: From basic science to clinical applications. *The American Journal of Sports Medicine*, *37*(11), 2259-2272. https://doi.org/10.1177/0363546509349921

Frame, J. W. (1980). A convenient animal model for testing bone substitute materials. *Journal of Oral Surgery (American Dental Association: 1965)*, *38*(3), 176-180.

Fujioka-Kobayashi, M., Kono, M., Katagiri, H., Schaller, B., Zhang, Y., Sculean, A., & Miron, R. J. (2021). Histological comparison of Platelet rich fibrin clots prepared by fixed-angle versus horizontal centrifugation. *Platelets*, *32*(3), 413-419. https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1754382

Fujioka-Kobayashi, M., Miron, R. J., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y., & Choukroun, J. (2017). Optimized Platelet-Rich Fibrin With the Low-Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility, and Cellular Response. *Journal of Periodontology*, *88*(1), 112-121. https://doi.org/10.1902/jop.2016.160443

Ganong, W. F. (2016). *Review of Medical Physiology* (25 th ed.). McGraw-Hill Education.

Garg Arun K. (2004). *Bone Biology, Harvesting, Grafting For Dental Implants*.

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2000). *Color atlas of histology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2007). *Cartilage and bone. Color textbook of histology*.

Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2011). *Concise Histology*.

Gaur, U., & Aggarwal, B. B. (2003). Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily. *Biochemical Pharmacology*, *66*(8), 1403-1408. https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00490-8

Ghanaati, S., Booms, P., Orlowska, A., Kubesch, A., Lorenz, J., Rutkowski, J., Landes, C., Sader, R., Kirkpatrick, C., & Choukroun, J. (2014). Advanced platelet-rich fibrin: A new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *The Journal of Oral Implantology*, *40*(6), 679-689. https://doi.org/10.1563/aaid-joi-D-14-00138

Gheno, E., Mourão ,Carlos Fernando de Almeida Barros, Mello-Machado ,Rafael Coutinho de, Stellet Lourenço ,Emanuele, Miron ,Richard J, Catarino ,Karoline Ferreira Farias, Alves ,Adriana Terezinha, Alves ,Gutemberg Gomes, & and Calasans-Maia, M. D. (2021). In vivo evaluation of the biocompatibility and biodegradation of a new denatured plasma membrane combined with liquid PRF (Alb-PRF). *Platelets*, *32*(4), 542-554. https://doi.org/10.1080/09537104.2020.1775188

Gibble, J. W., & Ness, P. M. (1990). Fibrin glue: The perfect operative sealant? *Transfusion*, *30*(8), 741-747. https://doi.org/10.1046/j.1537-2995.1990.30891020337.x

Gokturk, E. (1997). *The effect of free oxygen radicals on fracture healing in rats*. Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica.

Gonshor, A. (2002). Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: Background and process. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, *22*(6), 547-557.

Graziani, F., Ivanovski, S., Cei, S., Ducci, F., Tonetti, M., & Gabriele, M. (2006). The in vitro effect of different PRP concentrations on osteoblasts and fibroblasts. *Clinical Oral Implants Research*, *17*(2), 212-219. https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2005.01203.x

Greenwald, J. A., Mehrara, B. J., Spector, J. A., Chin, G. S., Steinbrech, D. S., Saadeh, P. B., Luchs, J. S., Paccione, M. F., Gittes, G. K., & Longaker, M. T. (2000). Biomolecular mechanisms of calvarial bone induction: Immature versus mature dura mater. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *105*(4), 1382-1392. https://doi.org/10.1097/00006534-200004040-00018

Griffith, O. M. (2010). Practical techniques for centrifugal separations. *Thermo Fisher Scientific.*

Gupta, M. C., & Maitra, S. (2002). *Bone grafts and bone morphogenetic proteins in spine fusion.* Springer.

Guweidhi, A., Kleeff, J., Adwan, H., Giese, N. A., Wente, M. N., Giese, T., Büchler, M. W., Berger, M. R., & Friess, H. (2005). Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Annals of Surgery*, *242*(2), 224-234. https://doi.org/10.1097/01.sla.0000171866.45848.68

Guyton, A. C., & Hall, J. E. (2020). *Textbook of Medical Physiology (14th ed.)* (14th ed.). Elsevier.

Gürgan, T. (2005). *Jinekolojik yönden Osteoporoza Yaklaşım*. Güneş Kitabevi Ankara.

Gürler, G., Delilbaşı, Ç., Kaçar, İ., & Öğüt, E. (2015). Evaluation of leukocyte-platelet rich fibrin (L-PRF) on postoperative complications following mandibular impacted third molar surgery. *Yeditepe Clinical Journal*, *11*, 6.

Haghighi, P. (1989). Structure, function and adaptation of compact bone: Martin, R.B., Burr, D.B. (eds): Raven Press, New York 1989, 275 pp, US$ 89.00. *Skeletal Radiology*, *18*(7), 506-506. https://doi.org/10.1007/BF00351748

Hall, J. E. (2021). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology (15th ed.)* (15 th ed.). Elsevier.

Harrison, P., & Cramer, E. M. (1993). Platelet alpha-granules. *Blood Reviews*, *7*(1), 52-62. https://doi.org/10.1016/0268-960x(93)90024-x

Hayashi, Y., Kobayashi, M., Kuwata, H., Atsumi, G., Deguchi, K., Feng Wei, X., Kudo, I., & Hasegawa, K. (2000). Interferon-gamma and interleukin 4 inhibit interleukin 1beta-induced delayed prostaglandin E(2)generation through suppression of cyclooxygenase-2 expression in human fibroblasts. *Cytokine*, *12*(6), 603-612. https://doi.org/10.1006/cyto.1999.0622

He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y., & Wu, H. (2009). A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *108*(5), 707-713. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.06.044

He, L., Yao, Y., Wang, N., & Nan, G. (2022). Effects of electric charge on fracture healing. *Scientific Reports*, *12*(1), 15839. https://doi.org/10.1038/s41598-022-20153-3

Histing, T., Garcia, P., Holstein, J. H., Klein, M., Matthys, R., Nuetzi, R., Steck, R., Laschke, M. W., Wehner, T., Bindl, R., Recknagel, S., Stuermer, E. K., Vollmar, B., Wildemann, B., Lienau, J., Willie, B., Peters, A., Ignatius, A., Pohlemann, T., … Menger, M. D. (2011). Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. *Bone*, *49*(4), 591-599. https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.007

Hudieb, M., Haddad, A., Bakeer, M., Alkhazaaleh, A., AlKhader, M., Taani, D., & Kasugai, S. (2021). Influence of Age on Calvarial Critical Size Defect Dimensions: A Radiographic and Histological Study. *The Journal of Craniofacial Surgery*, *32*(8), 2896-2900. https://doi.org/10.1097/SCS.0000000000007690

Hüsmani, T. (2007). *Siklosporin-A uygulanan sıçanlarda, antioksidanların (selenium ve vitamin E), çekim yarası iyilesmesi izerine etkilerinin histopatolojik ve biyokimyasal olarak incelenmesi*. İstanbul Üniversitesi Saglık Bilimleri Enstitüsü.

H-w, D., & Y-z, L. (2005). *Current Topics in Bone Biology*. World Scientific.

Jackson, M. R. (2001). Fibrin sealants in surgical practice: An overview. *American Journal of Surgery*, *182*(2 Suppl), 1S-7S. https://doi.org/10.1016/s0002-9610(01)00770-x

Jo, C. H., Roh, Y. H., Kim, J. E., Shin, S., & Yoon, K. S. (2013). Optimizing platelet-rich plasma gel formation by varying time and gravitational forces during centrifugation. *The Journal of Oral Implantology*, *39*(5), 525-532. https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-10-00155

Kabaca, G. (2007). *Diabetik sıçanlarda selenyumun kemik iyileşmesi üzerine etkileri*. IÜ Saülık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş-Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı. İstanbul.

Kamimura, D., Ishihara, K., & Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: The signal orchestration model. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, *149*, 1-38. https://doi.org/10.1007/s10254-003-0012-2

Kazura, J. W., Wenger, J. D., Salata, R. A., Budzynski, A. Z., & Goldsmith, G. H. (1989). Modulation of polymorphonuclear leukocyte microbicidal activity and oxidative metabolism by fibrinogen degradation products D and E. *The Journal of Clinical Investigation*, *83*(6), 1916-1924. https://doi.org/10.1172/JCI114098

Kierszenbaum, A. L. (2002). *Histology and cell biology: An introduction to pathology*. Mosby.

Kim, M. G., Shin, D. M., & Lee, S. W. (2010). The healing of critical-sized bone defect of rat zygomatic arch with particulate bone graft and bone morphogenetic protein-2. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery: JPRAS*, *63*(3), 459-466. https://doi.org/10.1016/j.bjps.2008.11.081

Knighton, D. R., Ciresi, K. F., Fiegel, V. D., Austin, L. L., & Butler, E. L. (1986). Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Annals of Surgery*, *204*(3), 322-330. https://doi.org/10.1097/00000658-198609000-00011

Kobayashi, E., Flückiger, L., Fujioka-Kobayashi, M., Sawada, K., Sculean, A., Schaller, B., & Miron, R. J. (2016). Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clinical Oral Investigations*, *20*(9), 2353-2360. https://doi.org/10.1007/s00784-016-1719-1

Kobayashi, M., Kawase, T., Okuda, K., Wolff, L. F., & Yoshie, H. (2015). In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-

rich fibrin preparations: A standardized comparison with PRP preparations. *International Journal of Implant Dentistry*, *1*(1), 31. https://doi.org/10.1186/s40729-015-0032-0

Kosmidis, K., Ehsan, K., Pitzurra, L., Loos, B., & Jansen, I. (2023). An in vitro study into three different PRF preparations for osteogenesis potential. *Journal of Periodontal Research*, *58*(3), 483-492. https://doi.org/10.1111/jre.13116

Kubesch, A., Barbeck, M., Al-Maawi, S., Orlowska, A., Booms, P. F., Sader, R. A., Miron, R. J., Kirkpatrick, C. J., Choukroun, J., & Ghanaati, S. (2019). A low-speed centrifugation concept leads to cell accumulation and vascularization of solid platelet-rich fibrin: An experimental study in vivo. *Platelets*, *30*(3), 329-340. https://doi.org/10.1080/09537104.2018.1445835

Kumar, N., Prasad, K., Ramanujam, L., K, R., Dexith, J., & Chauhan, A. (2015). Evaluation of treatment outcome after impacted mandibular third molar surgery with the use of autologous platelet-rich fibrin: A randomized controlled clinical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *73*(6), 1042-1049. https://doi.org/10.1016/j.joms.2014.11.013

Kumar, R. V., & Shubhashini, N. (2013). Platelet rich fibrin: A new paradigm in periodontal regeneration. *Cell and Tissue Banking*, *14*(3), 453-463. https://doi.org/10.1007/s10561-012-9349-6

Kyyak, S., Blatt, S., Schiegnitz, E., Heimes, D., Staedt, H., Thiem, D. G. E., Sagheb, K., Al-Nawas, B., & Kämmerer, P. W. (2021). Activation of Human Osteoblasts via Different Bovine Bone Substitute Materials With and Without Injectable Platelet

Rich Fibrin in vitro. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *9*, 599224. https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.599224

Laçin, N., İzol, S. B., İpek, F., & Tuncer, M. C. (2019). Ganoderma lucidum, a promising agent possessing antioxidant and anti-inflammatory effects for treating calvarial defects with graft application in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, *34*(9), e201900904. https://doi.org/10.1590/s0102-865020190090000004

Lanir, N., Ciano, P. S., Van de Water, L., McDonagh, J., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (1988). Macrophage migration in fibrin gel matrices. II. Effects of clotting factor XIII, fibronectin, and glycosaminoglycan content on cell migration. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *140*(7), 2340-2349.

Lourenço, E. S., Mourão, C. F. de A. B., Leite, P. E. C., Granjeiro, J. M., Calasans-Maia, M. D., & Alves, G. G. (2018). The in vitro release of cytokines and growth factors from fibrin membranes produced through horizontal centrifugation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *106*(5), 1373-1380. https://doi.org/10.1002/jbm.a.36346

Lullo, G. A. D., Sweeney, S. M., Körkkö, J., Ala-Kokko, L., & Antonio, J. D. S. (2002). Mapping the Ligand-binding Sites and Disease-associated Mutations on the Most Abundant Protein in the Human, Type I Collagen *. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(6), 4223-4231. https://doi.org/10.1074/jbc.M110709200

Lynch, S. E., Marx, R. E., Nevins, M., & Wisner-Lynch, L. A. (2007). *Tissue Engineering: Applications in Oral and Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Publication Company.

Martin, P., & Leibovich, S. J. (2005). Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends in Cell Biology*, *15*(11), 599-607. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2005.09.002

Martin, R. B., Burr, D. B., Sharkey, N. A., & Fyhrie, D. P. (2015). *Skeletal Tissue Mechanics*.

Martini, F. H., Nath, J. L., & Bartholomew. (2017). *Fundamentals of Anatomy & Physiology* (11 th ed.). Pearson.

Marx, R. E. (2001). Platelet-rich plasma (PRP): What is PRP and what is not PRP? *Implant Dentistry*, *10*(4), 225-228. https://doi.org/10.1097/00008505-200110000-00002

Marx, R. E. (2004). Platelet-rich plasma: Evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *62*(4), 489-496. https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.12.003

Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., & Georgeff, K. R. (1998). Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *85*(6), 638-646. https://doi.org/10.1016/s1079-2104(98)90029-4

Matras, H. (1970). [Effect of various fibrin preparations on reimplantations in the rat skin]. *Osterreichische Zeitschrift Fur Stomatologie*, *67*(9), 338-359.

McComb, R. B., Bowers Jr, G. N., & Posen, S. (2013). *Alkaline Phosphatase*. Springer Science & Business Media.

Mescher, A. L., & Junqueira, L. C. Uc. (2013). *Junqueira's basic histology: Text and atlas* (1-Luiz Carlos UChoa). McGraw-Hill Medical.

Miron, R. J., Chai, J., Zheng, S., Feng, M., Sculean, A., & Zhang, Y. (2019). A novel method for evaluating and quantifying cell types in platelet rich fibrin and an introduction to horizontal centrifugation. *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*, *107*(10), 2257-2271. https://doi.org/10.1002/jbm.a.36734

Miron, R. J., Fujioka-Kobayashi, M., Hernandez, M., Kandalam, U., Zhang, Y., Ghanaati, S., & Choukroun, J. (2017). Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): Opportunities in regenerative dentistry? *Clinical Oral Investigations*, *21*(8), 2619-2627. https://doi.org/10.1007/s00784-017-2063-9

Miron, R. J., Moraschini, V., Fujioka-Kobayashi, M., Zhang, Y., Kawase, T., Cosgarea, R., Jepsen, S., Bishara, M., Canullo, L., Shirakata, Y., Gruber, R., Ferenc, D., Calasans-Maia, M. D., Wang, H.-L., & Sculean, A. (2021). Use of platelet-rich fibrin for the treatment of periodontal intrabony defects: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Oral Investigations*, *25*(5), 2461-2478. https://doi.org/10.1007/s00784-021-03825-8

Mourão, C. F. de A. B., Valiense, H., Melo, E. R., Mourão, N. B. M. F., & Maia, M. D.-C. (2015). Obtention of injectable platelets rich-fibrin (i-PRF) and its polymerization with bone graft: Technical note. *Revista Do Colegio Brasileiro De Cirurgioes*, *42*(6), 421-423. https://doi.org/10.1590/0100-69912015006013

Nurden, A. T. (2011). Platelets, inflammation and tissue regeneration. *Thrombosis and Haemostasis*, *105 Suppl 1*, S13-33. https://doi.org/10.1160/THS10-11-0720

O'Connell, S. M. (2007). Safety issues associated with platelet-rich fibrin method. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, *103*(5), 587; author reply 587-593. https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.03.017

Orimo, H. (2010). The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. *Journal of Nippon Medical School = Nippon Ika Daigaku Zasshi*, *77*(1), 4-12. https://doi.org/10.1272/jnms.77.4

Ozdemir, H., Toker, H., Balcı, H., & Ozer, H. (2013). Effect of ozone therapy on autogenous bone graft healing in calvarial defects: A histologic and histometric study in rats. *Journal of Periodontal Research*, *48*(6), 722-726. https://doi.org/10.1111/jre.12060

ÖZEÇ, A. İ., KILIÇ, E., GÜMÜŞ, C., & GÖZE, Ö. F. (2007). Lokal olarak üç farklı dozda simvastatin uygulamasının kemik defekti iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirilmesi. *Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, cilt.10, 10*(2), 82-86.

Özer, T. (2017). *Deneysel Kemik Defektlerinde Lokal Olarak Uygulanan Alendronatın İyileşme Üzerine Etkilerinin Histomorfometrik ve Radyolojik Yöntemler İle İncelenmesi*. https://openaccess.hacettepe.edu.tr/xmlui/handle/11655/3232

Parfitt, A. M. (1995). *Problems in the application of in vitro systems to the study of human bone remodeling. Calcified Tissue International*.

Parrish, W. R., & Roides, B. (2017). Physiology of blood components in wound healing: An appreciation of cellular co-operativity in platelet rich plasma action. *J. Exerc. Sports Orthop*.

Pavan Kumar, A., Vikram Reddy, G., & Raja Babu, P. (2015). Platelet Rich Fibrin-A Second Regeneration Platelet Concentrate and Advances in PRF. *Indian J Dent, 7*.

Pripatnanont, P., Nuntanaranont, T., Vongvatcharanon, S., & Phurisat, K. (2013). The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's

calvarial defects. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*, *41*(8), e191-200. https://doi.org/10.1016/j.jcms.2013.01.018

Prolo, D. J., Gutierrez, R. V., DeVine, J. S., & Oklund, S. A. (1984). Clinical utility of allogeneic skull discs in human craniotomy. *Neurosurgery*, *14*(2), 183-186. https://doi.org/10.1227/00006123-198402000-00011

Puzas, F. J., & Lewis, G. D. (1999). *Biology of osteoclasts and osteoblasts. Orthopaedics. Principles of Basic and Clinical Science*.

Rasubala, L., Yoshikawa, H., Nagata, K., Iijima, T., & Ohishi, M. (2003). Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, *41*(3), 173-178. https://doi.org/10.1016/s0266-4356(03)00075-5

Ratajczak, J., Vangansewinkel, T., Gervois, P., Merckx, G., Hilkens, P., Quirynen, M., Lambrichts, I., & Bronckaers, A. (2018). Angiogenic Properties of "Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin". *Scientific Reports*, *8*(1), 14632. https://doi.org/10.1038/s41598-018-32936-8

Reddi, A. H. (1992). Regulation of cartilage and bone differentiation by bone morphogenetic proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, *4*(5), 850-855. https://doi.org/10.1016/0955-0674(92)90110-x

Ripamonti, U., & Duneas, N. (1998). Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *101*(1), 227-239. https://doi.org/10.1097/00006534-199801000-00040

Ritto, F. G., Pimentel, T., Canellas, J. V. S., Junger, B., Cruz, M., & Medeiros, P. J. (2019). Randomized double-blind clinical trial evaluation of bone healing after

third molar surgery with the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, *48*(8), 1088-1093. https://doi.org/10.1016/j.ijom.2019.01.020

Rodella, L. F., Favero, G., Boninsegna, R., Buffoli, B., Labanca, M., Scarì, G., Sacco, L., Batani, T., & Rezzani, R. (2011). Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microscopy Research and Technique*, *74*(8), 772-777. https://doi.org/10.1002/jemt.20968

Rosenthal, A. R., Egbert, P. R., Harbury, C., Hopkins, J. L., & Rubenstein, E. (1978). Use of platelet-fibrinogen-thrombin mixture to seal experimental penetrating corneal wounds. *Albrecht Von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie. Albrecht Von Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, *207*(2), 111-115. https://doi.org/10.1007/BF00414308

Rosenthal, A. R., Harbury, C., Egbert, P. R., & Rubenstein, E. (1975). Use of a platelet-fibrinogen-thrombin mixture as a corneal adhesive: Experiments with sutureless lamellar keratoplasty in the rabbit. *Investigative Ophthalmology*, *14*(11), 872-875.

Rothman, R. H., & Simeone, F. A. (1992). *The spine. Journal of Pediatric Orthopaedics*. Saunders Company, Philadelphia.

S, L., H, Y., Q, D., H, B., A, L., W, L., J, C., & Y, H. (2022). A comparative study of the effects of platelet-rich fibrin, concentrated growth factor and platelet-poor plasma on the healing of tooth extraction sockets in rabbits. *BMC oral health*, *22*(1). https://doi.org/10.1186/s12903-022-02126-0

Sampaio-Maia, B., Caldas, I. M., Pereira, M. L., Pérez-Mongiovi, D., & Araujo, R. (2016). The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic

Diseases. *Advances in Applied Microbiology, 97,* 171-210. https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2016.08.002

Schmitz, J. P., Schwartz, Z., Hollinger, J. O., & Boyan, B. D. (1990). Characterization of rat calvarial nonunion defects. *Acta Anatomica, 138*(3), 185-192. https://doi.org/10.1159/000146937

Shah, R., M G, T., Thomas, R., & Mehta, D. S. (2017). An Update on the Protocols and Biologic Actions of Platelet Rich Fibrin in Dentistry. *The European Journal of Prosthodontics and Restorative Dentistry, 25*(2), 64-72. https://doi.org/10.1922/EJPRD_01690Shah09

Smanio Neto, H., Moy, P. K., Martinez, E. F., Pelegrine, A. A., Abdalla, H. B., Clemente-Napimoga, J. T., & Napimoga, M. H. (2023). Sema4D is diminished in leukocyte platelet-rich fibrin and impairs pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells' functionality. *Archives of Oral Biology, 155,* 105778. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2023.105778

Sohn, D. S., Huang, B., Kim, J., Park, W. E., & Park, C. C. (2015). Utilization of autologous concentrated growth factors (CGF) enriched bone graft matrix (Sticky bone) and CGF-enriched fibrin membrane in Implant Dentistry. *J Implant Adv Clin Dent, 7.*

Song, I., Kim, B.-S., Kim, C.-S., & Im, G.-I. (2011). Effects of BMP-2 and vitamin D3 on the osteogenic differentiation of adipose stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 408*(1), 126-131. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.03.135

Söderhäll, C., Marenholz, I., Kerscher, T., Rüschendorf, F., Esparza-Gordillo, J., Worm, M., Gruber, C., Mayr, G., Albrecht, M., Rohde, K., Schulz, H., Wahn, U., Hubner,

N., & Lee, Y.-A. (2007). Variants in a Novel Epidermal Collagen Gene (COL29A1) Are Associated with Atopic Dermatitis. *PLoS Biology*, *5*(9), e242. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050242

Spicer, P. P., Kretlow, J. D., Young, S., Jansen, J. A., Kasper, F. K., & Mikos, A. G. (2012). Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nature Protocols*, *7*(10), 1918-1929. https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113

Stucki, U., Schmid, J., Hämmerle, C. F., & Lang, N. P. (2001). Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. *Clinical Oral Implants Research*, *12*(2), 121-127. https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2001.012002121.x

Subbiahdoss, G., Fernández, I. C. S., Domingues, J. F. da S., Kuijer, R., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2011). In vitro interactions between bacteria, osteoblast-like cells and macrophages in the pathogenesis of biomaterial-associated infections. *PloS One*, *6*(9), e24827. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024827

Sun, J., Yu, Y., Gu, Z., Gu, L., & Bi, W. (2011). [Effect of BMP-2 on osteogenesis of bone mesenchymal stem cells in rats]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue = Shanghai Journal of Stomatology*, *20*(4), 352-357.

Sunitha Raja, V., & Munirathnam Naidu, E. (2008). Platelet-rich fibrin: Evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, *19*(1), 42-46. https://doi.org/10.4103/0970-9290.38931

Şirin, S. Y. (2005). *Deneysel olarak meydana getirilen kemik defektlerine yerleştirilen farklı tipteki yapay kaynaklı greft materyallerinin kemikleşmesinde hiperbarik*

oksijen uygulamasının etkilerinin incelenmesi. İ. Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız Diş–Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabillim Dalı. İstanbul.

Tanık, A., Güler Doğru, A., Akpolat, V., Acun Kaya, F., Sarıbaş, E., Gül, M., İrtegün Kandemir, S., & Deveci, E. (2018). Investigation of the effect of combined use of alloplastic-based tricalcium phosphate bone graft and antihemorrhagic plant extract (ABS) on bone regeneration in surgically induced bone defects in nondiabetic rats: An experimental animal study. *Turkish Journal of Medical Sciences, 48*(6), 1302-1314. https://doi.org/10.3906/sag-1803-201

Tawes, R. L., Sydorak, G. R., & DuVall, T. B. (1994). Autologous fibrin glue: The last step in operative hemostasis. *American Journal of Surgery, 168*(2), 120-122. https://doi.org/10.1016/s0002-9610(94)80049-9

Tiggelman, A. M., Boers, W., Linthorst, C., Sala, M., & Chamuleau, R. A. (1995). Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: Evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *Journal of Hepatology, 23*(3), 307-317.

Toffler, M., Toscano, N., Holtzclaw, D., Corso, M. D., & Ehrenfest, D. (2009). Introducing Choukroun's Platelet Rich Fibrin (PRF) to the Reconstructive Surgery Milieu. *Journal of Implant & Advanced Clinical Dentistry*.

Touri, M., Moztarzadeh, F., Abu Osman, N. A., Dehghan, M. M., Brouki Milan, P., Farzad-Mohajeri, S., & Mozafari, M. (2020). Oxygen-Releasing Scaffolds for Accelerated Bone Regeneration. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, *6*(5), 2985-2994. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01789

Tsirogianni, A. K., Moutsopoulos, N. M., & Moutsopoulos, H. M. (2006). Wound healing: Immunological aspects. *Injury, 37 Suppl 1*, S5-12. https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.02.035

Tuan, T. L., Song, A., Chang, S., Younai, S., & Nimni, M. E. (1996). In vitro fibroplasia: Matrix contraction, cell growth, and collagen production of fibroblasts cultured in fibrin gels. *Experimental Cell Research*, *223*(1), 127-134. https://doi.org/10.1006/excr.1996.0065

Tunalı, M., Özdemir, H., Küçükodacı, Z., Akman, S., & Fıratlı, E. (2013). In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): A new platelet concentrate. *The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery*, *51*(5), 438-443. https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.08.003

Tunalı, M., Özdemir, H., Küçükodacı, Z., Akman, S., Yaprak, E., Toker, H., & Fıratlı, E. (2014). A novel platelet concentrate: Titanium-prepared platelet-rich fibrin. *BioMed Research International*, *2014*, 209548. https://doi.org/10.1155/2014/209548

Tuskan, C., & Yaltırık, M. (2002). *Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan biyomateryaller*. İÜ Basım ve Yayınevi Müdürlüğü.

Vahabi, S., Vaziri, S., Torshabi, M., & Rezaei Esfahrood, Z. (2015). Effects of Plasma Rich in Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin on Proliferation and Viability of Human Gingival Fibroblasts. *Journal of Dentistry (Tehran, Iran)*, *12*(7), 504-512.

Vander, A. J., Sherman, J. H., & Luciano, D. S. (2015). *Human Physiology: The Mechanisms of Body Function* (13 th ed.).

Wähnert, D., Koettnitz, J., Merten, M., Kronenberg, D., Stange, R., Greiner, J. F. W., Kaltschmidt, C., Vordemvenne, T., & Kaltschmidt, B. (2021). Spongostan™

Leads to Increased Regeneration of a Rat Calvarial Critical Size Defect Compared to NanoBone® and Actifuse. *Materials (Basel, Switzerland)*, *14*(8), 1961. https://doi.org/10.3390/ma14081961

Wang, X., Dong, X., Reyes, M., Nyman, J., & Uzun, H. (2010). *Fundamental Biomechanics in Bone Tissue Engineering*.

Weibrich, G., Kleis, W. K. G., Hafner, G., Hitzler, W. E., & Wagner, W. (2003). Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clinical Oral Implants Research*, *14*(3), 357-362. https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.00810.x

Weibrich, G., Kleis, W. K. G., Hitzler, W. E., & Hafner, G. (2005). Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: A technical report. *The International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*, *20*(1), 118-123.

Weiner, S., & Traub, W. (1992). Bone structure: From angstroms to microns. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *6*(3), 879-885.

Whitman, D. H., Berry, R. L., & Green, D. M. (1997). Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, *55*(11), 1294-1299. https://doi.org/10.1016/s0278-2391(97)90187-7

Wojdasiewicz, P., Brodacki, S., Cieślicka, E., Turczyn, P., Poniatowski, Ł. A., Ławniczak, W., Olczak, M., Stolarczyk, E. U., Wróbel, E., Mikulska, A., Lach-

Gruba, A., Żuk, B., Romanowska-Próchnicka, K., & Szukiewicz, D. (2024). Salidroside: A Promising Agent in Bone Metabolism Modulation. *Nutrients*, *16*(15), 2387. https://doi.org/10.3390/nu16152387

Wozney, J. M. (2002). Overview of bone morphogenetic proteins. *Spine*, *27*(16 Suppl 1), S2-8. https://doi.org/10.1097/00007632-200208151-00002

Yang, L. J., & Jin, Y. (1990). Immunohistochemical observations on bone morphogenetic protein in normal and abnormal conditions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *257*, 249-256.

Yang, N. N., Bryant, H. U., Hardikar, S., Sato, M., Galvin, R. J., Glasebrook, A. L., & Termine, J. D. (1996). Estrogen and raloxifene stimulate transforming growth factor-beta 3 gene expression in rat bone: A potential mechanism for estrogen- or raloxifene-mediated bone maintenance. *Endocrinology*, *137*(5), 2075-2084. https://doi.org/10.1210/endo.137.5.8612550

Yu, S., Bd, Y. T., Bd, Y. W., Bd, M. F., BMed, S. L., BMed, G. T., BMed, Z. Y., Miron, R. J., Zhang, Y., Yang, Z., & Wang, Y. (2023). Early tissue and healing responses after maxillary sinus augmentation using horizontal platelet rich fibrin bone blocks. *BMC Oral Health*, *23*(1), 589. https://doi.org/10.1186/s12903-023-03228-z

Yu, S., Tian, Y., Wei, Y., Feng, M., Li, S., Tong, G., Yu, Z., Wang, Y., Miron, R. J., Zhang, Y., Wang, Y., & Yang, Z. (2023). Comparative microcomputed tomography and histological analysis of the effects of a horizontal platelet-rich fibrin bone block on maxillary sinus augmentation: A preclinical in vivo study. *Clinical Oral Implants Research*, *34*(6), 555-564. https://doi.org/10.1111/clr.14053

Zhou, J., Li, X., Sun, X., Qi, M., Chi, M., Yin, L., & Zhou, Y. (2018). Bone regeneration around immediate placed implant of molar teeth with autologous platelet-rich fibrin: Two case reports. *Medicine*, *97*(44), e13058. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000013058