

T.C.  
ORDU ÜNİVERSİTESİ



**KONSANTRE BÜYÜME FAKTÖRÜ UYGULANMIŞ TİTANYUM  
YÜZEYLERİNDE OSTEOLAST CEVABI**

**İSMAİL ONUR ŞAHİN**

**DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Ceren GÖKMENOĞLU**

**Bu uzmanlık tezi Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TU- 1603 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ORDU-2016**

**T.C.**  
**ORDU ÜNİVERSİTESİ**

**KONSANTRE BÜYÜME FAKTÖRÜ UYGULANMIŞ TİTANYUM  
YÜZEYLERİNDE OSTEOLAST CEVABI**

**İSMAİL ONUR ŞAHİN**

**DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI  
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Yrd. Doç. Dr. Ceren GÖKMENOĞLU**

**Bu uzmanlık tezi Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi  
tarafından TU-1603 proje numarası ile desteklenmiştir.**

**ORDU-2016**

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu uzmanlık tezinin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

İsmail Onur ŞAHİN

## ÖZET

### KONSANTRE BÜYÜME FAKTÖRÜ UYGULANMIŞ TİTANYUM YÜZEYLERİNDE OSTEOLAST CEVABI

**Amaç:** Büyüme faktörleri doku iyileşmesinin farklı evrelerinde salgılanan, implantı çevreleyen dokunun rejenerasyon kapasitesini artırıp yeni kemik oluşumunu indükleyebilen maddelerdir. Konsantre büyüme faktörü (KBF) venöz kanın santrifüjüyle elde edilen ve yoğun ve zengin büyüme faktörleri içeren trombosit konsantreleridir. Bu çalışmanın amacı titanyum (Ti) disk yüzeylerinin KBF ile muamele edilmesinin osteoblast hücrelerinin proliferasyon ve diferansiyasyonları üzerindeki etkisini değerlendirmektir.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmamızda 5 mm çapında ve 1mm kalınlığında Ti diskler kullanıldı. Kontrol grubu olarak KBF uygulanmamış titanyum yüzeyler kullanılırken, test grubundaki disk yüzeyleri KBF serumu ile muamele edildi. KBF serumunun osteoblast hücreleri üzerindeki etkisini kontrol ve test grupları arasında karşılaştırmak amacıyla; 1. ve 3.günlerde osteoblast hücre sayısı, morfolojisi, proliferasyonu ve osteokalsin (OCN) seviyeleri incelendi. Üçüncü, 7. ve 14. günlerde ise alkalen fosfataz (ALP) aktivitesi değerlendirildi. Hücre sayısı hemositometre ile saptandı. Hücre proliferasyon oranları immunohistokimyasal teknik ile değerlendirildi ve hücre morfolojileri taramalı elektron mikroskobu ile incelendi.

**Bulgular:** Birinci ve üçüncü günlerde MTT testi yardımıyla hücre proliferasyonları değerlendirildiğinde; her iki değerlendirme periyodunda da test grubunda hücrelerin proliferasyon yüzdeleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek bulundu ( $p<0.05$ ). ALP aktivitesi değerlendirildiğinde 3, 7, ve 14. günlerde test grubunun absorbans değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksek görüldü ( $p<0.05$ ). Birinci. Gündeki OCN seviyesi kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde yüksekken ( $p<0.05$ ); 3.günde her iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık görülmedi ( $p>0.05$ ). Ancak kontrol grubunda 3.günde OCN aktivitesinde 1. güne göre anlamlı bir azalma gözlemlendi ( $p<0.05$ ).

**Sonuç:** KBF serumu Ti diskler üzerindeki osteoblast hücrelerinin proliferasyonunu ve diferansiyasyonunu kontrol grubundaki hücreler göre belirgin şekilde arttırmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Konsantre büyüme faktörü, alkalen fosfataz, osteokalsin, proliferasyon, Saos-2, hücre kültürü, MTT testi



## ABSTRACT

### OSTEOBLAST RESPONSE ON TITANIUM SURFACES TREATED WITH CONCENTRATED GROWTH FACTOR

**Aim:** Growth factors are released at different stages of tissue healing and trigger tissue repair and regeneration. They induce new bone formation around osseointegrated implants by increasing regeneration capacity. CGF, is produced by the centrifugal venous blood which contains intense and rich growth factors. The aim of this study is to assess the effect of CGF that is applied on titanium discs on cell proliferation and differentiation.

**Materials and Methods:** In our study, titanium discs was used. Disc surfaces in the test group were treated with CGF serum. Titanium surface without CGF was used as a control group. The effects of CGF serum on number of osteoblast cells, morphology, proliferation, alkaline phosphatase and osteocalcin levels were examined. Cells on titanium discs were cultured for 1, 3, 7 and 14 days. Cell number was determined by hemocytometer. The rates of cell proliferation were investigated by immunohistochemical techniques and cell morphology was examined by using scanning electron microscopy.

**Results:** MTT assay indicated that the absorbance in the test group significantly increased than that in the control group during 3-day culture period ( $P < 0.05$ ). ALP activity: the absorbance of the test group was significantly higher than that of the control group at days 3, 7, and 14 ( $P < 0.05$ ). CGF showed positive effect on osteocalcin activity at day 1, but significant difference was not seen at day 3.

**Conclusion:** Our results suggest that CGF can efficiently stimulate the proliferation, differentiation and extension of Saos-2 cells.

**Key Words:** Concentrated growth factor, alkaline phosphatase, osteocalcin, proliferation, Saos-2, cell culture, MTT assay

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın oluşturulmasından sonuçlandırılmasına kadar her aşamasında ilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım ve değerli hocam **Yrd. Doç. Dr. Ceren GÖKMENOĞLU**'na,

Asistanlığa başladığım ilk günden beri desteğiyle ve bilgisiyle yanımda olan **Doç. Dr. Mehmet Cankat KARA**'ya,

Uzmanlık eğitimimde büyük emekleri olan Ordu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı'nın çok değerli öğretim üyeleri, **Prof. Dr. Varol ÇANAKÇI**'ya, **Yrd. Doç. Dr. Mustafa Cihan YAVUZ**'a ve **Yrd. Doç. Dr. Figen ÖNGÖZ DEDE**'ye ,

Birlikte çalışmaktan zevk duyduğum sevgili asistan arkadaşlarıma,

Tüm eğitim hayatım ve tez çalışmam boyunca karşılıksız sevgi ve emeklerini, sonsuz desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili babam **Fahrettin ŞAHİN**'e, annem **Bedriye ŞAHİN**'e, biricik kardeşim **İrem ŞAHİN**'e, uzmanlık ve tez çalışmam süresince büyük bir sabır ve destekle hep yanımda olan nişanlım **Sezgi CİNEL**'e sonsuz teşekkürler...

Bu uzmanlık tezi **Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi** tarafından **TU-1603** proje numarası ile desteklenmiştir. Tüm destekleri için Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

KONULAR	Sayfa No
TEZ BİLDİRİMİ	
ONAY SAYFASI	
TÜRKÇE ÖZET	
İNGİLİZCE ÖZET	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	
ŞEKİLLER DİZİNİ	
TABLolar DİZİNİ	
GRAFİKLER DİZİNİ	
SİMGE ve KISALTMALAR DİZİNİ	
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Osseointegrasyon	3
2.1.1. Osseointegrasyon Mekanizması	4
2.2. Kemik Doku	8
2.2.1. Kemik Dokunun Mikroyapısal Bileşenleri	9
2.2.1.1. Osteojenik Hücreler	9
2.2.1.2. Osteoklastlar	11
2.3. Osseointegrasyonu Etkileyen Faktörler	12
2.3.1. Osseointegrasyonu Etkileyen İmplanta Bağlı Faktörler	13
2.3.1.1. Biyouyumluluk	13
2.3.1.2. Dental İmplant Materyalleri	14
2.3.1.3. Yüzey Pürüzlülüğü	16
2.3.1.4. Yüzey Özelliği	17
2.3.1.4.1. İşlenmemiş Yüzeyli İmplantlar (Makinelenmiş)	18



2.3.1.4.2. İşlenmiş Yüzeyle İmplantlar	19
2.3.1.4.3. Kaplanmış Yüzeyle İmplantlar	23
2.3.1.4.4. Kombine İmplantlar	25
2.3.1.5. Biyomimetik Yaklaşımlar	25
2.3.1.5.1. Adezyon Faktörleri	27
2.3.1.5.2. Büyüme Faktörleri	27
2.4. Trombosit Konsantreleri	32
2.4.1. Trombositten Zengin Plazma (TZP)	32
2.4.2. Trombositten Zengin Fibrin (TZF)	34
2.4.3. Konsantr Büyüme Faktörü (KBF)	36
2.4.4. TZP-TZF-KBF Farkı	37
2.4.5. Trombosit Konsantrasyonlarının Etki Mekanizması	38
<b>3.GEREÇ VE YÖNTEM</b>	<b>41</b>
3.1. Titanyum Disklerin Hazırlanması	41
3.2. Hücre Kültürü	42
3.3. KBF'nin Elde Edilmesi	43
3.4. Deney Aşaması	44
3.4.1. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu	46
3.4.1.1. MTT Testi	46
3.4.2. Hücre Diferansiyasyonu	47
3.4.2.1. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesi	47
3.4.2.2. Osteokalsin Sentezi	48
3.4.3.Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile Hücre	48
Morfolojilerinin Saptanması	
3.5. İstatistiksel Değerlendirmeler	49
<b>4. BULGULAR</b>	<b>50</b>

4.1. Metabolik Aktivite Temelli Proliferasyon Testi İle Proliferasyon Yüzdelerinin Saptanması (MTT Testi)	50
4.1.1. Kontrol Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular	50
4.1.2. Test Grubu Olarak Kullanılan KBF Serumu Uygulanmış Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular	50
4.1.3. Proliferasyon Bulgularının İstatistiksel Değerlendirilmesi	52
4.2. Osteokalsin (OCN) Testi	55
4.2.1. Kontrol Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular	55
4.2.2. Test Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular	55
4.2.3. OCN Bulgularının İstatistiksel Değerlendirilmesi	57
4.3. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesi	59
4.3.1. Kontrol Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular	59
4.3.2. Test Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular	59
4.3.3. ALP Bulgularının İstatistiksel Değerlendirilmesi	61
4.4. Scanning elektron mikroskobu (SEM) ile hücre morfolojilerinin saptanması	63
4.4.1. Kontrol grubuna ait bulgular	63
4.4.2. Test Grubuna ait bulgular	65
<b>5. TARTIŞMA</b>	<b>66</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	<b>78</b>
<b>7. KAYNAKLAR</b>	<b>79</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	<b>123</b>

<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>S.</b>
<b>Şekil 2.1:</b> Kontak ve fibröz osteointegrasyon	4
<b>Şekil 2.2:</b> Kemik hücreleri ve hücreler arası ilişki	12
<b>Şekil 2.3:</b> Makinelenmiş implant yüzeyinin SEM görüntüsü	19
<b>Şekil 2.4:</b> Işık mikroskobu altında yüksek magnifikasyonda çekilmiş fotomikrograf	26
<b>Şekil 3.1:</b> 5 mm çapında ve 1 mm kalınlığında makinelenmiş Grade 4 saf titanyum diskler	41
<b>Şekil 3.2:</b> Dezenfeksiyon işleminin gerçekleştirildiği ultrasonik temizleyici	42
<b>Şekil 3.3:</b> Thoma lamı üzerinde mikroskop ile hücre sayımı ve hücre sayımında kullanılan hemositometrik kamera diyagramı	43
<b>Şekil 3.4:</b> Antikoagulan içermeyen tüplerdeki venöz kanın santrifüj işlemi	44
<b>Şekil 3.5:</b> Santrifüj sonrası elde edilen fibrin pıhtı, b) KBF fibrin pıhtının kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırılarak KBF kutusuna aktarılması	44
<b>Şekil 3.6:</b> OCN testi, SEM görüntülemesi ve ALP aktivitesi için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka	45
<b>Şekil 4.1:</b> 24 saat sonunda kontrol grubundaki Ti disk yüzeyinden alınan SEM görüntüsü	64
<b>Şekil 4.2:</b> 72 saat sonunda kontrol grubundaki Ti disk yüzeyinden alınan SEM görüntüsü	64
<b>Şekil 4.3:</b> 24 saat sonunda test grubundan alınan SEM görüntüsü	65
<b>Şekil 4.4:</b> 24 saat sonunda test grubundan alınan SEM görüntüsü	66

<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>S.</b>
<b>Tablo 2.1:</b> Büyüme faktörleri ve sentezlendiği hücreler.	28
<b>Tablo 2.2:</b> TZF içindeki büyüme faktörlerinin salınım oranları (ng)	35
<b>Tablo 4.1:</b> 24. ve 72. saat sonunda OD 570 nm'de test ve kontrol gruplarının hücre proliferasyon oranları	51
<b>Tablo 4.2:</b> 24 ve 72. saat sonunda proliferasyon testlerinin sonucunda elde edilen bulguların istatistik sonuçlarının özeti	54
<b>Tablo 4.3:</b> 24. ve 72. saat sonunda test ve kontrol gruplarının OCN değerleri	56
<b>Tablo 4.4:</b> OCN bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi	57
<b>Tablo 4.5:</b> 3., 7. ve 14. günler sonunda test ve kontrol gruplarının ALP değerleri	60
<b>Tablo 4.6:</b> ALP bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi	62

<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b>	<b>S.</b>
<b>Grafik 4.1:</b> 24. ve 72. saat sonucunda test ve kontrol gruplarının hücre proliferasyon oranlarının karşılaştırılması	52
<b>Grafik 4.2:</b> Test ve kontrol gruplarının ait 24 ve 72. saat sonundaki proliferasyon testlerinin grup içi karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik	52
<b>Grafik 4.3:</b> Test ve kontrol gruplarına ait proliferasyon testi sonuçlarının saat bazında karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik	53
<b>Grafik 4.4:</b> 24. ve 72. saat sonucunda test ve kontrol gruplarının OCN değerlerinin karşılaştırılması	56
<b>Grafik 4.5:</b> Test ve kontrol gruplarının ait 1. ve 3. günler sonundaki OCN testlerinin grup içi karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik.	58
<b>Grafik 4.6:</b> Test ve kontrol gruplarına ait OCN testi sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik.	58
<b>Grafik 4.7:</b> 3., 7. ve 14. günler sonunda test ve kontrol gruplarının ALP değerlerinin karşılaştırılması	60
<b>Grafik 4.8:</b> Test ve kontrol gruplarının ait 3., 7. ve 14. günler sonundaki ALP testlerinin grup içi karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik	61
<b>Grafik 4.9:</b> ALP testi sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik	63

## SİMGELER ve KISALTMALAR

TZP	:	Trombositten Zengin Plazma
TZF	:	Trombositten Zengin Fibrin
KBF	:	Konsantre Büyüme Faktörü
$\mu\text{m}$	:	Mikrometre
PDGF	:	Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
TGF- $\beta$	:	Transforme Edici Büyüme Faktör-Beta
mm	:	Milimetre
MDGF	:	Makrofaj Kaynaklı Büyüme Faktörü
BSP	:	Kemik Sialoprotein
BMP	:	Kemik Morfogenetik Proteinleri
IL	:	İnterlökin
TNF- $\alpha$	:	Tümör Nekroze Edici Faktör- Alfa
Fe-Cr-Ni	:	Paslanmaz çelik
Cr-Co-Mo	:	Krom-Kobalt-Molibden
cpTi	:	Saf Titanyum
Ti-6Al-4V	:	Titanyum-Alüminyum-Vanadyum
KİT	:	Kemik-İmplant Teması
TCP	:	Trikalsiyum Fosfat
HA	:	Hidroksiapatit
$\mu$	:	Mikron
Ra	:	Yüzey Pürüzlülüğü
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	:	Alüminyum Oksit
TiO <sub>2</sub>	:	Titanyum Oksit
SLA	:	Sand-Blasted, Large-Grid, Acid-Etch
Ti	:	Titanyum
TPS	:	Titanyum Plazma Sprey
IGF	:	Nsülin Benzeri Büyüme Faktörü
RGD	:	Arginin, Glisin, Aspartik Asit Yapısı
VEGF	:	Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
FGF	:	Fibroblast Büyüme Faktörü

PIGF	:	Plasenta Büyüme Faktörü
KKF	:	Koronale Kaydırılan Flep Tekniği
PMNL	:	Polimorfonükleer Lökositler
SEM	:	Scanning elektron mikroskobu
dk	:	Dakika
°C	:	Santigrat Derece
ATCC 85-HTB	:	Saos-2
FBS	:	Fetal Sığır Serumu
MEM- $\alpha$	:	MEM-Minimum Essential Medium Alpha
CO <sub>2</sub>	:	Karbondioksit
ml	:	Mililitre
MTT	:	[3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] testi
OCN	:	Osteokalsin
ALP	:	Alkalen Fosfataz
PBS	:	Phosphate buffered saline
mg	:	Miligram
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
OD	:	Optik Dansite
nm	:	Nanometre
ng	:	Nanogram

## 1.GİRİŞ VE AMAÇ

Dental implantlar, kaybedilen dişlerin rehabilitasyonunda, kraniyofasiyal iskeletin rekonstrüksiyonunda, ortodontik tedavide ankraj olarak ve distraksiyon osteogenezi ile yeni kemik oluşumuna yardımcı olma işlemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Brunski ve ark., 2000). İmplant tedavilerinin temel hedefi hastanın çiğneme fonksiyonunu ve estetik ihtiyaçlarını göz önünde bulundurarak, en hızlı şekilde uygulanan ve düşük maliyetli restorasyonlarla, uzun süreli başarı elde edebilmektir (Çetin, 2012).

İmplant tedavilerinin en büyük dezavantajı tedavi süresinin uzunluğudur. İmplant uygulamalarının ardından protetik sürecin başlaması için implantın yerleştirildiği kemik içerisinde yeterli stabiliteye ulaşması gerekmektedir. İstenen stabilitenin oluşmasını sağlayan osseointegrasyon olgusu, canlı kemik dokusu ile saf titanyumdan yapılmış olan implant yüzeyi arasındaki direkt ve devamlı temas anlamına gelmektedir. Osseointegrasyon sürecinin tamamlanması için gereken sürealt çenede 3-4 ay, üst çenede ise 6-8 ay olarak bildirilmiştir (Branemark ve ark., 1997; Baker ve ark., 1999; Dergin, 2006). Restorasyonun kısa sürede tamamlanmasının hastalar üzerindeki olumlu sosyal ve psikolojik etkilerinden dolayı, implantın iyileşme süresinin kısaltılmasını sağlayabilecek yolların araştırılması zorunlu hale gelmiştir (Öncü, 2013). Son yıllarda bu amaçla, implantların yükleme protokol süresini düzenlemeye ve osseointegrasyon sürecini kısaltmaya yönelik birçok çalışma yapıldığı görülmektedir (Kaya, 2010).

Günümüzde osseointegrasyonu geliştirmek ve osseointegrasyon sürecini kısaltmak amacıyla kullanılan büyüme faktörleri, doku iyileşmesinin farklı evrelerinde salgılanan, dokunun tamiri ve rejenerasyonunu tetikleyen ajanlardır. Ayrıca bu faktörler yeni kemik oluşumunu indüklemektedir (Bostrom ve ark., 2000).

Büyüme faktörlerinin yoğun halde bulunduğu ve bireyin kendisinden elde edilen trombositten zengin plazma (TZP), trombositten zengin fibrin (TZF) ve konsantre büyüme faktörü (KBF) gibi ajanlar, yumuşak dokunun ve kemik dokusunun iyileşmesini indükleme ve hızlandırma gibi özellikleri nedeniyle son yıllarda diş hekimliğinde kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan bazı çalışmalar sonucunda otojen



plazmadan zengin büyüme faktörlerinin, implant kavitesine uygulandıklarında implant etrafındaki yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu arttırdıkları ve iyileşme süresini kısalttıkları gösterilmiştir (Anitua, 1999; Anitua, 2006).

Tıp alanında yapılan deneysel çalışmalarda, organizmanın nasıl etkileneceği veya canlılığın bu gelişmelere nasıl tepki göstereceğinin bilinmesi gerekmektedir. Tıbbi deneylerin canlı üzerinde yapılması etik açıdan birçok sorunu beraberinde getirmektedir. Bu nedenle canlı ortamın küçük kopyaları elde edilmeye çalışılmış ve bu mikro sistemlerin oluşturulmasında hücre kültürü tekniklerinden faydalanılmıştır (Kiremitçi, 1993; Peter ve ark., 1998). Hazırlanması zor, son derece titizlik gerektiren ve hassas çalışmalar içeren hücre kültürü teknolojisi son yıllarda büyük ilerlemeler kaydetmiştir. In vitro çalışmaların temelini oluşturan hücre kültürü sistemleri bugün birçok alanda uygulanabilirliği nedeniyle büyük öneme sahiptir (Ishaug-Riley ve ark., 1998). Ancak bu anlamda literatür incelendiğinde TZP ve TZF uygulamasının dental implantların osseointegrasyonu üzerinde etkisinin incelendiği çok sayıda hücresel çalışma mevcutken (Marx, 2001; Zechner ve ark., 2003; Yamada ve ark., 2004); özellikle KBF'nin çevre dokular ve kemik hücreleri üzerine etkisi ile ilgili veriler ise yetersizdir (Rodella ve ark., 2011).

TZP ve TZF'ye oranla içeriğindeki yüksek miktardaki büyüme faktörleri sayesinde KBF'nin implant etrafındaki kemiğin iyileşme hızını daha fazla arttırılabileceği, daha kaliteli kemik oluşumunu sağlayabileceği ve böylelikle osseointegrasyon süresini kısaltılabileceği düşünülmektedir (Sacco, 2006; Park ve ark., 2016). Bu nedenle bu çalışmanın amacı; KBF ile muamele edilmeyen disk yüzeyleri ile karşılaştırma yapılarak, makinelenmiş saf titanyum disk yüzeylerinin KBF ile muamele edilmesinin in vitro ortamda osteoblast hücrelerinin sayısı, proliferasyonu ve hücre metabolizması üzerindeki etkisinin değerlendirilmesidir.

## **2.GENEL BİLGİLER**

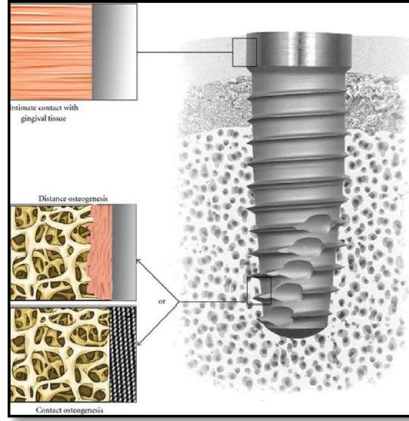
### **2.1. Osseointegrasyon**

Osseointegrasyon, bir implantın başarısını veya başarısızlığını tanımlayan bir kavram olarak ilk defa Branemark tarafından tanımlanmıştır (Branemark ve ark., 1969). Branemark ve arkadaşları (1969) osseointegrasyonu “yaşayan kemik dokusu ile titanyum implant arasında, ışık mikroskobu düzeyinde büyütme ile gözlenen doğrudan temas” olarak tanımlamışlardır. Osseointegrasyonun kavramının temellerinin atılmasının ardından Branemark ve arkadaşları (1986) tarafından “canlı kemik dokusu ile yükleme altındaki implant yüzeyi arasında doğrudan yapısal ve işlevsel bağlantı” olarak yeniden tanımlanmıştır.

American Academy of Implant Dentistry (1986) ise osseointegrasyonu, “implanttan kemiğe devamlı bir kuvvet iletimini ve dağılımını sağlayacak şekilde, kemikle implant arasında kemik dışında bir doku olmaksızın kurulan bağlantı” olarak tanımlamıştır ve istenilen bir durum olduğu düşünülen fibröz integrasyonun başarısızlık olarak tanımlanabilecek bir durum olduğunu bildirmiştir (Şekil 2.1).

Osseointegrasyon üzerine yaptıkları birçok çalışma ve klinik deneyimleri sonrasında Albrektsson ve Zarb (1998) ise osseointegrasyonu “klinik olarak asemptomatik olan alloplastik materyalin rijit fiksasyonu ve bunun fonksiyonel yük altında devam etmesi” şeklinde tanımlamışlardır.

Bu yüzyılın başına kadar yapılan tanımlarda osseointegrasyon sadece implant stabilitesinin klinik ve histolojik gözlemleri olarak ifade edilirken; Branemark ve arkadaşları (2005) osseointegrasyonu farklı açılardan yeniden tanımlamıştır. Bu tanımlamaya göre makroskobik ve mikroskobik açıdan osseointegrasyon, implantla uyumlu bir şekilde yeniden şekillenen kemik dokusunun implant yüzeyiyle temasta olmasını ifade etmektedir ve bu ilişki ışık mikroskobunda kemikle implant arasında bağ dokusunun olmaması ile karakterizedir



Şekil 2.1: Kontak ve fibröz osteointegrasyon (Pathan ve ark., 2015).

Makroskobik biyomekanik bakış açısına göre osseointegrasyon; implantı çevreleyen canlı kemik dokusu arasında fonksiyonel yükler nedeniyle hareketlilik olmaması ve implantın belli şiddetteki yüklerle karşılık, aynı oranda deformasyon göstermesi olarak tanımlanmaktadır (Skalak ve Branemark, 1995; Branemark, 2005).

Mikroskobik ve biyofiziksel bakış açısına göre ise ışık ve elektron mikroskobunda incelenen implant yüzeyinde normal kemik ve kemik iliğinin gözlenmesi ve bunun zamanla implantı çevreleyen normal kemik yapısına dönüşmesidir (Skalak ve Branemark, 1995; Branemark, 2005).

Kısacası, organize canlı kemik dokusu ile implant yüzeyi arasında osseointegrasyonun sağlanması ve devamlılığı implant başarısı için en önemli kriter olduğu görülmektedir. Bu nedenle osseointegrasyon kavramının ve osseointegrasyona ait biyolojik mekanizmaların yani yeni kemik oluşumunun, adaptasyonunun ve tamirinin iyi bilinmesi oldukça önemlidir.

### 2.1.1. Osseointegrasyon Mekanizması

Osseointegrasyonun gelişimi, alveoler kemikle implant arasındaki kilitleme (primer implant stabilitesi) ve sonrasındaki kemik birikimi ve yeniden şekillenmesi aracılığıyla sağlanan biyolojik fiksasyonu (sekonder implant stabilitesini) içermektedir (Berglundh ve ark., 2003, Fini ve ark., 2004). Osseointegrasyonun oluşmasında doku iyileşmesi, tamir ve yeniden şekillenme safhaları birbirini izlemektedir (Carlsson ve

ark., 1986; Albrektsson ve Zarb, 1993, Rigo ve ark., 2004; Soballe ve ark., 1993; Soballe, 1993). Bu biyolojik olayların devamlılığı kemik-implant arayüzündeki kan hücrelerinden salınan büyüme ve farklılaşma faktörleri tarafından düzenlenmektedir (Davies, 1994).

İmplantasyondan sonraki konak cevabı implantın özellikleri, fiksasyon stabilitesi ve operasyon sırasında ortaya çıkan ısıya bağlı kemikte oluşan hasara göre değişiklik göstermektedir (Soballe ve ark., 1993; Soballe, 1993; Rigo ve ark., 2004; Fini ve ark., 2004). İmplantasyona bağlı kemik dokuda oluşan hasara ve histolojik olaylara karşı iskelet yapının cevabında etkili olan temel basamaklar, implantın yerleştirilmesi ve mekanik fiksasyonu sonrasında hematoma oluşumu, mezenkimal doku gelişimi, intramembranöz yolla oluşan örgü kemik oluşumu ve örgü kemiğin çıkıntıları üzerinde lameller kemik oluşumu şeklindedir (Davies, 1994).

Yapılan çalışmalarda, implant yerleştirilmesini takiben implant yüzeyi ile kemik arasında mikroskobik düzeyde yaklaşık 60 µm boyutunda bir boşluk olduğu tespit edilmiştir (Huikes ve ark., 1997; Futami ve ark., 2000; Colnot ve ark., 2007). Ancak uygulanan cerrahi prosedüre göre bu aralığın kemiğin maruz kaldığı yaralanmaya bağlı olarak 100-500 µm'ye kadar ulaşabildiği gözlemlenmiştir (Eriksson ve ark., 1984).

İmplant ve kemik arasındaki bu boşluk operasyondan hemen sonra kanla dolmakta ve damarlardan açığa çıkan kan hemoraji, pıhtı veya hematoma oluşumuna neden olmaktadır. Pıhtıyı takiben prostoglandin, serotonin, bradikinin gibi sitokinler salınmaya başlamaktadır. Sitokinlerin vazodilatasyona neden olması ile ortama trombositler, polimorfonükleer lökositler, lenfositler ve makrofajlar gibi fagositik hücreler gelmektedir. Bu dönem cerrahiyi takiben 1. ve 3. günler arasında yoğun bir şekilde devam etmektedir (Carlsson ve ark., 1986; Albrektsson ve Zarb, 1993; Davies, 1994).

Trombositler erken dönem iyileşmede en önemli hücrelerdir. Trombositlerde yabancı bir yüzeye cevaben fosfotirozin indüksiyonu, hücre içi kalsiyum artışı ve fosfolipidlerin hidrolizi gibi hücre içi biyokimyasal farklılaşmalar ve adezyon, yayılım ve agregasyonu da kapsayan morfolojik ve biyokimyasal değişiklikler

gerçekleşmektedir (Berglundh ve ark., 2003; Fini ve ark., 2004; Meyer ve ark., 2004). Trombositlerin aktivasyonu sonucunda, granül içerikleri hücre dışı ortama salınmaktadır. Bunun sonucunda trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF) ve transforme edici büyüme faktör-beta (TGF- $\beta$ ) gibi çok sayıda büyüme faktörünün yanı sıra histamin ve seratonin gibi vazoaaktif faktörlerin de ortamda bulunması sağlanmaktadır. Bu faktörler pek çok hücrenin proliferasyon ve migrasyonunu teşvik ederek yara iyileşme sürecinin düzenlenmesinde önemli rol oynamaktadır (Matsuo ve ark., 1999).

Trombosit degranülasyonundan sonra bölgeye vazokonstriksiyon sağlayan araşidonik asit metabolitleri salınmaktadır. Damarlardan dışarı sızan kan içerisindeki faktör VII ve faktör III, faktör V ile birlikte protrombinin trombine dönüşmesini sağlayarak fibrinojenden fibrinopeptitleri oluşturmaktadır. Böylece fibrin pıhtısı oluşmaktadır (Matsuo ve ark., 1999).

Kemik kavitesinde dolaşımın bozulması sonucunda lokal iskemi gelişmektedir ve kapillerden uzakta kalan osteositlerde oksijen eksikliği sebebiyle nekroz meydana gelmektedir. Lökositler ise hem nekroz olan osteositlerin hem de fibrin pıhtısının yıkımı için bölgeye gelerek fagositozu başlatmaktadır. İlk 24-48 saat boyunca nötrofiller ortamda yoğunken daha sonra makrofajlar ortama hakim olarak fagositik süreci devam ettirmektedir ve peri-implant bölgede iyileşme için gereken anjiyogenezin gelişimi sağlanmaktadır (Matsuo ve ark., 1999).

Yara bölgesinin merkezine doğru azalan oksijen konsantrasyonu, endotelial ve mezenkimal hücreler için kemotaktik uyarım sağlamaktadır. Anjiyogenez büyük oranda postkapiller venüllerden başlamaktadır, endotel hücreleri subendotelial bazal membranı parçalayarak içi boş kapiller tomurcuklar oluşturmak için göç etmekte ve proliferasyon olmaktadır (Matsuo ve ark., 1999).

Yara iyileşmesinde bağ dokusu hücrelerinin göçü yara kontraksiyonuyla orantılıdır ve kontraksiyon genellikle yaralanmadan sonraki 5. günde başlamaktadır. Yara kontraksiyonundan fibroblastların göçü sorumlu tutulmaktadır. Oluşan bu kontraksiyon, implant çevresindeki kemik bölgesindeki geçici fibrin matriksinin (fibrin

iskelesinin) implant yüzeyinden uzaklaşmasına neden olabilir. Fibrin matriks, osteojenik hücrelerin göçü ve osteoindüksiyon için iyileşme bölgesinde bir iskelet görevi görmektedir. Osteojenik hücreler osteoid dokuyu oluşturmaktadır. 0,5 mm kalınlığındaki bu zayıf mineralize osteoid tabaka kalsiyum, fosfor, osteopontin ve kemik sialoproteininden zengindir. Çoğunlukla implant yüzeyi ile doğrudan temastaki yeni trabeküler kemik lameller kemiğe remodele olmaktadır (osseointegrasyon) (Murai ve ark., 1996; Davies, 1998; Berglundh ve ark., 2003; Meyer ve ark., 2004). Bu nedenle implant yüzey özellikleri, oluşan fibrinin kontraksiyon sonucunda yüzeyde tutunabilmesi ve göç eden osteojenik hücrelerin de implanta adezyonu açısından son derece önemlidir (Jokstad, 2009).

Erken dönem kemik oluşumu 5-7. günlerde izlenmektedir (Berglundh ve ark., 2003; Colnot ve ark., 2007). Kontakt osseogenezi, farklılaşan osteojenik hücrelerin implant yüzeyine göçü, farklılaşması ve bölgede yeni kemik oluşturmasıyla sağlanmaktadır (Jokstad, 2009). Bu aşamada fibröz doku ve fagositleri içeren prokallus oluşmakta ve ardından prokallus, trombositlerden salgılanan PDGF ve makrofaj kaynaklı büyüme faktörü (MDGF) sayesinde osteoblast ve fibroblastlara dönüşerek, yoğun bağ doku ve mezenkimal hücrelerden oluşan bir yapı halini almaktadır. Konnektif doku, implant yüzeyindeki osteoblastları da içeren kallus olarak adlandırılmaktadır ve bu yeni kemik dokusudur. Osteoblastlar tarafından oluşturulan osteogenetik lifler, yeni kemik yapıyı kalsifiye ederek implant-kemik arayüzündeki yapının fibrokartilagenöz kemik dokusu halini almasını sağlamaktadır (Carlsson ve ark., 1986; Albrektsson ve Zarb, 1993). Yedinci günden itibaren ise bölgede örgü kemik oluşumu gözlenmektedir (Berglundh ve ark., 2003). Erken peri-implant trabeküler kemik oluşumu ise cerrahiden sonraki 10. ve 14. günler arasında başlamaktadır (Franchi ve ark., 2005). Sonrasında, örgü kemik devamlı olarak remodele olarak yerini yüksek derecede mineralizasyona ulaşabilen lameller kemiğe bırakmaktadır. Yeni oluşan bu trabeküler kemik ağı, implantın biyolojik fiksasyonunu sağlamaktadır ve mezenkimal hücreler ile geniş kan damarları içeren ilik boşluklarını çevrelemektedir (Gailit ve ark., 1994; Probst ve ark., 1997; Davies, 1998; Chappard ve ark., 1999; Rigo ve ark., 2004; Franchi ve ark., 2005). İmplantasyondan sonraki 3. ayda implant etrafında örgü ve

lameller kemik karışımı bir kemik dokusu görülebilir (Şekil 1) (Probst ve ark., 1997; Chappard ve ark., 1999; Rigo ve ark., 2004; Franchi ve ark., 2005). Peri-implant alanın tamamen kemikleşmesi ise 6 ile 8 hafta arasında gerçekleşmektedir (Carlsson ve ark., 1986; Albrektsson ve Zarb, 1993).

Peri-implant osseogenez bazı etkenlerden dolayı başarısızlığa uğrayabilmektedir. Buna sebep olabilecek temel faktörler; osteojenik hücrelerin sayısının/aktivitesinin azalması ve osteoklastik aktivitenin artması, kemik oluşumu ve yeniden şekillenmesine etki eden anabolik ve katabolik faktörlerin dengesizliği, anormal hücre proliferasyon oranları, sistemik ve lokal uyarım ve mekanik strese cevap ve peri-implant dokuların bozulmuş damarlanmasıdır (Marco ve ark., 2005).

Osseointegrasyon için damarlanma kritik öneme sahiptir; çünkü osteojenik hücrelerin farklılaşması açık bir şekilde doku damarlanmasına bağlıdır. Hücre farklılaşmasının yanısıra kemikleşme süreci de farklılaşan dokuların yeniden damarlanması ile yakından ilişkilidir (Marco ve ark., 2005).

## **2.2. Kemik Doku**

İnsan vücudunun en sert dokularından biri olan kemik doku, yapısı ve içeriği yaşa, bulunduğu lokalizasyona ve mekanik özelliklerine bağlı değişiklikler gösterebilen bir yapıdır (Jungueria ve ark., 1995; Schenk, 2003). Sağlam bir destek dokusu olmasının yanı sıra, mineral dengesinin düzenleyicisi ve kan hücreleri rezervuarı olarak da görev almaktadır (Schenk, 2003).

Kemik dört mikroyapısal bileşenden meydana gelmektedir. Bunlar (Hollinger ve ark., 1999);

- ✓ Hücreler
- ✓ Organik matriks
- ✓ İnorganik matriks
- ✓ Çözünebilen sinyal faktörleridir.

Bu mikroyapısal bileşenler iki farklı mikroyapıya dönüşmektedir;

- ✓ Kortikal kemik
- ✓ Kansellöz kemik

### **2.2.1. Kemik Dokunun Mikroyapısal Bileşenleri**

Kemik yapının oluşmasında, rezorpsiyonunda ve yapının devamlılığının korunmasında farklı hücreler görev almaktadır. Kemikte her biri ayrı fonksiyona sahip iki farklı hücre türü vardır. Bunlar, osteojenik hücreler ve osteoklastlardır (Langer ve Vacanti, 1993). Osteojenik hücreler, kemiğin oluşmasından ve devamlılığının korunmasından sorumlu olan osteoprogenitörler, preosteoblastlar, osteoblastlar, osteositler ve kemik yüzeyini döşeyen hücrelerden oluşmaktadır (Garant, 2003).

#### **2.2.1.1. Osteojenik Hücreler**

##### **a. Osteoprogenitör Hücreler**

Osteoblast öncülü hücrelere osteoprogenitör hücreler adı verilir. Bu hücreler çoğunlukla kemik iliğinde endosteumda, periosteumda ve kemiğin kılcal damar duvarında yassı hücreler şeklinde yer almaktadır (Rubin ve Farber, 1988; Korkusuz ve ark., 2011). Mitoz yeteneğine sahip olan bu hücreler, olgun kemik hücrelerine farklılaşma kapasitesine sahiptir (Garant, 2003). Kemik morfojenik proteinlerin varlığında bu hücreler osteoblastlara dönüşmektedir (Korkusuz ve ark., 2011).

##### **b. Osteoblastlar**

Mezenkimal hücre soyundan gelişen osteoblastlar, kübik veya poligonal şekile sahip, osteoid sentezleyen kutuplaşmış hücrelerdir. Bu hücreler tip I kollajen, osteokalsin, osteonektin, trombospondin, kemik sialoproteini (BSP 1-2), osteopontin, alkalin fosfataz ve kemik morfojenik proteinleri salgılamaktadır. Bu proteinler vasıtasıyla hücreler arası ağı mineralizasyonu düzenlenmektedirler (Langer ve Vacanti, 1993; Korkusuz ve ark., 2011). Alkalin fosfataz; osteoblast membranına yerleşik bir protein olup, osteoblast aktivasyonunda dolaşıma salınır. Kemik oluşumunu değerlendirmede iyi bir belirteçtir. Osteokalsin ise; osteoblastlar tarafından sentezlenen bir matriks proteindir ve kemikte en bol bulunan nonkollajenöz protein olup, kemiğe



oldukça spesifikdir (Kutlu, 2006). Kemik hücreleri ve prekürsörlerinin artışı, büyüme faktörleri ile etkileşimleri ile yakından ilişkilidir (Langer ve Vacanti, 1993).

Farklılaşmamış mezenkimal hücrelerden osteoblast gelişimi, kararlı osteoprogenitör hücrelerden ve indüklenebilen osteoprogenitör hücrelerden olmak üzere iki farklı yol ile gerçekleşir. Kararlı hücreler hücre yoğunlaşmasından ve embriyonel dönemdeki kemik yapımından sorumlu iken, iyileşme sürecinden ise indüklenebilen osteoprogenitör hücreler sorumludur (Bruder ve Caplan, 1989).

Cerrahi müdahale veya travma sonrasında kemik yaralandığında lokal hücreler kemiğin formunu ve fonksiyonunu korumaya çalışmaktadır (Marie, 1999). Lokal hücreler periost, endost ve dura içindeki kararlı osteoprogenitör hücreler ve perisit gibi indüklenebilen hücrelerdir. Kapiller duvarlarındaki perisitler travma sonrasında endojen kemik morfogenetik proteinleri (BMP) ile reaksiyona girerek osteoblastlara dönüşebilmektedir (Ozaki, 2000).

Osteoblastların aktif yaşam ömrü 1-10 hafta arasındadır; bazıları kemik yüzeyini döşeyen hücrelere, %15 lik bir kısmı da osteosite dönüşür. Bu dönüşümün nasıl olduğu belirgin değildir (Puzas ve Lewis, 1999).

### **c. Osteositler**

Osteositler matriksin laküna adı verilen boşluklarında yer alan ve kabaca kemik dokuyu idame ettiren hücrelerdir. Olgunlaşmış iskelettteki hücrelerin %90'ını oluşturmaktadırlar (Gartner ve Hiatt, 1997; Hollinger ve ark., 1999; Marie, 1999).

Kemik trabeküllerinin yüzeyinde yer alan osteoblastlar osteoid sentezlemektedir. Sentezlenen osteoid ise kalsifikasyona uğrayarak hidroksiapatit kristallerini oluşturmaktadır. Bu süreç sırasında bazı osteoblastlar kemik içinde kalarak osteositlere dönüşmektedir (Buckwalter ve ark., 1995).

Osteosite dönüşen osteoblastların sayısı kemik oluşum hızına bağlıdır. Oluşum hızı arttıkça osteoid içinde kalan osteosit sayısı da artmaktadır. Kemik canlılığı ve iç denge için çok kritik olan osteositler, metabolik açıdan osteoblastlara oranla inaktif

hücrelerdir (Bernard, 1991). Oluşumlarının ardından osteositler yavaş yavaş matriks üretme yeteneklerini kaybetmekte ve boyut olarak küçülmektedir. Zaman içinde çevrelerindeki matriksi rezorbe ederek osteositik lakünleri oluşturmaktadırlar (Hollinger, 1999).

Osteositlerin yaşam ömrü birkaç yıldır. Osteositler son üründür ve yenilenememektedirler. Popülasyonun devamı osteoblast prekürsör hücrelerinin diferansiyasyonu sonucu olmaktadır (Junguiera ve ark., 1998).

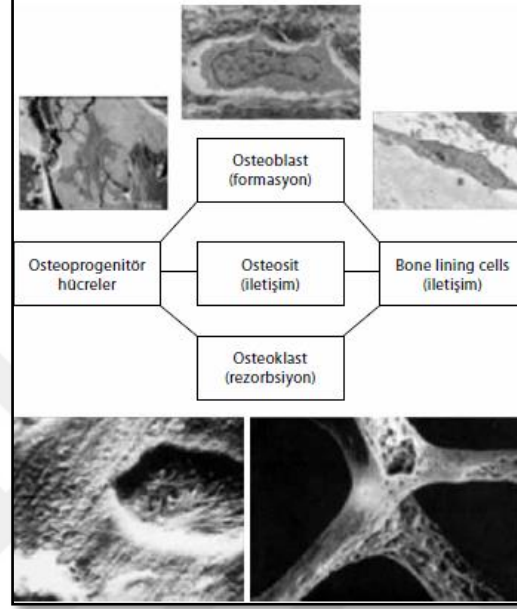
### **2.2.1.2. Osteoklastlar**

Kemik iliğinde bulunan granülosit-makrofaj prekürsörleri dolaşıma monosit olarak katılmakta ve bazı senkronize olmayan füzyonlar sonucu osteoklast olarak bilinen dev hücrelere dönüşmektedir. Bu hücreler, makrofajlardan farklı olarak kalsitonin reseptörleri taşımaktadır ve asit fosfataz üretmektedirler (Junguiera ve ark., 1998). Kemikte işlev gören bu hücreler yıkımdan sorumludur (Korkusuz ve ark., 2011).

İnterlökin-1, -3, -6 ve -11 (IL-1, -3, -6, -11), tümör nekroze edici faktör alfa (TNF- $\alpha$ ) ile birlikte TGF- $\alpha$  osteoklast gelişiminde önemli rol oynamaktadır. Tam olarak hangisinin veya hangilerinin daha etkin olduğu bilinmemekle birlikte, IL-11'in burada temel faktör olduğu düşünülmektedir (Gorski, 1998). Çözünebilen sinyal faktörleri ile osteoblast ve osteoklast formasyonu arasında bir etkileşim olduğuna dair kanıtlar vardır. 1,25-dehidroksivitamin D3 osteoblastlara bağlanarak progenitör hücreleri üzerinde etkili osteoklast diferansiyasyon faktör salınımına neden olmaktadır. Bu sebeple osteoblastik hücreler osteoklast formasyonu ve oluşumu için kofaktör yaratan bir kaynak olarak düşünülmektedir (Ballı, 2004).

Özetle kemik yıkımından osteoklastlar, yapımından osteoblastlar ve hücrelerarası iletişimden de osteositler sorumludur. Osteositler sitoplazmaları vasıtasıyla birbirleriyle ve süngerimsi kemikteki endosteal ve periostun kambiyum tabakasındaki yüzeyel osteojenik hücrelerle iletişim içerisindedir (Şekil 2.2). Kemikte oluşan yaralanma bu hücrelerce algılandıktan sonra önce osteoklastlar ardından da osteoblastlar uyarılmaktadır ve yeniden yapım döngüsü başlamaktadır (Langer ve Vacanti, 1993;

Atik ve ark., 2006; Korkusuz ve ark., 2011). Bu üç hücre kalsiyum regülasyonunda, kemik hemostazında, şekillenme ve yeniden şekillenme aşamalarında yönetici rol oynamaktadır (Puzas ve Lewis, 1999).



Şekil 2.2: Kemik hücreleri ve hücreler arası ilişki (Korkusuz ve ark., 2011).

### 2.3. Osseointegrasyonu Etkileyen Faktörler

Osseointegrasyon sağlayan faktörler implantın yerleştirildiği kemik ve implantın özellikleriyle ilişkilendirilirken, osseointegrasyonun sürdürülmesi ise protetik yükleme protokolleri ve konakla ilişkili faktörlere bağlıdır. Bu faktörler osseointegrasyonu inhibe edebilir veya arttırabilir (Hobo ve ark., 1991; Tolstunov, 2006; Öncü, 2013).

Osseointegrasyonu arttıran faktörler;

- ✓ İmplant dizaynı ve kimyasal kompozisyonu,
- ✓ İmplant yüzey topografisi,
- ✓ İmplant materyali, şekli, uzunluğu, çapı, yüzey işlemesi ve kaplaması (Marco ve ark., 2005),
- ✓ Konak kemik yatağının durumu ve intrinsik iyileşme potansiyeli (Linder ve ark., 1989),
- ✓ Mekanik stabilite ve implantın yükleme şartları (Soballe, 1993),

- ✓ İlave kemik greftleme tedavilerinin uygulanması,
- ✓ Osteojenik biyolojik kaplamalar ve biyofiziksel uyarım (Younger ve Chapman, 1989; Arrington ve ark., 1996; Khan ve ark., 2005) gibi ek uygulamaların kullanılması,
- ✓ Simvastatin ve bifosfonatlar gibi farmakolojik ajanlardır (Eberhardt ve ark., 2007; Basarir ve ark., 2007).

Osseointegrasyonu inhibe eden faktörler ise;

- ✓ Aşırı implant mobilitesi ve mikro-hareketlilik (Pilliar ve ark., 1986; Giori ve ark., 1995),
- ✓ Pöröz kaplanmış implantlarda uygun olmayan pörözite (Otsuki ve ark., 2006),
- ✓ Radyasyon terapisi (Sumner ve ark., 1990; Kudo ve ark., 2001)
- ✓ Siklosporin A, metotreksat ve cis-platinum gibi farmakolojik ajanların (McDonald ve ark., 1998; Eder ve ark., 1999; Sakakura ve ark., 2007), varfarin ve düşük molekül ağırlıklı heparinlerin (Callahan ve ark., 1995), non-steroidal anti-inflamatuvar ilaçların (özellikle COX-2 selektif inhibitörlerinin) kullanımı (Dahners ve Mullis, 2004; Pablos ve ark., 2008)
- ✓ Osteoporöz, romatoid artrit, artmış yaş, beslenme eksikliği, sigara kullanımı ve böbrek yetmezliği (Rosenqvist ve ark., 1986; Wong ve ark., 1994; Zhang ve ark., 2004; Mombelli ve Cionca, 2006) gibi faktörlerdir.

### **2.3.1. Osseointegrasyonu Etkileyen Implanta Bağlı Faktörler**

#### **2.3.1.1. Biyouyumluluk**

Osseointegrasyon yalnızca kemiğin iyileşme kapasitesine bağlı değildir, dental implantın yapıldığı materyal ve bu materyalin çevreleyen dokularda oluşturduğu tepki de önemlidir. Klinik başarının sağlanması için implant materyalinin sahip olması gereken en önemli özellik ise hücreler ve çevre dokularda toksik etki yaratmaması, çözünerek hastaya sistemik zarar vermemesi yani biyouyumlu olmasıdır (Öncü, 2013).

Materyalin biyouyumluluğu, stabil bir kemik-implant teması kurmak ve arayüzde fibröz doku oluşmaması için osseointegrasyonun öngörülebilirliğini sağlamak açısından

en önemli faktördür (Anselme, 2000). İmplant materyali olarak sıklıkla kullanılan titanyumun biyolojik açıdan yüksek biyouyum, korozyona karşı artmış direnç, makrofaj ve fibroblastlar üzerine azalmış toksisite ve peri-implant dokularda azalmış immün cevap gibi avantajları bulunmaktadır (Breme ve ark., 1988; Browne ve Gregson, 2000).

### **2.3.1.2. Dental İmplant Materyalleri**

Diş eksikliklerinin restorasyonu için farklı tipteki implantların kullanımı düşüncesi, 20. yy'ın başlarında ortaya çıkmış ve günümüz teknolojisinin gelişimine bağlı olarak kullanılan implant materyallerindeki çeşitlilik artmaya başlamıştır (Kenneth ve Phillips, 2003; Özyazgan ve Çetinkaya, 2013).

Dental implantlarda uzun dönem başarılı sonuçlar sağlanması için implantlarda kullanılan materyallerin iyi bilinmesi ve osseointegrasyondaki etkisinin tanımlanması gerekmektedir (Hakkı ve Ertuğrul, 2009). Çünkü, implantların yerleştirildiği kemiğin fizyolojik ve morfolojik durumunun, kullanılan materyallerin biyolojik özelliklerinin osseointegrasyonun sağlanmasında ve başarılı tedavilerin gerçekleştirilmesinde oldukça önemli olduğu düşünülmektedir (Hobo ve ark., 1990; Duymuş ve Güngör, 2013).

Dental implant materyali olarak geçmişten günümüze kadar kullanılan materyaller genel olarak şu şekilde sınıflandırılabilir (Duymuş ve Güngör, 2013):

1. Metaller ve metal alaşımları
  - a. Paslanmaz çelik (Fe-Cr-Ni)
  - b. Krom-kobalt-molibden (Cr-Co-Mo)
  - c. Tantalyum ve niyobyum
  - d. Titanyum ve titanyum bazlı materyaller
2. Seramikler
  - a. Bioaktif seramikler
  - b. Bioinert seramikler
  - c. Zirkonyum
3. Karbonlar
  - a. Polikristalin camsı karbon
  - b. Karbon-silikon

4. Polimer esaslı maddeler
  - a. Polimetilmetakrilat
  - b. Politetrafluor etilen
  - c. Polietilen
  - d. Silikon lastik
  - e. Polisülfon

Kısacası dental implantolojide genellikle alloplastik materyallerden faydalanılmaktadır ve günümüzde ideale en yakın alloplastik materyalin metal orijinli olduğu kabul edilmektedir. Bu düşünce ile metal alaşımları içinde kabul edilebilir özelliklerinden dolayı ilk olarak paslanmaz çelik, krom-kobalt alaşımları, altın, palladyum, platin, tantalyum ve bu metallerin alaşımları implant materyali olarak kullanılmıştır (Duymuş ve Güngör, 2013). Titanyum ve titanyum alaşımları ise günümüzde implantların yapımında en sık kullanılan metal orjinli materyallerdir (Ökte, 1991; Şenel ve ark., 2010; Özkan, 2011; Duymuş ve Güngör, 2012).

Titanyum, reaktif bir metaldir ve saf olarak elde edilmesi zordur (Craig ve Powers, 2000; Duymuş ve Güngör, 2013).

Saf titanyum;

- Manyetik değildir ve kemik dokuyla termik açıdan uyumludur.
- Doku içinde inert bir materyaldir. Dokuyla temas eden oksit tabakası kesinlikle bozunmaz. Bu sebeple organik moleküllerle reaksiyona giren herhangi bir iyon metalden ayrışmaz.
- Mekanik direncinin kortikal kemik ve dentinden fazla olması mekanik açıdan yeterli kriterlerdir. Ayrıca toksik olmayışı ve kolay şekillenebilir olması tercih edilmesini sağlayan özelliklerdendir.
- Reaktif bir materyaldir. Hava, su ve benzeri elektrolit ortamlarda metalin yüzeyinde kendiliğinden bir oksit tabakası oluşur. Oluşan bu oksit tabakası, implant metalini vücut sıvılarından ve tüm kimyasal etkilerden koruyan bir bariyer görevi görür.

Oksijen içerikleri farklılık gösteren dört tip (grade) saf titanyum (cpTi) bulunmaktadır (Wang ve Fenton, 1996). Titanyumun tipine göre içeriğindeki karbon, nitrojen ve hidrojen oranları farklılık göstermemektedir. Bu nedenle, saf titanyum demir ve oksijen içeriğine göre dört ayrı tipe ayrılır. Tipler arasında en fazla oksijen içeren, %0,4'lük oksijen oranı ile Tip 4 titanyumdur (Wang ve Fenton, 1996; Duymuş ve Güngör, 2013).

Saf titanyumlar arasında en dayanıklı olan olması, mükemmel korozyon direnci göstermesi ve ayrıca üstün şekillendirilebilirliksergilemesi nedeniyle, Tip 4 (Grade 4) titanyumlar dental implantolojide en yoğun kullanıma sahip olan saf titanyum tipidir(Günay ve ark., 2013).

Saf titanyumun yanı sıra titanyum alaşımlarından Ti-6Al-4V titanyumun en sık kullanılan formudur (Özyazgan ve Çetinkaya, 2013). Yakın dönemlerde implantoloji uygulamalarında Grade 5 ya da Tip 5 (Ti-6Al-4V) olarak ifade edilen bu alaşımların, diğer titanyum alaşımları ve saf titanyum tipleri ile aynı derecede osseointegrasyon özelliği gösterdiği kabul edilmektedir ve günümüzde olumlu özellikleri dolayısıyla materyalin kliniksel kullanımında artış meydana gelmiştir (Göçer, 2010).

### **2.3.1.3. Yüzey Pürüzlülüğü**

Yüzey pürüzlülüğü üç sınıfa ayrılmaktadır:

- ✓ Makro (pürüzlülük > 10 µm),
- ✓ Mikro (pürüzlülük 1 - 10 µm) ve
- ✓ Nano (pürüzlülük < 1 µm).

Makropürüzlülük, büyük kum tanelerinin implant üzerine püskürtülmesi ile oluşmaktadır (Uzun ve Keyf, 2007). Makropürüzlülüğün implant yerleştirilmesi sonrasında mekanik kilitlemeyi sağladığı gösterilmiştir (Berglundh ve ark., 2003; Franchi ve ark., 2005). Makropürüzlü yüzeylerin tornalanmış yüzeylere göre daha yüksek kemik-implant teması (KİT) ve sökme torku göstermesi sekonder stabilitenin arttığını kanıtlamaktadır (Wennerberg ve ark., 1996).

Metal yüzeylerin modifikasyonuna çoğunlukla, doku-titanyum etkileşimlerini kontrol altında tutmak ve fiksasyon zamanını azaltmak amacıyla başvurulmuştur (Kokubo, 2005). İmplant yüzey mikrotopografisinin implant çevresi dokuların oluşumu üzerine etkisi, yüzey enerjisi ve distorsiyon gerinimi teorileriyle açıklanmaktadır (Bowers ve ark., 1992). Yüzeydeki tanecik boyutunun küçük olması yüzey gerilimini arttırmaktadır ve hücrelerin yüzeye tutunmasını kolaylaştırmaktadır. Daha az yüzey pürüzlülüğü hücrelerin yayılmasını kolaylaştırmaktadır ve implant yüzeyinin distorsiyon sinyalleri aracılığıyla hücre farklılaşmasını etkileyebilmektedir (Anselme ve Biggerelle, 2005).

Ancak bir implantın uygun olmayan yüzey pörözitesi aynı zamanda kemik büyümesini de inhibe edebilmektedir. Gereğinden dar por yapılarının, yetersiz damarlanmaya bağlı olarak por bölgesindeki doku farklılaşmasını inhibe ettiği gösterilmiştir (Otsuki ve ark., 2006).

In vitro olarak hazırlanmış titanyum implant materyalleri üzerindeki sıçan hücre kültürlerinde, farklı yüzey mikrotopografilerinin kemik hücresi farklılaşması ve mineralizasyonunu düzenlediği bulunmuştur (Boyan ve ark., 2002). Pürüzlülüğe bağlı osteoblast proliferasyonu, farklılaşması ve lokal faktörlerin üretimi, integrin reseptörlerinin aktivasyonu ile ilişkilidir (Boyan ve ark., 1999). Pürüzlü yüzeyler, trombosit ve monositlerin adezyonu sayesinde osseointegrasyonu desteklemektedir (Park ve Davies, 2000).

Osteoblast adezyonunun artması ve sonrasında proliferasyon, farklılaşma (Fini ve ark., 2003), kemik ile ilişkili implant alanının genişlemesi (Cochran ve ark., 1996) sayesinde primer stabilizasyon artmaktadır (Franchi ve ark., 2004). Genellikle, ortalama pürüzlü yüzeyler peri-implant kemik büyümesini daha düz veya daha pürüzlü yüzeylerden fazla desteklemektedir (Albrektsson ve Wennerberg, 2004).

#### **2.3.1.4. Yüzey Özellikleri**

Osseointegrasyonun sağlanmasında kullanılan cerrahi teknik, implant materyali ve tasarımı yanı sıra yüzey özelliklerinin de yani mikroskobik düzeydeki yüzey



topografisinin de önemli bir işlevi olduğu düşünülmektedir. Çünkü kullanılan implantın yüzey özelliklerine göre kemik dokunun cevabı da farklı olmaktadır (Buser ve ark., 1997).

İdeal implant materyalinin kemik iyileşme mekanizmasını engellemeyecek bir yüzeye sahip olması gerekmektedir. Hatta bu yüzeyin kemik kalite ve kantitesine ayrıca anatomik bölgeye bakılmaksızın iyileşmeyi arttırıcı etkisinin bulunması gerektiği birçok araştırmacı tarafından ifade edilmektedir (Brunski ve ark., 2000).

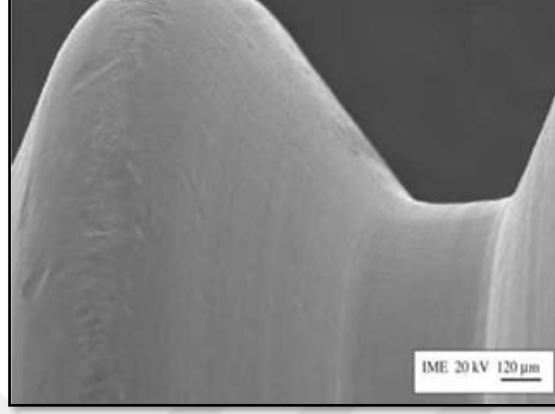
İdeal implant yüzeyini sağlamaya yönelik olarak geliştirilen implantlar, yüzey özelliklerine göre şu şekilde sınıflandırılmaktadır;

1. İşlenmemiş yüzeyli implantlar (Makinelenmiş)
2. İşlenmiş yüzeyli implantlar
  - a. Parlatılmış yüzeyli
  - b. Kumlanarak pürüzlendirilmiş
  - c. Asitle pürüzlendirilmiş
  - d. Kumlanarak ve asitle pürüzlendirilmiş
  - e. Lazerle pürüzlendirilmiş
  - f. Pöröz yüzeyli ve pöröz sinterlenmiş implantlar
3. Kaplanmış yüzeyli implantlar
  - a. Plazma spreji kaplanmış yüzeyli implantlar
  - b. Seramik kaplanmış yüzeyli implantlar
    - \*Trikalsiyumfosfat kaplanmış (TCP)
    - \*Hidroksiapatit kaplanmış (HA)
4. Kombine implantlar.

#### **2.3.1.4.1. İşlenmemiş Yüzeyli İmplantlar (Makinelenmiş)**

İmplant yüzeyinin makine ile frezlenmesi ile oluşturulan yüzeylerdir (Elias ve ark., 2008). İmplantolojide düzgün (makineleneşmiş) yüzeyli titanyum implantları ilk olarak Branemark kullanmıştır (Branemark ve ark., 1969). Makinelenme sonucunda ortaya çıkan heterojen topografya kemik hücrelerini etkilemektedir ve osseointegrasyon mekanizmasının hızını azaltmaktadır. Derin oluklar, hücrelerin tek yönlü büyüme

eğilim göstermesine neden olmaktadır. Hücre büyümesi sırasında hücrelerin büyük ölçüde olukların yönünü takip ettiği saptanmıştır (Elias ve ark., 2008).



**Şekil 2.3:** Makinelenmiş implant yüzeyinin SEM görüntüsü (Elias ve ark., 2008).

Makineyle işlenmiş düzlemlerde fibroblastlar düzlem şeklini almakta ve makine izleri boyunca büyüme çizgileri izlenmektedir. 0,5 µm derinlik ve 4,9-220 µm genişliğinde oluk izleri vardır ve hücreler bu kanallar boyunca büyümektedir. Bu davranış homojen yüzey pürüzlülüğü olan yüzeylerden farklıdır, çünkü homojen yüzeylerde hücreler her yöne büyümektedir. Bu nedenle makinelenmiş yüzeyler daha uzun bir iyileşme süresi gerektirmektedir (Elias ve ark., 2008).

Günümüzde osseointegrasyonu hızlandırarak iyileşme süresini kısaltmak ve düşük kemik kalitesine sahip anatomik alanlarda da implant kullanımı sağlamak amacıyla implantların yüzey özellikleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Geliştirilen yeni yüzey özellikleri ile daha başarılı sonuçlar elde edilmeye başlandıkça, günümüzde bu implantların kullanımı sınırlandırılmıştır (Özyazgan ve Çetinkaya, 2013).

#### **2.3.1.4.2. İşlenmiş Yüzeyle İmplantlar**

Albrektsson ve Wennerberg (2004) yüzey pürüzlülüğünü sınıflandırıp, Ra değeri; 0,5 µm'den az olan implantları parlak yüzeyle, 0,5-1 µm arasında olanları az pürüzlü ve 1-2 µm arasında olanları orta pürüzlü, >2 µm olanları ise pürüzlü olarak tanımlamışlardır.

Yüzeylerin pürüzlendirilmesi için implantolojide başlıca iki yöntem kullanılmaktadır. Bunlar; aşındırma ve ekleme yöntemleridir. Aşındırma tekniğinde, uygulanan basınç ile yüzeyde oluşan madde kaybı sonucunda pürüzlülük oluşturulmaktadır. Bu teknikte kullanılan en yaygın metotlar; kumlama ve asitleme metotlarıdır. Ekleme tekniğinde ise, yüzeylere dışarıdan madde ilavesi ile pürüzlülük sağlanmaktadır. Günümüzde kullanılan en yaygın ekleme metodu da implant yüzeylerinin değişik materyallerle kaplanmasıdır (Wennerberg ve ark., 1993).

İşlenmiş yüzeyli implantlar üretilirken yüzey hazırlığı için hangi metot tercih edilecek olursa olsun yapılan çalışmalarda, ideal kemik-implant teması ve kemik retansiyonunun sağlanması için optimum pürüzlülüğün Ra 1-1,5 µm olması gerektiği bildirilmiştir (Wennerberg ve ark., 1993).

#### **a. Parlatılmış Yüzeyli İmplantlar**

Ortalama yüzey pürüzlülüğü 1 µm'den az olan implantlar cilalı yüzeyli (parlatılmış yüzeyli) implantlar olarak tanımlanmaktadır (Wennerberg ve ark., 1993).

Bu tip implantlar, hem yumuşak hem de sert doku ile zayıf ilişki sergilemektedir; bu nedenle tercih edilmemektedir. Çünkü parlatılmış yüzeyli implantlar mekanik kuvvetlere karşı direnç gösterememektedir. Ayrıca dişeti epitelinin apikale doğru hareketine izin verdiklerinden dolayı derin periodontal ceplerin oluşmasına da ortam hazırlayabilmektedir (Wennerberg ve ark., 1993).

#### **b. Kumlanarak Pürüzlendirilmiş İmplantlar**

Farklı boyutlardaki partiküllerin implant yüzeyine yüksek süratle püskürtülmesi ile yapılan kumlama işlemi yaygın olarak uygulanan bir yüzey pürüzlendirme işlemidir. Bu teknikte alüminyum oksit ( $Al_2O_3$ ) veya titanyum oksit ( $TiO_2$ ) partikülleri püskürtülerek implant yüzeyi pürüzlendirilmektedir (Duymuş ve Güngör, 2013).

Yapılan birçok araştırmada kumlanarak pürüzlendirilmiş implantlarda, pürüzlülüğün uygun seviyelerde olduğu durumlarda kemik-implant temasının çok daha iyi olduğu, kemik hücrelerinin yüzeye tutunma açısından biyolojik cevabının çok daha

uygun olduğu ve de implantlara ait tork değerlerinin çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Gotfredsen ve ark., 1992; Wennerberg ve ark., 1993; Mustafa ve ark., 2000).

### **c. Asitle Pürüzlendirilmiş İmplantlar**

Bu yöntemde implantın asit solüsyonuna daldırılması sonucunda yüzeyinin erozyona uğratılması ile kimyasal pürüzlendirme işlemi yapılmaktadır. Kullanılan asidin tipi, implantın asit solüsyonunda kaldığı süre, sıcaklık ve asidin konsantrasyonu asitleme metodunda pürüzlülüğü etkileyen faktörlerdir (Duymuş ve Güngör, 2013).

Asitleme metodu ile implant yüzeyinde oluşabilecek kontaminasyon nlenmiş olur, yüzeyin homojen olmayan durumu ortadan kalkar ve implantın mekanik direncini azaltabilecek ana materyal kaybı da nlenmiş olur (Duymuş ve Güngör, 2013).

### **d. Kumlanmış ve Asitle Pürüzlendirilmiş İmplantlar**

Günümüzde przli yüzeyler arasında en çok dikkat çeken yüzeylerdir ve bu yüzeylerle ilgili araştırmalar sürmektedir (Uzun ve Keyf, 2007).

Yüzey przlendirilme işlemi SLA (sand-blasted, large-grid, acid-etch) olarak da bilinen ve kumlamayı takiben sıcak asit banyosunu içeren yöntemdir (Uzun ve Keyf, 2007; zyazgan ve etinkaya, 2013).

SLA yüzey, kaplama bir yüzey değildir. Esasen büyük kum tanelerinin implant üzerine püskürtülmesi ile makroprzllk oluşturulmasının ardından; hidroflorik, nitrik, sülfirik asit ya da farklı asit solüsyonlarının kombinasyonlarının yüzeye uygulanması ile 2-4 m boyutunda mikroprzllk oluşturulması ile elde edilen yüzeyi tanımlamaktadır (Uzun ve Keyf, 2007; Kılınç ve Erkmen, 2011; zyazgan ve etinkaya, 2013). Kısacası SLA implant yüzeyleri, orta derece przli yüzeylerdir ve pürüzlülük dereceleri implant yüzeyi boyunca aynıdır (Uzun ve Keyf, 2007; zyazgan ve etinkaya, 2013).

SLA yüzeyli implantlar ile elde edilen klinik başarılar dikkat çekicidir (zyazgan ve etinkaya, 2013). Örneğin Li ve arkadaşlarının (2002), SLA yüzeylerle sadece asit

uygulanmış yüzeylerin osseointegrasyonunu biyomekanik olarak kıyasladıkları çalışmalarında araştırmacılar, SLA yüzeylerin tork direncini daha yüksek bulmuşlardır.

Bu metodun bir diğer avantajı ise; yüzey topografisinde elektrokimyasal farklılıklar sonucu oluşan ve selektif uzaklaştırmaya bağlı olarak elde edilen total yüzey artışıdır (Kılınç ve Erkmen, 2011). Bu anlamda farelerde yapılmış deneysel bir çalışmada, kumlanmış-asitlenmiş implantların kemik-implant temasının, cilalı yüzey implantlara göre istatistiksel olarak daha yüksek olduğu görülmüştür (Marinho ve ark., 2003). Ayrıca, Cochran ve arkadaşları (2002) da yaptıkları çalışma sonucunda, artmış yüzey alanı ve iyi osteointegrasyon oluşturmaları dolayısıyla, kumlanmış-asitlenmiş implantlarda daha az koronal kemik kaybına rastladıklarını belirtmişlerdir.

Günümüzde dental implant uygulamaları giderek yaygınlaşırken, oldukça başarılı sonuçlar sergileyen bu yüzey tekniğinin daha da geliştirilmesi ile birtakım yeni özel implant yüzeyleri tasarlanmaya başlanmıştır.

### **SLActive Yüzeyle (Hidrofilik) İmplantlar**

İmplant materyalinin seçimine ek olarak yüzey topografisinin ve kimyasının, implant başarısının belirlenmesinde önemli olduğu artık kanıtlanmıştır (Grandin ve ark., 2012). Ayrıca yapılan yüzey işlemleri sonrasında elde edilen yüzey enerjisinin, hücrelerin implant yüzeyi üzerindeki biyolojik etkinliğini değiştirebildiği in vitro olarak gösterilmiştir. Günümüzde özellikle bu anlamda geliştirilen hidrofilik yüzeyle implantlar, SLActive® yüzey işlemi olarak (Institut Straumann AG, Basel, İsviçre) adlandırılan; SLA yüzey işlemine ilaveten hidrofilize edici bir teknik ile yüzey enerjisinin artırılması yöntemi ile geliştirilmiştir (Rupp ve ark, 2006).

Bu yöntem, titanyum (Ti) yüzeyini koruyarak yüzeyin kirlenmesinin engellenmesi ve yüzeyin ıslanabilirliğinin iyileştirilebilmesi düşüncesi ile nitrojen altında mikropürüzlü yüzeylerin temizlenmesini takiben materyalin tuzlu su çözeltisi içerisinde saklanması içermektedir (Grandin ve ark., 2012) ve bu mantıkla geliştirilen hidrofilik yüzeylerin kemik hücrelerinin olgunlaşmasını ve farklılaşmasını etkileyerek osteojenik özellik sergileyebildiği belirtilmiştir (Zhao ve ark., 2005; Sista ve ark., 2011).

Araştırmacılar ayrıca, ıslanabilirliği artmış bir implant yüzeyinin (hidrofilik yüzey) konak doku hücrelerinin proteinleri tarafından daha fazla suya benzer kabul edileceğini, dolayısı ile bu proteinlerin normal hallerini koruyabileceklerini de ileri sürmüşlerdir (Bornstein ve ark., 2009; Duymuş ve Güngör, 2013).

Hidrofilik yüzeylerin üretiminde önemli bir özellik de titanyumun oksijenle temasının engellenmesidir. Hidrofilik yüzeyler elde edebilmek için üretim, oksijenden arındırılmış bölümler içerisinde gerçekleştirilmekte ve hidrofilitenin kaybedilmemesi için üretilen implantlar salin içerisine konarak, oksijen teması cerrahi operasyon ile yuva içerisine yerleştirilene kadar ortadan kaldırılmaktadır. Bu sayede hep doku içerisindeymiş gibi ıslak kalan implantlar, kemik içerisine yerleştirildiğinde vücut tarafından yabancı olarak algılanmamaktadır ve iyileşme hızla başlamaktadır (Uzun ve Keyf, 2007; Schwarz ve ark., 2009; Wall ve ark., 2009). Hidrofilik olmayan titanyum implantlarda ise, cerrahi operasyon sonrası implantın dış yüzeyinde oluşan asidik tabaka vücut tarafından ortadan kaldırıldıktan sonra iyileşme başlayabilmektedir (Wall ve ark., 2009; Duymuş ve Güngör, 2013).

Son çalışmalar ise, modifiye SLA yüzeylerinde büyüyen osteoblastların, daha yüksek alkalen fosfataz aktivitesi ve osteokalsin üretimi göstermektedir. Hidrofilik modifiye SLA yüzeylerde osseointegrasyonun başlangıç safhalarında, kan pıhtı stabilizasyonunun arttığı gözlenmiştir; ayrıca pıhtının, endotelial hücrelerin migrasyonunu, çoğalmasını, farklılaşmasını uyaran ve arttıran; sonrasında artmış anjiyogeneze yol açan bir matriks olarak hareket ettiği tespit edilmiştir (Rupp ve ark., 2006; Schwarz ve ark., 2008; Kılınç ve Erkmen, 2011).

#### **2.3.1.4.3. Kaplanmış Yüzeyli İmplantlar**

Günümüzde yapılan biyolojik kaplamalar osseointegrasyonu arttırmak için kullanılmaktadır (Younger ve Chapman, 1989; Arrington ve ark., 1996).

### **a. Plazma Spreyi Kaplanmış Yüzeyle İmplantlar**

Plazma, maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinden oldukça farklı özelliklere sahip olması nedeni ile maddenin dördüncü hali olarak tanımlanmaktadır ve yüksek sıcaklıklarda kuvvetli elektrik veya manyetik alanların etkisi ile oluşmaktadır (Akman, 1993; Tusek ve ark, 2001).

En sık kullanılan kaplama yöntemi titanyum plazma spreydur. Titanyum plazma sprej (TPS), yüksek sıcaklıkta plazma halini almış argon gazı akımına bırakılan titanyum parçalarının, eriyik haline gelerek, yüksek hızda, metal veya alaşımla buluşturulması ve depolanmasıyla gerçekleşmektedir (Eğilmez ve ark., 2010). En pürüzlü implant yüzeyleri plazma sprej yöntemi ile eldilmektedir, bu nedenle TPS yöntemi daha fazla yüzey pürüzlülüğünün ( $Ra > 2\mu m$ ) amaçlandığı durumlarda kullanılmalıdır. Sonuç olarak, TPS implantların daha sıklıkla düşük kemik yoğunluğuna sahip bölgelerde kullanımı tavsiye edilmektedir (Buser ve ark., 1998).

### **b. Seramik Kaplanmış İmplantlar**

Dental implantlarda 1980'li yıllardan itibaren kullanılan özellikle titanyum ve alaşımlarından yapılan metaller, plazma veya bioaktif seramikler olarak adlandırılan trikalsiyumfosfat, hidroksiapatit gibi maddelerle kombine olarak uygulanmaya başlanmıştır (Eğilmez ve ark., 2010).

#### *- Trikalsiyumfosfat kaplanmış (TCP)*

Trikalsiyumfosfat bileşimleri partikül yapısındadır ve implant yüzeylerinin kaplanmasında kullanılmaktadır (Eğilmez ve ark., 2010). Kalsiyumfosfat yüzey kaplamalar kemiğin mineral matriksine benzemelerinden dolayı implant yüzeylerinde uygulanmış ve de kapsamlı olarak araştırılmıştır (Uzun ve Keyf, 2007).

Kalsiyumfosfat seramikler, implant yüzeyinde hem trombosit adezyonunu-aktivasyonunu hem de fibrin yapışmasını destekleyerek, implant yüzeyine protein adsorpsiyonunu arttırmaktadır ve bu sayede iyileşme hızlanmaktadır (Rigo ve ark., 2004).

#### - Hidroksiapatit kaplanmış (HA)

Biyoaktif seramikler grubunda yer alan hidroksiapatitler birden farklı formdadır (Ökte, 1991). Canlı yumuşak dokuyla olduğu kadar kemikle de oldukça iyi bir biyouyumluluk gösteren bu madde, osteofilik ve osteokondüktif özelliklerine rağmen osteoindüktif değildir.

Araştırmacılar HA'in osteokondüktif etkisinden yararlanılarak, kemik kalitesi düşük olduğu Tip 3 ve Tip 4 kemiklerde implant ankrajının arttırılacağını düşünmektedir (Uzun ve Keyf, 2007).

HA kaplamaların avantajları yüzey alanını arttırmaları, uygun pürüzlülüğün oluşturulabilmesi, primer stabilitenin sağlanmasındaki üstünlükleri ve artmış kemik-implant temasıdır. Dezavantajları ise implant çevresindeki kemik yıkımı sonucu açığa çıkan kaplanmış yüzeyin plak retansiyonu için uygun ortam sağlaması, kaplama metodlarının aşındırma metoduna göre daha kompleks olmaları, implantasyon sırasında ve sonrasında kaplamanın kopması, parçalanması, çözülmesi ve erimesidir (Denissen ve ark., 1990; Cook ve ark., 1992; David ve ark., 1995).

#### **2.3.1.4.4. Kombine İmplantlar**

Kombine implantlar şimdiye kadar anlatılan yüzey işlemlerinin avantajlarını bir araya getirerek başarıyı arttırmak amacıyla tasarlanmışlardır (Ökte, 1991).

#### **2.3.1.5. Biyomimetik Yaklaşımlar**

İmplant yüzeyi ile ilgili son yenilikler genellikle nanoteknoloji ve biyomimetik alanında yapılmaktadır.

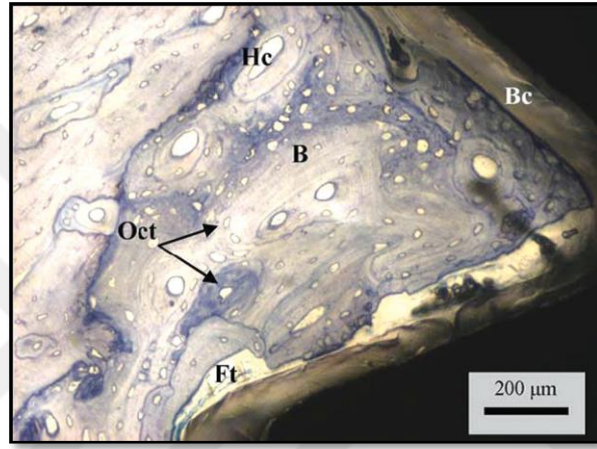
Nanoteknolojik yaklaşımlar implant yüzeyini yalnızca topografik olarak değil kimyasal olarak da değiştirmektedir. Bu yüzey işlemleri implant yüzeyinin iyonlar, biyomoleküller ve hücrelerle olan etkileşimine etki ederek osseointegrasyon sürecini geliştirmeyi hedeflemektedir (Özyazgan ve Çetinkaya, 2013).

Biyomimetik, titanyum implant yüzeylerine eklenebilecek biyooaktif ajanların araştırıldığı bir alandır. İmplant yüzeyinin bu materyaller ile kaplanmasıyla iyileşme



sürecinin hızlandırılması ve böylelikle tedavi süresinin kısaltılması amaçlanmaktadır (De Jonge ve ark., 2008; Kılınç ve Erkmn, 2011).

Biyomimetik ajanlar ekstraselüler matriks etkileşimleri ile yönlendirilen özgün hücresel cevapları ortaya çıkarmak amacıyla tasarlanan, anatomik yapıyı ya da fizyolojiyi tekrarlayabilen ya da taklit edebilen materyallerdir (De Jonge ve ark., 2008; Kılınç ve Erkmn, 2011).



**Şekil 2.4:** Işık mikroskobu altında yüksek magnifikasyonda çekilmiş fotomikrograf. İmplantla temas halinde yeni oluşan kemik (B), osteosit hücreleri (Oct), Havers kanalı (Hc) ve bazı fibröz dokular (Ft). Biyomimetik kaplama (Bc) implant yüzeyinde görülebilmektedir (Rigo ve ark., 2004).

Kemik iyileşmesini arttırmak, hızlandırmak ve implant fiksasyonunu güçlendirmek için çeşitli büyüme ve farklılaşma faktörleri tek başına veya kombine olarak konvansiyonel implantların üzerine biyo-kaplama olarak kullanılmaktadır. Bu faktörler BMP'ler, özellikle BMP-2 ve BMP-7 (osteojenik protein-1), ve PDGF, insülin benzeri büyüme faktörü (IGF) ve TGF  $\beta$ -1 tek başına veya IGF-1 ve TGF  $\beta$ -2 ile kombine olarak kullanılan büyüme faktörlerini içermektedir. Titanyum implantların osseointegrasyonunu geliştirmek için kullanılan diğer biyolojik kaplamalar fibronektin ve vitronektin gibi kollojenleri ve diğer hücre dışı matriks proteinlerini (Geissler ve ark., 2000; Frosch ve ark., 2003; Rammelt ve ark., 2004; Ku ve ark., 2005), ibandronate ve insan paratiroid hormonu 1-34 gibi sistemik farmakolojik ajanların kullanımını içermektedir (Eberhardt ve ark., 2006; Gabet ve ark., 2006).

### **2.3.1.5.1. Adezyon Faktörleri**

Adezyon reseptörlerini bağlayarak hücre tutunmasını teşvik eden fibronektin, "RGD" yapısından (arginin, glisin, aspartik asit) dolayı sıkça kullanılan bir biyo-adezivdir. RGD vasıtasıyla üretilen iskelelerle in vivo olarak erken dönem kemik oluşumu ve matriks mineralizasyonu sağlanmıştır. Ancak bu yaklaşım titanyum-implant yüzeyinde KİT veya osteoblast farklılaşmasında artış sağlamamıştır (Schliephake ve ark., 2002).

### **2.3.1.5.2. Büyüme Faktörleri**

Osseointegrasyon miktarı matriks sentezi, osteoprogenitör hücre farklılaşması ve çoğalması ile arayüzdeki dokuların olgunlaşmasına bağlıdır (Brunski ve ark., 2000). Osteogenezisi teşvik ettiği, periodontal ve dentoalveolar dokuların yenilenmesine katkıda bulunduğu için büyüme faktörlerinin implant çevresi kemik iyileşmesi ve osseointegrasyonu hızlandırma amacıyla kullanımı gündeme gelmiştir (Tablo 2.1) (Öncü, 2013).

Günümüze kadar elde edilmiş olan literatür bilgisi, trombositlerin içerisinde aralarında PDGF, TGF- $\beta$ , IGF ve BMP'nin de bulunduğu, doku rejenerasyonunu hızlandıran ve yara iyileşmesini arttıran pek çok büyüme faktörü bulunduğunu kanıtlamaktadır (Robey ve Young, 1987; Wang ve ark., 1990; Okuda ve ark., 2005).

#### **a. Transforme Edici Büyüme Faktörü- beta1 (TGF- $\beta$ 1)**

TGF- $\beta$ , 30'dan fazla üyesi olan çok geniş bir süper ailedir. En çok üretilen izoformu TGF- $\beta$ 1'dir. Sadece trombositlerin alfa granüllerinden değil, hücreler arası iletişimde de üretilmektedir (Anitua ve ark., 2007). Bu büyüme faktörünün etkisi miktar, matriks çevresi ve hücre tipine göre değişkenlik göstermektedir. Osteoblastların çoğalmasını arttırdığı gibi onları kolayca inhibe de edebilmektedir. Sitokinler arasında en kuvvetli fibrozis ajanıdır (Border ve Noble, 1994). Osteoblast ve fibroblastlarda kollajen-1 üretimini arttırmaktadır (fibrozis). Fibröz iyileşmeyi tetikleme kapasitesi nedeniyle enflamatuvar düzenleyici olarak dikkate alınmaktadır.

**Tablo 2.1:** Büyüme faktörleri ve sentezlendiği hücreler.

<b>BÜYÜME FAKTÖRLERİ</b>	<b>SENTEZLENDİĞİ HÜCRELER</b>	<b>HEDEF HÜCRE</b>	<b>ETKİSİ</b>
Trombosit Kökenli Büyüme Faktörü (PDGF)	Endotelial hücreler	Fibroblastlar	Fibroblast
	Monosit	Düz kas hücreleri	kemotaksisi ve proliferasyonu
	Trombosit	Nötrofil	Kollajen sentezi
	Makrofaj	Makrofaj Osteoblast	Makrofaj aktivasyonu
Transforme Edici Büyüme Faktörü (TGF- $\beta$ )	Endotelial hücreler	Endotelial hücreler	Kollejenaz kontrolü
	Makrofaj	Kemik iliği hücreleri	Kollojen sentezi
	Monosit	Fibroblast	Anjiogenezis
	Trombosit	Preosteoblastlar	Osteoblast ve fibroblast proliferasyonu
İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü-I (IGF-I)	Kondrosit	Fibroblast	Osteoblast
	Osteoblast	Osteoblast	proliferasyonu,
	Trombosit	Kondrosit	Osteoblast sentezi
	Makrofaj		Anjiogenezis
Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)	Makrofaj	Endotelial hücreler	Anjiogenezis
	Keratinosit		
Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)	Endotelial hücreler	Keratinosit	Anjiogenezis
	Makrofaj	Endotelial hücreler	Fibroblast
		Fibroblast	kemotaksisi ve proliferasyonu

### **b. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)**

PDGF, osteoblastlar ve periodontal ligament hücreleri gibi mezenkimal kökenli hücreler için potent bir mitojen ve kemotaktik faktördür. PDGF aynı zamanda anjiyogenezi teşvik etmek için vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu düzenleyen kemik ve yumuşak dokuların iyileşme sürecinde önemli bir hormondur (Chang, 2009). PDGF osteojenik hücrelerin yara alanında toplanmalarını ve çoğalmalarını sağlayarak osteogenezde dolaylı bir rol oynamaktadır (Matsuo ve ark. 1999; Chang, 2009). Bu hücrelerin daha sonraki farklılaşmaları ise BMP tarafından sağlanmaktadır (Chang, 2009). PDGF ve IGF-I kombinasyonunun press-fit titanyum implantlar çevresindeki kemik rejenerasyonunu uyardığı gösterilmiştir (Lynch ve ark., 1991).

### **c. Kemik Morfogenetik Proteinler (BMP)**

Kemik morfogenetik proteinler (BMP) TGF ailesindedir (Zhao ve ark., 2002; DeCarlo ve Whitelock, 2006). Endosseöz implantların BMP gibi büyüme faktörleri ile kaplanması osseointegrasyonun kalitesini arttırmak ve/veya hızlandırmak için bir yol olabilmektedir (Huang ve ark., 2000). BMP'lerin 9 tane alt grubu olmakla beraber, BMP-1, BMP-2, BMP-3 (osteogenin) ve BMP-4 bu grubun en çok bilinenleridir. BMP'lerin kemik oluşumunu indüklemek dışındaki ana görevleri, farklılaşmamış pluripotent hücrelerin kıkırdak veya kemiğe dönüşmesini sağlamaktır (Callens, 1998; Zhao ve ark., 2002; Foster ve Somerman, 2005; DeCarlo ve Whitelock, 2006). BMP'ler iskeletsel alanlar dışında kemik oluşumunu sağlayan tek madde olduklarından, rejenerasyonda çok önemli bir yere sahiptirler. (Wozney, 1995; Lee, 1997; Orbak ve ark., 2014).

BMP'nin in vivo olarak periosteal kemik üretimini indükleyebildiği gösterilmiştir (Chang ve ark., 2007). Örneğin, BMP-2'nin FGF ve IGF-1 ile sinerjistik olarak kemik-implant osseointegrasyonunu geliştirmek için yeni kemik oluşumunu arttırabildiği, BMP-2 ve b-FGF kombinasyonun da 8 aylık süreçte yeni kemik büyümesini hızlandırdığı gösterilmiştir (Park ve ark., 2007).

Diş hekimliğinde BMP'nin, çekim soketi ve implant çevresi yara iyileşmesini, sinüs tabanı ve alveoler kret ogmentasyonunu teşvik ettiği preklinik araştırmalarla bildirilmiştir (Nevins ve ark., 1996; Barboza ve ark., 2004). Bazı araştırmalarda ise BMP kullanımıyla kısa dönemde olumlu iyileşme elde edilirken uzun dönemde kontrole oranla fark olmadığı gözlenmiştir (Matin ve ark., 2001; Jovanovic ve ark., 2007).

BMP-7'nin yüksek dozlarının fibröz doku oluşumunu inhibe ettiği, ancak kemik oluşumunu arttırmadığı gözlenmiştir (Hannink ve ark., 2006). Bir asetabulum modelinde, BMP-7'nin kemik greftleri üzerine etkisi görülmemiştir (Buma ve ark., 2008).

#### **d. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)**

Hücre koruyucu bir ajan olan IGF, tümör hücreleri dahil birçok hücrenin farklılaşması ve çoğalmasını olumlu yönde düzenleyen ajanlardır. Bu sitokinler hücreler için çoğalma mediatörleriyken; aynı zamanda hücreleri matriksteki birçok apoptotik uyarandan koruyan sinyaller üreterek apoptozu düzenleyen en önemli sitokinlerdir (Butt ve ark., 1997). IGF'ler trombositlerden salgılanmalarına rağmen, dolaşımdaki kanda yüksek oranda bulunmaktadır.

#### **e. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)**

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) özellikle endotel hücrelerine özgü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörü ailesidir (Vincenti ve ark., 1996; Yancopoulos ve ark., 2000).

Son yıllarda VEGF ile ilgili çalışmalar, bu ailenin PDGF super ailesinin önemli bir üyesi olduklarını ortaya koymuştur. Aynı zamanda VEGF ailesinin VEGF-A (Human-VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E ve plasenta büyüme faktörü (PlGF) adı verilen altı üyeden meydana geldiğini göstermiştir (Ortega ve ark., 1996; Ferrara ve ark., 2003; Kleespies ve ark., 2004).

VEGF, hem gelişim sırasında, hem de yetişkinde vaskülogenez ve anjiogenez için önemli ve gereklidir (Shalaby, 1995). Bu büyüme faktörü, özellikle anjiogenezde kritik

rol oynarken, endotel hücrelerinin yaptığı birçok fonksiyonda da gerekli olduğu görülmüştür. Bunlar embriyogenez, yara iyileşmesi, tümör büyümesi, miyokardial iskemi, oküler neovasküler hastalıklar ve romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıkları da kapsayan fizyolojik ve fizyopatolojik olaylardır (Zachary, 1994; Bikfalvi, 2004). Ayrıca anjiogenezisi uyaran faktörler içinde hem anjiogenik etki gösteren hem de damar geçirgenliğini arttıran tek faktör VEGF'dir (Kaiser, 2006).

#### **f. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)**

FGF, mezenkimal hücreler için mitojendir. Bu faktörün anjiogenezi uyardığı ve yara iyileşmesinde rolü olduğu gösterilmiştir. Hem asidik hem de bazik olmak üzere iki tip FGF tanımlanmıştır. Bazik FGF'nin anjiogenezisi uyarıcı özelliği yaklaşık 10 kat fazladır (So ve ark., 2001).

İn vitro çalışmalarda, osteogenez sürecinde FGF-2, -4, -9 ve -18'in oluşan kemik dokusundaki hücrelerin proliferasyonunda düzenleyici rol üstlendiği bildirilmiştir (Iseki ve ark., 1999; Shimoaka ve ark., 2002; Walsh ve ark., 2003). Bu düzenleyici etkilerin yanında FGF'lerin osteoblast hücreleri üzerinde mitojenik etkilerinin olduğu dikkati çekmektedir (Fakhry ve ark., 2005). FGF'ler hücre çoğalmasındaki etkilerine ilave olarak, osteoblast farklılaşmasının çeşitli aşamalarında da etki göstermektedir. Bu etkilerini ya doğrudan osteokalsin ve alkalen fosfataz gibi çeşitli matriks proteinlerin sentezini etkileyerek ya da bir transkripsiyon faktörü olan Runx2 salınımını dolaylı yolla etkileyerek gerçekleştirmektedir (Noff ve ark., 1989; Pitaru ve ark., 1993; Zhang ve ark., 2002).

#### *Büyüme Faktörlerinin Kombine Uygulaması*

Büyüme faktörlerinin osteogenezisi arttırmak amacıyla kombine kullanılabilir. Lynch ve arkadaşları (1991) PDGF-BB ve IGF-1'in yara iyileşmesi üzerindeki sinerjik etkilerinden yararlanmak üzere ilk kez kombine büyüme faktörü kullanmıştır. Bu uygulama ile tek bir büyüme faktörü uygulamasına oranla daha fazla alveoler kemik ve sement rejenerasyonu elde edilmiştir. Daha sonra gerçekleştirilen araştırmalarda bu uygulamanın dental implantların osseointegrasyonuna olumlu etki yaptığı bildirilmiştir (Stefani ve ark., 2000). VEGF ve BMP, BMP/TGF- $\beta$  veya BMP/FGF kombinasyonları

da in vivo olarak osseointegrasyonu arttırmıştır (Lan ve ark., 2006; Sumner ve ark., 2006). Bu olumlu sonuçlarla birlikte, büyüme faktörlerinin normal iyileşme sürecini taklit edebilecek sıra ile salınımı sağlayacak taşıyıcı sistemlerin geliştirilme gereği ortaya çıkmıştır. Bu amaçla biyo-çözünbilir doğal (kollajen, kitosan) veya sentetik (polilaktik veya poliglukolik asit) materyallerin geliştirilmesi yönünde çalışmalar sürmektedir (Öncü, 2013).

Rejeneratif tıpta son yıllarda, potansiyel morfojenlerin veya büyüme faktörlerinin salınımı için hücre-ilişkili bölgesel gen terapisi tanıtılmıştır. Örneğin bu teknikte, BMP-2 geninin direk olarak uygulaması sonucunda kemik defekti içinde kemik rejenerasyonun arttığı gözlemlenmiştir. Kemik grefti ile kombine gen terapisinin ise, erken dönemde kemik-implant arayüzünde hızlı osseointegrasyonu indükleyebileceği bildirilmiştir (Park ve ark., 2007).

#### **2.4. Trombosit Konsantreleri**

Trombosit konsantreleri, otojen venöz kanın bir dizi santrifüj işlemine tâbi tutularak trombositlerin ayrıştırılması sonucu elde edilirler. Yüksek konsantrasyonda trombosit ve büyüme faktörü içeren kan komponentleridir. Trombosit süspansiyonlarının, büyüme faktörleri için zengin bir kaynak olduğu, doku tamir ve rejenerasyonunu hızlandırmada son derece etkili olduğu ileri sürülmektedir. Yara bölgesine topikal olarak büyüme faktörleri uygulanması yara iyileşmesini, yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu yönlendirip hızlandırabileceği gösterilmiştir (Philippart ve ark., 2003).

##### **2.4.1. Trombositten Zengin Plazma (TZP)**

Trombosit konsantrasyonlarının birinci jenerasyonu trombositten zengin plazmadır (TZP) (Rodella ve ark., 2011). PDGF, VEGF, TGF, EGF, FGF, PDEGF, PDAF ve ILGF-I gibi büyüme faktörleri TZP içinde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu büyüme faktörleri trombositlerin alfa granüllerinde depolanmaktadır ve kanın pıhtılaşmasının başlamasından sonra 10 dakika içinde ortama salınmaktadır. Birinci saat sonunda bu büyüme faktörlerinin % 95'i ortama salınmış olmaktadır (Marx, 2001). TZP, sadece trombosit ve büyüme faktörü içermemektedir, aynı zamanda kanda bulunan üç

adet proteini de içermektedir. Bu proteinler fibrinojen, vitronektin ve fibronektindir; bunlar osteokondüksiyon için hücre adezyon molekülleri gibi hareket etmektedir ve kemik, bağ doku ve epitel migrasyonu için matriks gibi görev yapmaktadır. TZP'de bulunan büyüme faktörleri çevre dokularda kemotaksis, mitogenez ve anjiogenezi stimüle etmektedir. TZP uygulamasıyla, yara bölgesine yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü salınması sağlanmaktadır ve bu sayede vücudun normal yara iyileşme mekanizması hızlanmaktadır (Petrungaro, 2001).

TZP kemik oluşumunda etkili olabilecek tüm önemli büyüme faktörlerini içermektedir ancak etkinlik gösterebilmek için osteoblast veya öncül hücrelere ihtiyaç duymaktadır. TZP osteoblastların aktivitesini uyarırken, osteoklastik rezorpsiyonu da inhibe etmektedir. Ayrıca TZP, içeriğindeki PDGF'nin %50'sinin kan dolaşımına katılarak 2 dakika içinde atılması nedeniyle sadece topikal uygulamalarda etkili bulunmuştur (Öncü, 2013).

Fuerst ve arkadaşları (2003) çalışmalarında implantların etrafına TZP uygulanmasıyla kemik-implant kontaklarının arttırıldığını ve iyileşmenin hızlandığını tespit etmişlerdir. Erken dönemde stabilitenin de arttığını belirtmişlerdir.

Peev ve Atanasov da (2007) klinik çalışmalarında test grubundaki implantların yüzeyine TZP uygulamışlar ve kontrol grubuna herhangi bir işlem yapılmamıştır. İmplantlara immedat fonksiyonel yükleme yaparak başarı oranlarını karşılaştıran araştırmacılar, test grubunda 5 ay sonunda %100, kontrol grubunda ise %92,85 başarı oranı tespit etmişlerdir.

Fontana ve arkadaşlarının (2004) TZP'nin implat çevresindeki kemik cevabına olan etkisini histomorfometrik olarak değerlendirdikleri çalışmada, sıçan tibialarının birine TZP uygulayarak, diğerine herhangi bir uygulama yapmadan titanyum implantlar yerleştirmişlerdir. Histomorfometrik bulgularda, TZP uygulanan implantların çevresinde oluşan kemik miktarının, TZP uygulanmayanlara göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

Weibrich ve arkadaşları (2004) ise yaptıkları hayvan çalışmasında, implant



yuvalarından birini TZP ile yıkarken, diğeri boş bırakarak birer implant uygulamışlardır. Sonuçta, trombosit konsantrasyonunun dental implantların osseointegrasyonu üzerinde hızlandırıcı etkisi olmadığını bildirmişlerdir.

Kısacası, otojen trombositten zengin büyüme faktörlerinin implant yuvasına uygulandığında implant etrafındaki yumuşak dokuyu ve kemik rejenerasyonunu arttırdığı ve aynı zamanda iyileşme süresini kısalttığı bir çok çalışmada gösterilirken, aksini kanıtlayan sonuçlar da elde edilmiştir (Casati ve ark., 2007).

#### **2.4.2. Trombositten Zengin Fibrin (TZF)**

Trombositten zengin fibrin (TZF) ikinci nesil trombosit konsantrasyonu olup, stokinlerin, trombositlerin ve yüksek oranda lökositlerin fibrin ağı içerisinde tutulması ile elde edilmektedir. İlk kez 2001 yılında Joseph Choukroun tarafından tanımlanmıştır (Giannobile, 1996; Dohan ve ark., 2006b).

TZF protokolü, serum ve trombositler ile güçlü bir fibrin pıhtı toplanmasını mümkün kılmaktadır. Fibrin matriks içeriği sayesinde güçlü bir otolog membran elde edilmektedir (Dohan ve ark., 2006b). Fibrin ağı dolaşımdan gelen kök hücreleri yakalamaktadır ve iyileşme sırasında anjiyogenezisi doğrudan aktive etmektedir (Dohan ve ark., 2006c).

TZF pıhtısının avantajı santrifüj sırasındaki doğal polimerizasyon sürecinden ileri gelmektedir. Bu doğal fibrin yapısı sayesinde büyüme faktörleri ve matriks glikoproteinlerinin yavaş salınımı ( $\geq 7$  gün) mümkün olmaktadır. Bu şekilde bir yavaş salınım mekanizması şiddetli trombosit aktivasyonu nedeniyle TZP tekniklerinde mümkün değildir (Dohan ve ark., 2006b).

He ve arkadaşları (2009) in vitro bir çalışmada, sıçan osteoblastlarının farklılaşması ve çoğalmasında TZP ve TZF'nin etkinliğini karşılaştırmıştır. Sonuç olarak, TZF'nin aşamalı olarak, daha uzun süre otojen büyüme faktörü salımına neden olduğunu göstermiştir.

Yapılan bir in vitro çalışmada TZF'deki TGF- $\beta$ 1 ve PDGF-BB ve IGF-1

konsantrasyonları sırasıyla 6.634 ng/ml, 1.419 ng/ml ve 209.68 ng/ml olarak bulunmuştur (Dohan ve ark., 2006b). Ayrıca TZF üretiminden itibaren ilk 5. dakika, 1., 2. ve 5. saatteki PDGF-AB, TGF $\beta$ -1, VEGF ve IGF-1 salınım miktarları Tablo 2.2’de gösterilmiştir (Su ve ark., 2009).

Bu büyüme faktörlerinin TZF’de 7. güne kadar yavaş salınım gerçekleştirdikleri bildirilmiştir. 7. güne kadar salınan toplam miktarın PDGF-AB, TGF- $\beta$ 1 ve VEGF için sırasıyla 50.3 ng, 273.4 ng ve 6071 ng olduğu gösterilmiştir (Dohan ve ark., 2009).

**Tablo 2.2:** TZF içindeki büyüme faktörlerinin salınım oranları (ng) (Su ve ark., 2009).

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

IGF-1 dışında diğer büyüme faktörlerinin miktarları TZP’de TZF’ye göre daha yüksektir (Dohan ve ark., 2006b; Dohan ve ark., 2006c). Fakat TZP’de sitokin ve büyüme faktörleri uzun süreli yavaş salınım göstermemektedir. Salınımları hızlı ve ömürleri kısadır (Dohan ve ark., 2006b).

Choukroun ve arkadaşları (2006) TZF’nin sert doku üzerine etkilerini değerlendirmiş ve sinüs lift cerrahisi sırasında uygulanan kemik greftine ek olarak TZF kullanımını incelemiştir. Çalışma neticesinde, TZF’nin kemik grefti ile birlikte uygulandığı bölgelerde 4. ay ve 8. ayda elde edilen histopatolojik kesitler benzer bulunmuştur. TZF’nin sert ve yumuşak doku iyileşmesini iki kat hızlandırdığı gösterilmiştir.

TZF tekniğinin başarısı tümüyle kanın elde edilmesi ve santrifüj cihazına

transferinin hızına bağlıdır. Çünkü kullanılan tüpler antikoagülan içermediğinden kan tüp duvarlarına temas ettiği anda koagüle olmaya başlamaktadır. Alınan kan örneğinin hızlı bir şekilde manipule edilmesi gerekmektedir. Bu, kullanılabilir TZF elde etmenin tek yoludur. Eğer manipulasyon süresi uzarsa fibrin membran elde edilmesinde başarısız olunmaktadır (Dohan ve ark., 2006a).

### **2.4.3. Konsantre Büyüme Faktörü (KBF)**

2006 yılında Sacco tarafından geliştirilmiştir (Rodella ve ark., 2011). Kişinin kendisinden alınan kanın dört farklı devir ve süredeki santrifüj işlemi ile bileşenlerine ayrılmasından sonra trombositleri, lökositleri, çeşitli büyüme faktörlerini ve sitokinleri içeren katmanın adıdır. TZP ve TZF'den farklı olarak KBF sabit bir sıcaklıkta değişik hızlarda kontrollü bir şekilde bir rotor (döneç) tarafından döndürülen ve rölatif santrifüj kuvveti (RCF/ Ayırıştırma Kuvveti/ g Kuvveti) 300'ün altında hızlanan toplardamar kanının ayırıştırılmasından elde edilen bir protokoldür (Corigliano ve ark., 2011).

Son yıllarda, araştırmacılar kemik defektlerinde rekonstrüksiyon amacıyla KBF kullanımını raporlamışlardır. Kim ve arkadaşları (2014), KBF uygulamasıyla kemik formasyonunun belirgin bir şekilde arttığı sonucuna varmışlardır.

Sohn ve arkadaşları (2011) ile Choi ve arkadaşları (2014), KBF'yi sinüs ogmentasyonunda yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunu hızlandırmak amacıyla kullanmışlardır. İçeriğinde CD34 kök hücrelerin bulunması sebebiyle TZP ve TZF'ye göre rejenerasyon kapasitesinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Sohn ve ark., 2011).

Doğan ve arkadaşları çalışmalarında (2015) çoklu dişeti çekilmelerinin tedavisinde KBF ve koronale kaydırılan flep tekniği (KKF) kombinasyonunu yalnızca KKF tekniği ile kıyaslamışlardır. Sonuçta, KBF+KKF uygulamasının yalnız KKF uygulamasına göre çekilme derinliğine, ortalama kök yüzeyi kapanması ve tamamen kök yüzeyi kapanmasına ek bir fayda sağlamadığını, yalnızca keratinize doku genişliğini ve doku kalınlığını arttırabildiğini belirtmişlerdir.

#### 2.4.4. TZP-TZF-KBF Farkı

Bu üç trombosit konsantresinin öncelikli farkları elde edilme yöntemleri ve jel yapılarının farklılığıdır. TZP'nin, elde edilmesinin son aşamasında koagülasyon ve ani fibrin polimerizasyonunun oluşması için sığır trombini ve kalsiyum klorür eklenmektedir. (Dohan ve ark., 2006a; Dohan ve ark., 2006b; Dohan ve ark., 2006c).

TZF ve KBF'de ise santrifüj işlemi sırasında yavaş ve doğal bir polimerizasyon oluşmaktadır ve sığır trombini eklenmediği için toplanan otolog fibrinojen üzerindeki etkili trombin konsantrasyonları ile istenilen fizyolojik membran yapının elde edilmesi sağlanmaktadır. Böylece fizyolojik iyileşme fazına destek olunmaktadır. TZP'den farklı olarak, TZF ve KBF'de oluşan yavaş ve doğal polimerizasyon sonucu 3 boyutlu homojen organize bir fibrin yapısı oluşmaktadır. Bu yapı doğal fibrin pıhtıdan daha organize dir. Bu polimerizasyon modu ile dolaşımdaki intrinsek sitokinlerin fibrin ağına tutunması artmaktadır. Aynı zamanda sitokinler yalnızca başlangıç iyileşme fazında matriks içinden salınmaktadır; bundan dolayı sitokinlerin salınma ve hayatta kalma süreleri de uzamaktadır. Bu sitokinler yara alanına iyileşme için gerekli olan hücreleri çağırarak iyileşme matriksinin yeniden şekillenmesini başlatmaktadır. TZP oluşturulurken hızlı ve agresif bir polimerizasyon gerçekleştiğinden sitokinlerin fibrin matriks içine tutunması zordur ve hızlıca dışarı salınmaktadır ve TZF ve KBF'ye oranla çok daha hızlı tükenmektedir (Giannobile, 1996; Dohan ve ark., 2006b). KBF'nin TZP ve TZF gibi diğer rejeneratif materyallerden en önemli farkı ise, CD34 kök hücreleri içermesidir (Rodella ve ark., 2011). CD34 proteinleri kemik iliği transplantasyonunda hematopoetik kök hücrelerin ve progenitörlerin kimliklendirilmesi ve izolasyonunda işaretleyici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca son yıllarda, kas uydu hücreleri ve epidermal prekürsörleri de içeren diğer doku-spesifik kök hücrelerin kimliklendirilmesinde de yardımcı işaretleyici olarak kullanılmaktadır. CD34'ün fonksiyonu kesin olarak açıklanamamakla birlikte, hematopoetik hücrelerin proliferasyonunu teşvik ettiği ve differansiyasyonu engellediği, hücre göçünü ve trafiğini arttırdığı öne sürülmüştür (Nielsen ve McNagny, 2008).

KBF'nin TZP ve TZF gibi rejeneratif materyallerden diğeri bir farkı da materyale ait fibrin matriksindeki büyüme faktörlerinin yoğunluğu, büyüklüğü ve miktarıdır (Orbak ve ark., 2014).

#### **2.4.5. Trombosit Konsantrasyonlarının Etki Mekanizması**

İnflamasyon genel olarak vasküler faz, hücre faz ve iyileşme fazıyla gerçekleşmektedir. Vasküler faz hemostazın geliştiği ve lökositlerin aktive olup yara bölgesine ulaştığı fazdır. İnflamatuar bölgeye ilk olarak lökositler göç etmektedir ve sitokin ve büyüme faktörlerinin salınımı sağlayarak iyileşmeye etkilemektedir. Bu enflamasyon mediatörleri fibroblastların aktivasyonunda, proliferasyonda, biyosentetik aktivitenin stimule edilmesi ve proteazların (matriksmetalloproteinaz, plazmin) salgılanmasında rol oynamaktadır. Sitokinler doku hemostaz dengesinde önemlidir (Dohan ve ark., 2006c).

Enflamatuar sitokinler, TZF uygulamasında TZP'ye oranla daha fazla salınmaktadır. Bunun nedeni TZF'nin lökositik olmasıdır; yani TZF uygulamasında yavaş kan aktivasyon süreci sonucu lökosit degranülasyonu artmaktadır. TZF ve KBF sadece bir trombosit konsantrasyonu değildir, aynı zamanda savunma mekanizmalarını uyaran bir immün ağ görevi görmektedir (Giannobile, 1996; Dohan ve ark., 2006c).

Hemostazın oluşması, lökositlerin göç etmesi ve son olarak koagülasyon ile, fibrin pıhtının oluşması ile karakterizedir. Yara bölgesine ilk olarak polimorfonükleer lökositler (PMNL) gelmektedir ve daha sonra bu hücreler yüksek fagositoz özelliği olan monosit/ makrofajlarla yer değiştirmektedir. İnflamatuar alanda iyileşme reaksiyonlarında rol oynayan hücreler aktive olmaktadır ve çoğu büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin salınımı sağlamaktadır. Aynı zamanda iyileşme esnasında meydana gelebilecek yıkıcı etkileri de azaltmaya yardımcı olmaktadır. Endotelial hücrelerin fenotip değişimi, göçü ve bölünmesi için ekstrasellüler bir matrikse ihtiyaç vardır. Fibrin, anjiyogenez için doğal bir iskele görevi görmektedir. Fibrin matriksin direkt olarak anjiyogenez için yönlendirdiği gösterilmiştir. Matriksin bu özelliği fibrin jelin üç boyutlu yapısı ve ağda haspsolan sitokinlerin aktiviteleriyle açıklanmaktadır (Van Hinsbergh ve ark., 2001). Anjiyogenez için gerekli büyüme faktörleri (FGF- $\beta$ ,

VEGF, PDGF) fibrin matriks içinde bulunmaktadır. Bu faktörlerin fibrine yüksek affiniteyle bağlandığı görülmüştür (Sahni ve ark., 1998; Feng ve ark., 1999; Dohan ve ark., 2006c).

Fibrinin bazı büyüme faktörlerine bağlanması anjiogenez etkisini açıklayabilir. Anjiogenezin önemli bir fazı da endotel hücrelerden  $\alpha\beta 3$  integrin üretimidir. Bu molekül endotel hücrelerinin fibrin, fibronektin ve vitronektine bağlanmasını sağlamaktadır. Fibrin bu molekülün ekspresyonunu arttırmaktadır (Feng ve ark., 1999).

TZF ve KBF fizyolojik fibrin matriks olarak, kök hücreleri için, özellikle anjiyogenezin arttığı safhada, bir ağ gibi işlev görmektedir. Kemik iliğinden köken alan mezenkimal hücreler kemik hücreleri ve birçok farklı dokuların rejenerasyonunu sağlamaktadır. Bu farklılaşmamış hücreler kandan yaralanmış dokulara gelmektedir ve birçok farklı hücre tipine dönüşmektedir. İlk farklılaşma safhası için fibrin ve fibronektin tarafından oluşturulmuş bir skar matriksi gereklidir. Birçok araştırmacı fibrin matriksin kemik defektlerinin rejenerasyonunda mezenkimal hücrelere destek bir yapı oluşturduğunu göstermişlerdir (Dohan ve ark., 2006c).

Choukroun ve arkadaşları (2006), TZF'nin iyileşmeyi hızlandırıcı ve arttırıcı bir biyomateryal olduğunu, ideal iyileşme için gereken tüm parametreleri sağladığını klinik olarak da göstermişlerdir.

TZF ve KBF'nin yavaş kan aktivasyon süreci lökosit degranülasyonu miktarını arttırmaktadır. Enflamasyon açısından lökositler de en az trombositler kadar önemlidir. TZF ve KBF'nin lökosit içeriği yüksektir. Trombosit molekülleri gibi lökosit sitokinleri de fibrin yapı içinde depolanmıştır ve bu sitokinler yavaş salınım göstermektedir (Dohan ve ark., 2006a; Dohan ve ark., 2006b; Dohan ve ark., 2006c).

Fibrin matriks epitelyal hücre ve fibroblastları etkileyerek yara alanını kaplamaktadır. Yara kenarlarında epitel hücreleri bazal ve apikal yüklerini kaybetmektedir ve yara alanında bazal ve apikal yönde genişleyerek yarayı kaplamaktadır. Hücre göçü fibronektin, vitronektin, tenascin ve fibrinojen ile düzenlenmektedir. Integrin ekspresyonunu düzenlemek, fibroblast çoğalmasını ve yara

alanına göçünü düzenlemek için TGF- $\beta$ , PDGF fibrin ve fibronektin varlığı gereklidir (Gray ve ark., 1993). Bütün bunlar dikkate alındığında TZF mikrovaskülarizasyon gelişimini sağlayan ve epitelyal hücre göçünü yönlendiren fibrin bazlı doğal bir biyomateryaldir. Açık yaraları korumak ve iyileşmeyi hızlandırmak için bu tarz bir membrane önemlidir. Aynı zamanda lökosit içermektedir ve bu maddelerin göçlerini arttırmaktadır (Dohan ve ark., 2006c).

Fibrin matriksin yoğunluğu ve içeriği herhangi bir trombosit konsantrasyonu için önemli bir parametredir. Trombosit konsantrasyonlarının biyolojik etkisi araştırılırken, genellikle trombosit büyüme faktörleri üzerinde durulmaktadır ve salınımlarını etkileyen çevrelerdeki sitokinleri ya da fibrin matriksin etkisi göz ardı edilmektedir (Balcı ve Toker, 2011).

Bu çalışmanın amacı; KBF'nin osteoblast hücrelerinin sayısı, proliferasyonu ve hücre metabolizması üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesidir.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmamız Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklendi (TU-1603). Etik kurul onayı Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan alındı (Toplantı sayısı:10, Karar: 2015/1). Çalışmanın deneysel kısmı, Atigencell-Trabzon Hücre Kültürü Laboratuvarı'nda, scanning elektron mikroskobu (SEM) fotoğraflarının çekimi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Metalürji ve Malzeme Mühendisliği Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmamızda, implant yüzeyinin biyolojik açıdan doku uyumluluklarının saptanması ve osteoblast hücreleri ile ilişkilerinin incelenmesi amacıyla titanyum diskler ve devamlı kültür osteoblast hücreleri kullanıldı.

#### 3.1. Titanyum Disklerin Hazırlanması

5 mm çapında ve 1 mm kalınlığında hazırlanan 88 adet makinelanmış ve sonrasında herhangi bir yüzey işlemine tabi tutulmamış Grade 4 saf titanyum disk implant firmasından (Implance, Trabzon, Türkiye) temin edildi (Şekil 3.1). Bu disklerin 42 tanesi test grubu, 42 tanesi kontrol grubu için ve 4 tanesi SEM görüntülemesinde kullanıldı.



**Şekil 3.1:** 5 mm çapında ve 1 mm kalınlığında makinelanmış Grade 4 saf titanyum diskler.

Hücre kültürü yapılmadan önce diskler ultrasonik banyo içerisinde (Goplus, Çin) her bir solüsyonda ikişer kez olmak üzere 30 dk boyunca sırasıyla aseton, %90'lık etanol ve distile su ile dezenfekte edildi (Şekil 3.2). Bu işlemin sonrasında 121°C'de 10 dk boyunca otoklavda bekletilerek sterilizasyon tamamlandı.





Şekil 3.2: Dezenfeksiyon işleminin gerçekleştirildiği ultrasonik temizleyici

### 3.2. Hücre Kültürü

Çalışmada Saos-2 (ATCC 85-HTB) osteoblast benzeri osteosarkom devamlı hücre hattı kullanıldı. Saos-2 hücreleri, T75 doku kültür flasklarında (Nest Biotech, Çin), %10 Fetal Sığır Serum (FBS, Lonza-ABD) ile desteklenmiş MEM-Minimum Essential Medium Alpha besi yerinde (MEM- $\alpha$ , Lonza-ABD) çoğaltıldı ve ortama penisilin/streptomisin ve antimikotik (fungizon) çözeltileri eklendi. İnkübasyon, %5 CO<sub>2</sub> atmosfere sahip, 37°C’de %95 nemlendirilmiş hava karışımını sağlayacak sabit sıcaklığa ayarlanmış etüvde (MCO-17 AI, Sanyo, Japan) gerçekleşti. Hücre kültür ortamları günlük bakteriyel ve mantar kontaminasyonu ile pH incelemesine tabi tutuldu ve besi yerleri iki günde bir yenilendi. Hücreler kültür kaplarını tam olarak doldurdıkları zaman (konfluent olduğunda) tripsin-EDTA solüsyonu (Lonza, ABD) ile kültür kabı tabanından kaldırıldı, besi ortamı ile seyreltilen hücreler 1’e 4 oranında pasajlanarak çoğaltıldı.

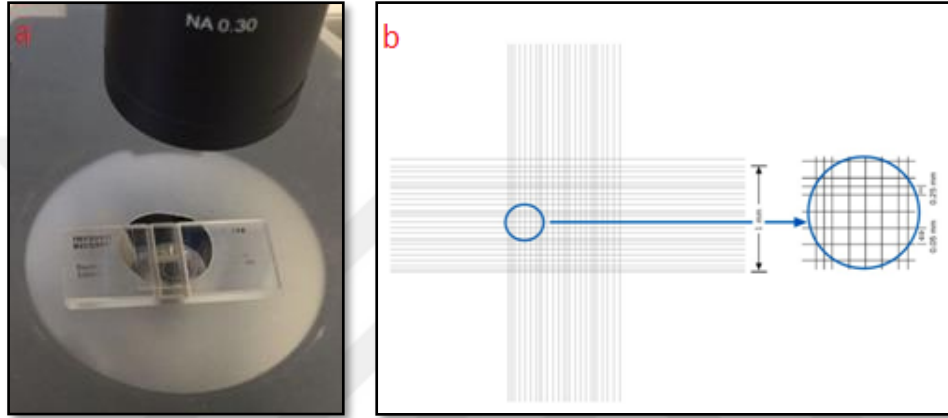
#### *Hemositometre ile Toplam Hücre Sayılarının Saptanması*

Hemositometre ile hücre sayımı öncesinde steril kültür kaplarında inkübe edilen Saos-2 hücreleri inkübatörden çıkartılmış, %0,25’lik tripsin-EDTA (Lonza, ABD) kullanılarak hücreler arası bağları koparılmış ve hücreler steril kültür kaplarının zemininden kaldırıldı. Daha sonra 5 dk süreyle 1500 devirde santrifüj edildi. Santrifüjün sonrası tüplerin üst kısmında kalan sıvı pastör pipeti ile çekilip atıldı. Tüpün dibinde toplanan hücreler ise 1 ml taze medyum ile tekrar süspansiyon haline getirildi. Süspansiyondan 10  $\mu$ l alınarak 10  $\mu$ l tripan mavisi ile karıştırıldı (Celis,

1998). Bu karışım, Thoma lamı üzerinde yaymak suretiyle hücre sayımı yapıldı (Şekil 3.3).

Süspansiyonun mililitresindeki toplam hücre sayısı ise aşağıdaki formülle bulundu (Louis ve Siegel, 2011):

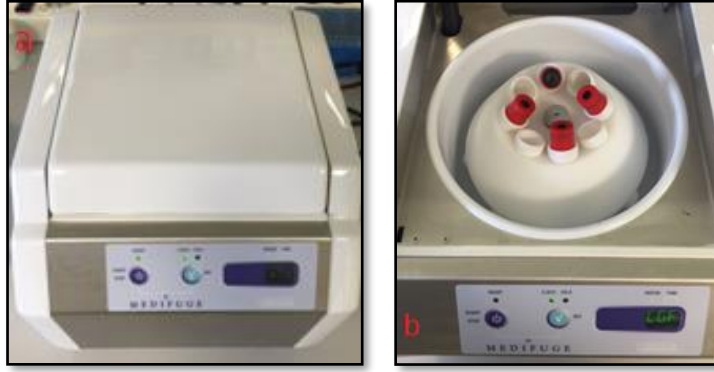
$$\text{Toplam hücre sayısı/ml} = \text{Hemositometre sayım sonucu} \times 10^4 \times \text{Medyum miktarı (ml)}$$



Şekil 3.3: a) Thoma lamı üzerinde mikroskop ile hücre sayımı, b) hücre sayımında kullanılan hemositometrik kamera diyagramı

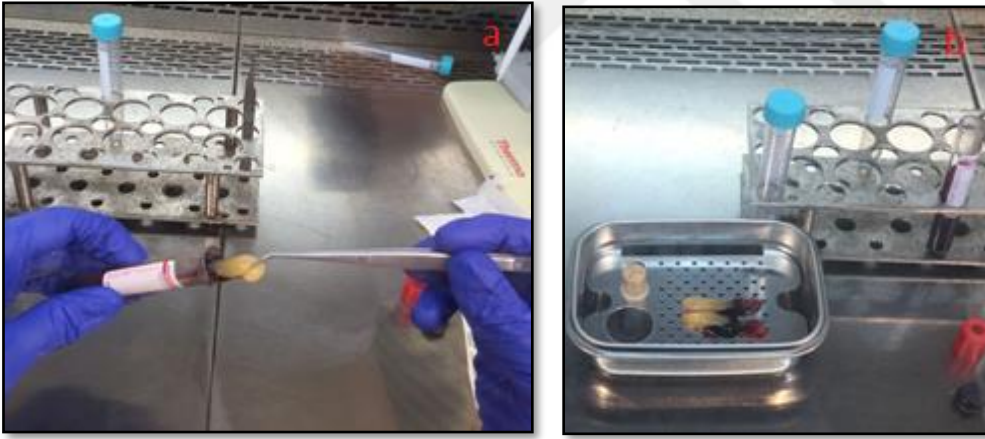
### 3.3. KBF'nin Elde Edilmesi

Çalışmada seçilen sağlıklı bir bireyden 24 gauge'luk kelebek setiyle elde edilen venöz kan, antikoagulan içermeyen 9 ml'lik tüpler (Vacuette Test Tüpleri) içerisine yerleştirildi ve bekletilmeden özel santrifüj cihazına (MEDIFUGE 200, Silfradent srl, Forli, İtalya) yerleştirildi (Şekil 3.4). 2700 rpm'de 2 dk, 2400 rpm'de 4 dk, 2700 rpm'de 4 dk, 3000 rpm'de 3 dk olmak üzere toplamda 13 dk santrifüj edilerek KBF elde edildi. Bu işlem ile birlikte tüpün dibindeki alyuvarlar ve üzerindeki hücresiz plazma arasındaki bölgenin polimerizasyonu sağlanarak fibrin pıhtı elde edildi.



Şekil 3.4: Antikoagulan içermeyen tüplerdeki venöz kanın santrifüj işlemi.

Santrifüj işleminin ardından kan tüpleri steril tüp standı içerisine yerleştirildi. Fibrin pıhtı steril presel yardımıyla tüpten çıkarılarak, fibrinin alt kısmına tutunan kırmızı kan hücreleri makas yardımıyla uzaklaştırıldı (Şekil 3.5a). Elde edilen KBF fibrin pıhtı, KBF kutusuna aktarılarak kapak kapatıldı ve 2 dk preslendi (Şekil 3.5b). Bu yöntemle sıvı içeriğinin KBF kutusunun tabanında toplanması sağlandı.



Şekil 3.5: a) Santrifüj sonrası elde edilen fibrin pıhtı, b) KBF fibrin pıhtının kırmızı kan hücrelerinin uzaklaştırılarak KBF kutusuna aktarılması.

### 3.4. Deney Aşaması

Çalışma planımızda aşağıdaki incelemeler gerçekleştirildi;

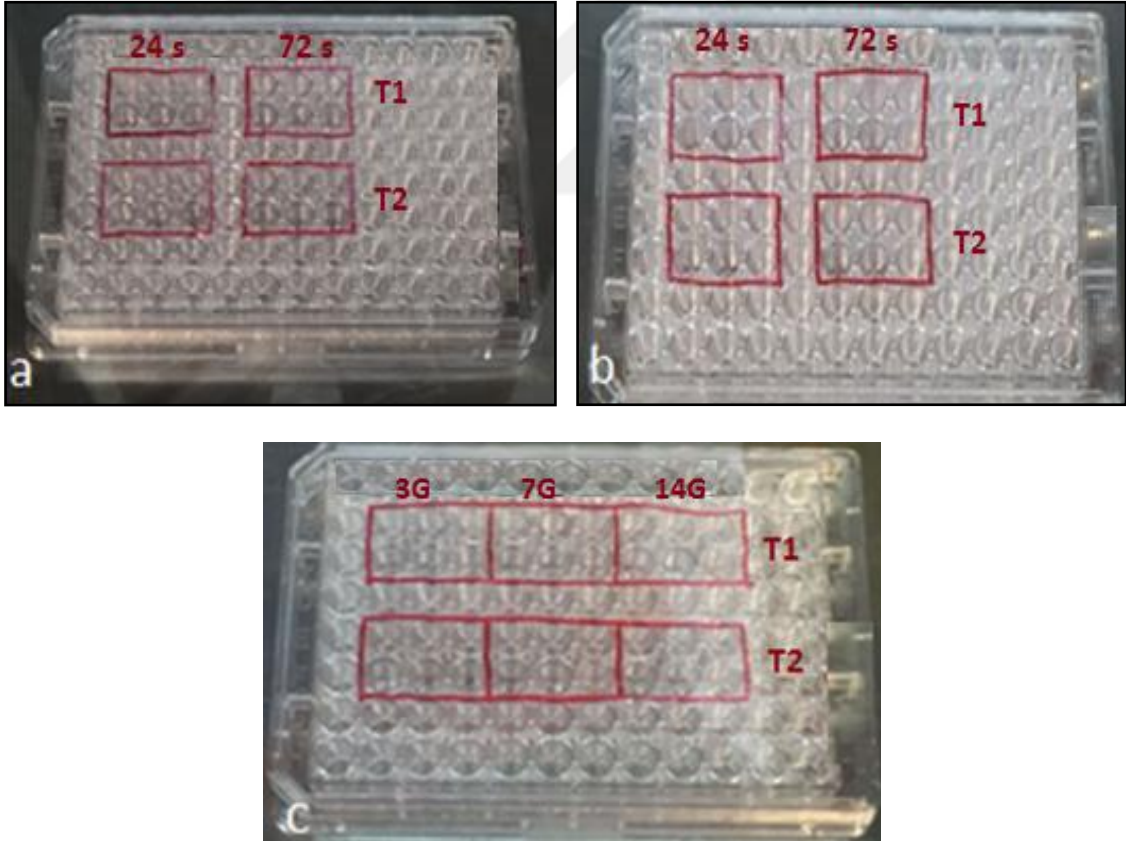
- Birinci ve 3. günde hücre proliferasyonu amacıyla MTT [3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide] testi
- Hücre morfolojilerinin saptanması amacıyla SEM görüntülemesi

- Hücre farklılaşmasının tespiti amacıyla, 1. ve 3. günlerde OCN; 3, 7, ve 14. günlerde ise ALP aktivitesinin incelenmesi

Bu plan doğrultusunda kontrol grubunda yer alan Ti diskler herhangi bir işleme tabi tutulmazken, test grubu disk örnekleri KBF sıvısı ile yıkanarak kullanıldı.

Planlanan çalışma için 96 kuyucuklu 3 adet plaka, testler ikişer tekrar yapılacak şekilde hazırlandı. Birinci plaka 1. ve 3. günlerde hücre proliferasyonu ve OCN aktivitesinin tespiti için hazırlandı. Her gün için 6 adet test, 6 adet de kontrol diski olacak şekilde toplamda 24 disk kullanıldı (Şekil 3.6a).

İkinci plaka 1. ve 3. günlerdeki hücre proliferasyonunun SEM görüntülemesi için hazırlandı. Bu plakada da her gün için 6 adet test, 6 adet de kontrol diski olacak şekilde toplamda 24 disk kullanıldı (Şekil 3.6b).



**Şekil 3.6:** a) 1. ve 3. günlerde hücre proliferasyonu ve OCN aktivitesinin tespiti için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka, b) 1. ve 3. günlerdeki hücre proliferasyonunun SEM görüntülemesi için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka, c) 3., 7. ve 14. günlerdeki ALP aktivitesininin tespiti için hazırlanan 96 kuyucuklu plaka.

Üçüncü plaka ise 3., 7. ve 14. günlerdeki ALP aktivitesinin tespiti için hazırlandı. Her gün için 6 adet test, 6 adet de kontrol diski olacak şekilde toplamda 36 disk kullanıldı (Şekil 3.6c).

Kontrol ve test grubuna ait disklerin yerleştirilmesinden sonra  $10^5$  hücre/ml şeklinde süspansiyeye edilen hücreler, 96 kuyucuklu plakaya disklerin olduğu her bir kuyucuğa 0,1 ml olacak şekilde ekildi. Böylece her kuyucuğa 10.000 hücre ekilmesi sağlandı. Sonrasında hücreler yapışması ve yeni ortama alışması için 1, 3, 7 ve 14 gün süreyle, %5 CO<sub>2</sub> atmosfere sahip, 37 °C'de %95 nemlendirilmiş hava karışımını sağlayacak sabit sıcaklığa ayarlanmış etüvde (MCO-17 AI, Sanyo, Japan) inkübasyona bırakıldı. Her 2 günde bir ortam yenilendi (Pardun ve ark., 2015; Ayubianmarkazi ve ark., 2015). Bu sürelerin sonunda örneklerde aşağıda belirtilen testler yapıldı.

### **3.4.1. Hücre Canlılığı ve Proliferasyonu**

#### **3.4.1.1. Metiltiazol Difenil Tetrazolyum (MTT) Testi**

Hücre proliferasyonlarının değerlendirilmesi amacıyla metabolik aktivitenin tespitine dayalı olan metiltiazol difenil tetrazolyum (MTT) testi kullanıldı.

Saos-2 hücrelerinin titanyum yüzeylerdeki proliferasyonunun tanımlanması için Mosmann (1983) tarafından tanıtılan prosedür kullanıldı. Bu testin çalışma prensibi temel olarak, proliferasyona uğrayan hücrelerin artan dehidrojenaz enzim aktivitesi ile tetrazolyumu (MTT: sarı) kullanarak, formazan (mor) boya üretmesi sonucu görülen renk değişiminin, absorbans olarak ELISA okuyucu ya da spektrofotometre ile ölçülmesine dayalıdır (Biocompare.com, 2012; Atcc.org, 2012).

Diskler 96 kuyucuklu plakalara yerleştirildi. Daha sonra, diskler üzerine yukarıda belirtildiği gibi %10 FBS ve penisilin/streptomisin ve antimikotik (fungizon) çözeltileri ile desteklenmiş olarak hazırlanan  $\alpha$ -MEM besiyerine, Saos-2 hücre süspansiyonları her bir disk üzerine  $1 \times 10^4$  konsantrasyonda ekildi. Plakalar, etüvde 24 ve 72 saat süreyle inkübe edildi. Bu süreler sonunda kuyucuklardaki ortam uzaklaştırıldı, sonrasında diskler PBS (Phosphate buffered saline) ile yıkandı. Daha sonra diskler birer birer, önceden hazırlanmış olan 100  $\mu$ l/kuyucuk olacak şekilde %1'lik FBS içeren  $\alpha$ -MEM ile

desteklenmiş kuyucuklar içerisine 30 dk süreyle konuldu. Hazırlanmış olan (0,5 mg/ml MTT) çalışma solüsyonu 96 kuyucuklu plakanın her kuyucuğuna 0,1 ml olarak ilave edilerek, %5 CO<sub>2</sub> atmosfere sahip, 37°C’de %95 nemlendirilmiş hava karışımını sağlayacak sabit sıcaklığa ayarlanmış etüvde 3 saat inkübe edildi (Mosmann, 1983; Horakova, 2001). Bu işlemi takiben, hücrelerin içerisindeki formazan kristallerini açığa çıkarmak için içerik atılıp, ek indirgenme ürünü olan dimetil sülfoksit (DMSO) çözücüsü (100 µl) ile 15 dk’lık süreyle oda ısısında çözüldü (Keskin ve ark., 2007). Son olarak plakalardaki hücrelerin optik dansitelerinin (OD) absorbans tayini, 570 nm’de mikropilaka ELISA okuyucu (Tecan Sunrise, ABD) ile yapıldı (Kaluderović ve ark., 2014; Kaluderović ve ark., 2016).

### **3.4.2. Hücre Diferansiyasyonu**

#### **3.4.2.1. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesi**

Alkalen fosfataz (ALP) aktiviteleri 3., 7. ve 14. günlerde analiz edildi. Çalışmada ALP aktivitesinin değerlendirilmesi pH 10.2’de p-nitrofenil fosfatın p-nitrofenole dönüşmesi prensibine dayanır. p-nitrofenol formasyonu oranı direkt olarak ALP aktivitesi ile orantılıdır.

Analiz edilecek günlerin sonunda (3., 7. ve 14. günler) medyumlar ortamdan uzaklaştırıldı. Diskler, kültür ortamından alındıktan sonra ikişer kez PBS ile yıkandı ve sonrasında da 100 µl hücre önceden ısıtılmış liziz ortamı (0.1% v/v Triton X-100, 50 mM Tris (pH 7.6) ve 1 mM MgCl<sub>2</sub>) eklendi, oda sıcaklığında 1 saat inkübe edildi. Daha sonra, hücre lizatları 14000 rpm hızda 10 dk boyunca santrifüj edildi ve mikrosantrifüj tüplerine transfer edilerek -80 °C’de muhafaza edildi. ELISA kitlerinin kullanımı için donmuş örnekler 37 °C’de çözdürülerek mikrosantrifüj ile 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatantlar dikkatlice temiz tüplere transfer edildi. ALP ölçümünde “sandwich ELISA” tekniği kullanılmaktadır. Bu ölçüm için özetle, kültür süpernatantları, daha önceden ALP’ye spesifik antikorla kaplanmış kuyucuklara yerleştirildi, bunu takiben immün kompleks yapı oluşturması için Streptavidin-Horseradish Peroxidase (HRP) konjugatları eklendi. 37 °C’de 60 dk inkübe edildikten sonra, kuyucuklar 4 kez yıkanarak antijen-antikor kompleksi oluşturmayan yapılar

otamdan uzaklaştırılır. Daha sonra, kit içerisinde temin edilen kromojen solüsyon kuyucuklara eklenir ve 37 °C’de 10 dk inkübe edilir. Ardından, asidik solüsyon reaksiyonu durdurmak ve mevcut mavi rengi sarıya dönüştürmek için kuyucuklara eklenir. OD mikrolaka ELISA okuyucu (TECAN Sunrise, ABD) ile 450 nm’de ölçüldü. OD değeri ALP konsantrasyonuyla orantılı olduğundan dolayı, örneklerdeki ALP konsantrasyonları GraphPad Prism 6 programı (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, ABD) kullanılarak lineer regresyon analizi ile standart eğrisiyle kıyaslanarak hesaplandı.

#### **3.4.2.2. Osteokalsin Sentezi**

Test ve kontrol diskleri üzerindeki hücrelerin kültür süpernatantlarındaki osteokalsin seviyeleri ELISA testi kullanılarak tanımlanmaktadır. Bunun için, her bir kuyucuktan, proliferasyon testlerin esnasında 24 ve 72 saat sonunda 100 µl kültür süpernatantı mikrosantrifüj tüplerine transfer edilmekte ve -80°C’de depolanmaktadır. ELISA kitini gerçekleştirmek için (Eastbiopharm, China; Cat# CK-E10875), tüpler hızlı bir şekilde 37 °C’de çözündürülür ve mikrosantrifüj kullanılarak 3000 rpm’de 10 dk santrifüj edilir. Süpernatantlar dikkatlice temiz tüplere transfer edilir. Örneklerdeki Osteokalsin/Kemik gla protein (OT/BGP) seviyelerinin test edilmesi için kullanılan ELISA kiti ‘sandwich ELISA’ yöntemi ile kullanılmaktadır. Özetle, kültür süpernatantları, daha önceden OT/BGP antikoruyla kaplanmış kuyucuklara yerleştirildi, bunu takiben immün kompleks yapı oluşturması için streptavidin-HRP eklendi. 37°C’de 60 dk inkübasyon sonrasında kuyucuklardaki kompleks oluşturmayan içerik uzaklaştırıldı, daha sonra tampon çözelti ile 4 kez yıkandı. Kit içerisindeki kromojen solüsyon daha sonra eklendi. 37°C’de 10 dklık inkübasyon süresini takiben, reaksiyonu durdurmak için kuyucuklara asidik solüsyon eklendi ve mavi renk sarıya döndü. OD 450 nm’de mikrolaka ELISA okuyucu (TECAN Sunrise, ABD) kullanılarak ölçüldü.

#### **3.4.3. Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile Hücre Morfolojilerinin Saptanması**

Doku iskeleleri içerisindeki hücrelerin morfolojileri, kültürün 7. günü sonrası SEM ile incelendi. Kültür ortamı, doku iskelelerinin bulunduğu gözlerden

uzaklaştırılmış ve iskeleler PBS ile iki defa yıkandı.

Osteoblast hücrelerinin gelişimi ve morfolojisi SEM (Zeiss EVO 50, Almanya) ile saptandı. Konfluent hücreler; 2 dk süre ile tripsinize edilmiş ve %10'luk fetal bovine serumu içeren  $\alpha$ -MEM medyumu içine yerleştirildi. Hücreler sayılmış ve  $10^4$  hücre/kuyucuk olarak ayarlandı. 24. saat ve 72. saatlik inkübasyon sürelerinin sonunda örnekler SEM değerlendirmesi için hazırlandı. Diskler PBS ile üç kez yıkandı. Daha sonra, diskler 0.1 M PBS içerisinde hazırlanmış hacimce %2.5'lik gluteraldehit (Polysciences, Inc., Warrington, PA, ABD) ile sabitlendi. Dehidrate olana kadar sırasıyla hacimce %30, 50, 70, 90 ve 100'lük etanolde beşer dk bırakıldı ve havada kurutuldu. Örnekler daha sonra ince bir altın tabakasıyla kaplanarak (JSM 5200, Jeol, Tokyo, Japonya) SEM analizleri gerçekleştirildi.

### **3.5. İstatistiksel Değerlendirmeler**

Bu çalışmada elde edilen veriler SPSS for Windows 21.0 paket programı aracılığı ile analiz edildi. Verilerin normallik testleri sonucunda normal dağılım göstermeleri nedeniyle gruplar arasındaki karşılaştırmaları bağımsız gruplarda t testi aracılığı ile yapıldı. İki'den fazla grup arasındaki farkın karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizi (one way-ANOVA), grup içi ikili karşılaştırmalar için Scheffe testi kullanıldı.  $p < 0.05$  seviyesindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



## **4. BULGULAR**

Çalışmamızda, KBF serumu ile yıkanmış ve hiçbir işlem uygulanmadan kuyucuklara yerleştirilmiş olan Ti disk yüzeylerinin osteoblast hücreleri ile etkileşimine bağlı olarak 24 saat ve 72 saatlik süre sonucunda MTT testi yardımıyla hücre proliferasyon yüzdeleri değerlendirildi. SEM ile hücre morfolojilerine dair bulgular sıralandı. 24 saat ve 72 saatlik süreler sonucunda OCN testi yardımıyla osteokalsin miktarı ve 3, 7 ve 14. günler sonunda ALP testi yardımıyla ALP aktivitesi değerlendirildi.

### **4.1. Metabolik Aktivite Temelli Proliferasyon Testi İle Proliferasyon Yüzdelerinin Saptanması (MTT Testi)**

#### **4.1.1. Kontrol Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular**

Ti diskler üzerinde 24 saat süreyle inkübe edilen Saos-2\_osteoblast hücreleri, bu sürenin sonunda MTT testi ile analiz edildi ve hücre oranları incelenerek proliferasyon yüzdeleri tespit edildi. Ortalama proliferasyon oranı %5,2 olarak belirlendi (Tablo 4.1). Yetmiş iki saatlik inkübasyon sonrasında ise hücre proliferasyonunun 24 saatlik sonuçlara göre yaklaşık 2 kat arttığı görüldü ve ortalama proliferasyon oranı %10,5 olarak tespit edildi (Tablo 4.1).

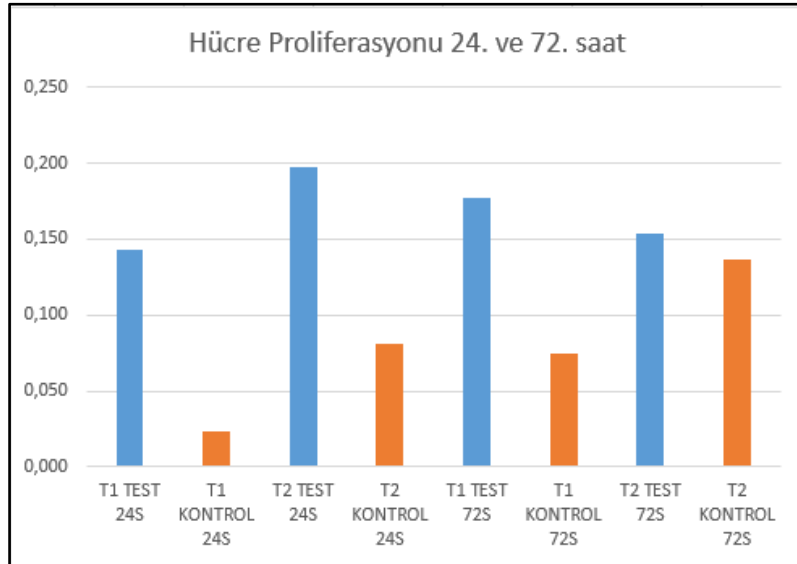
#### **4.1.2. Test Grubu Olarak Kullanılan KBF Serumu Uygulanmış Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular**

Test grubunda yer alan KBF serumu ile yıkanmış diskler üzerinde 24 saat ve 72 saat süreyle inkübe edilen osteoblast hücreleri, bu sürelerin sonunda MTT testi ile analiz edildi ve hücre oranları incelenerek proliferasyon yüzdeleri tespit edildi. Ortalama proliferasyon oranlarının 24 saat sonra %17, 72 saat sonrasında ise %16,5 olduğu tespit edildi (Tablo 4.1).

Genel olarak veriler incelendiğinde, KBF serumu uygulanmış örneklerdeki hücre proliferasyon oranlarının, aynı gün içerisindeki kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu görüldü (Grafik 4.1).

**Tablo 4.1:** 24. ve 72. saat sonunda OD 570 nm’de test ve kontrol gruplarının hücre proliferasyon oranları (T1: 1. Tekrar, T2: 2. Tekrar).

			Ortalama	Grupların Genel Ortalaması
24 Saat	Kontrol Grubu	T1	0,023	0,052 (%5,2)
		T2	0,081	
	Test Grubu	T1	0,143	0,170 (%17)
		T2	0,198	
72 Saat	Kontrol Grubu	T1	0,075	0,105 (%10,5)
		T2	0,136	
	Test Grubu	T1	0,177	0,165 (%16,5)
		T2	0,153	



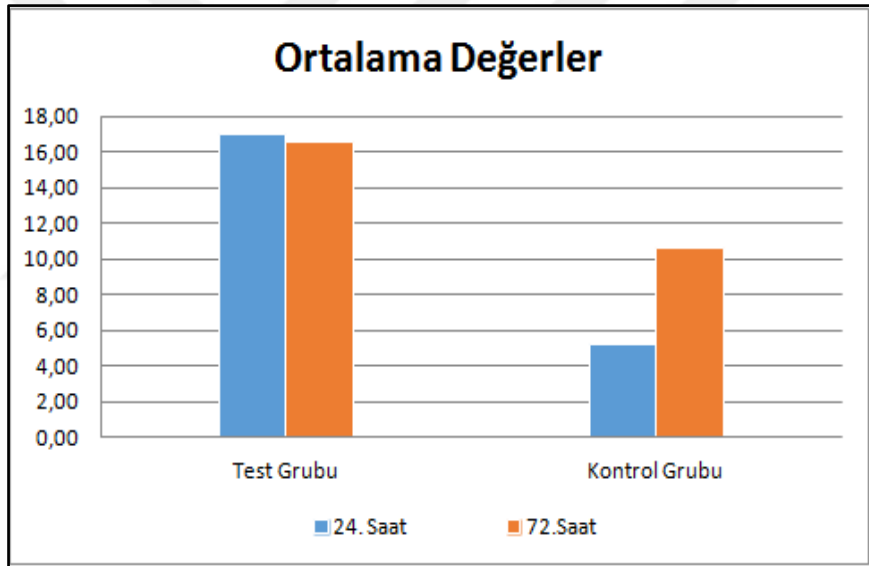
**Grafik 4.1:** 24. ve 72. saat sonucunda test ve kontrol gruplarının hücre proliferasyon oranlarının karşılaştırılması (T1: 1. Tekrar, T2: 2. Tekrar).

### 4.1.3. Proliferasyon Bulgularının İstatistiksel Değerlendirilmesi

Proliferasyon testleri sonucunda elde edilen istatistik sonuçları Tablo 4.2 ve Grafik 4.2’ de sunulmaktadır.

Bu sonuçlara göre grup içi değerlendirmesine göre;

- Test grubunda; 24. saat ile 72. saat arası proliferasyon oranları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı ( $p=0,826$ ) (Tablo 4.2).
- Kontrol grubunda ise; 72. saatteki proliferasyon oranları 24. saate göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,021$ ) (Tablo 4.2).



**Grafik 4.2:** Test ve kontrol gruplarının ait 24 ve 72. saat sonundaki proliferasyon testlerinin grup içi karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik.

Test ve kontrol grubundaki proliferasyon oranları gruplar arasında karşılaştırıldığında ise (Tablo 4.2, Grafik 4.3);

- 24. saatte; test grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek görülmektedir (Tablo 4.2) ( $p=0,001$ ).
- 72. saatte; test grubu değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek görülmektedir (Tablo 4.2) ( $p=0,007$ ).

**Tablo 4.2:** 24 ve 72. saat sonunda proliferasyon testlerinin sonucunda elde edilen bulguların istatistik sonuçlarının özeti.

	TEST GRUBU					KONTROL GRUBU					p
	n	Ort±SS	Std.hata	Min.	Max.	n	Ort±SS	Std.hata	Min.	Max.	
<b>24.saat</b>	6	17,03±4,83	1,97	10,10	23,90	6	5,22±3,25	1,32	2,10	9,40	<b>0,001*</b>
<b>72.saat</b>	6	16,53±2,44	1,00	12,90	19,00	6	10,57±3,51	1,43	6,80	14,90	<b>0,007*</b>

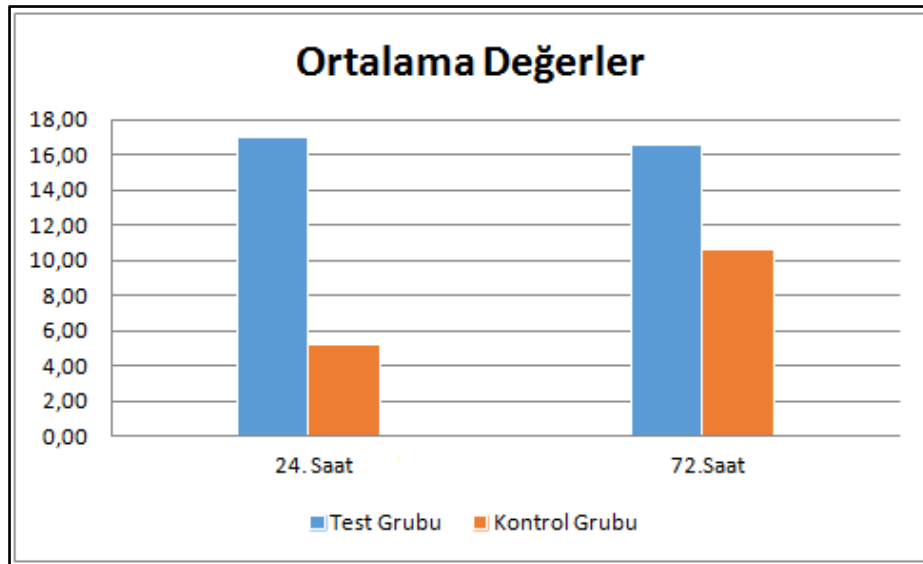
**p**

0,826

**0,021\***

\* p <0,05 anlamlı olarak kabul edilmiştir

\*\*Bağımsız Gruplarda t testi



**Grafik 4.3:** Test ve kontrol gruplarına ait proliferasyon testi sonuçlarının saat bazında karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik

## **4.2. Osteokalsin (OCN) Testi**

### **4.2.1. Kontrol Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular**

Ti disk yüzeyinde Saos-2 osteoblast hücrelerinin biyokimyasal belirteci olan OCN değerleri, 24 saat ve 72 saat olarak iki farklı zaman sonunda incelendiğinde, diskler üzerinde 24 saat süreyle inkübe edilen osteoblast hücrelerinde en yüksek OCN değeri ortalaması 29,64 ng/ml olarak tespit edildi (Tablo 4.3).

72 saat süreyle inkübe edilen osteoblast hücrelerinde ise en yüksek OCN değeri 24 saatlik OCN değerlerinden daha yüksek bulundu ve ortalaması 26,93 ng/ml olarak tespit edildi (Tablo 4.3).

### **4.2.2. Test Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular**

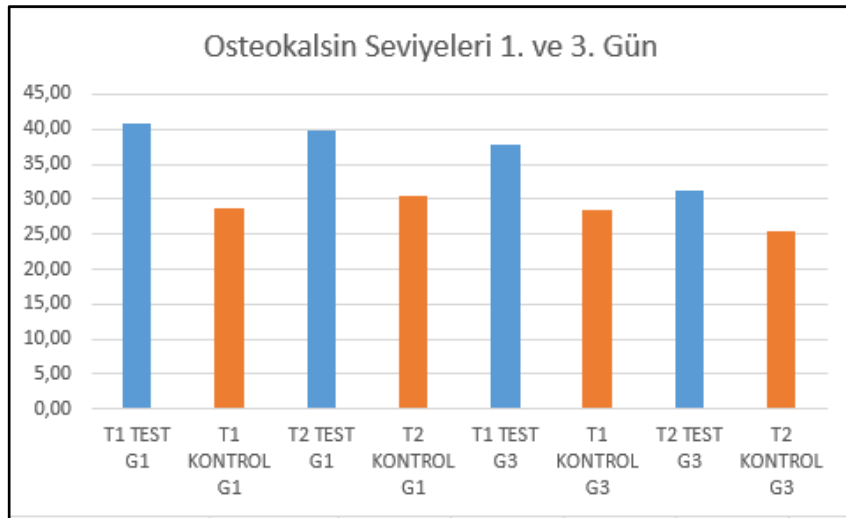
Test grubu olan, KBF serumu ile yıkanmış Ti disk yüzeyinde Saos-2 osteoblast hücrelerinin biyokimyasal belirteci olan OCN değerleri, 24 saat ve 72 saat olarak iki farklı zaman sonunda incelendiğinde, Ti diskler üzerinde 24 saat süreyle inkübe edilen osteoblast hücrelerinde en yüksek OCN değeri ortalama 40,33 ng/ml olarak tespit edildi (Tablo 4.3).

72 saat süreyle inkübe edilen osteoblast hücreleri, OCN değerleri bakımından incelendiğinde ise en yüksek OCN değeri 24 saatlik OCN değerlerinden daha yüksek bulundu ve ortalama 34,5 ng/ml olarak tespit edildi (Tablo 4.3).

Genel olarak veriler incelendiğinde, KBF serumu uygulanmış örneklerdeki OCN değerlerinin, aynı gün içerisindeki kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu tespit edildi. Ancak 72 saat sonunda hem test hem de kontrol grubunda tespit edilen OCN değerlerinin ise 24 saat sonunda tespit edilen değerlerden düşük olduğu gözlemlendi (Grafik 4.4).

**Tablo 4.3:** 24. ve 72. saat sonunda test ve kontrol gruplarının OCN değerleri (T1: 1. Tekrar, T2: 2. Tekrar).

				Ortalama ( $\mu\text{g/ml}$ )/( $\text{ng/ml}$ )	Grupların Genel Ortalaması ( $\text{ng/ml}$ )
24 Saat	Kontrol Grubu	1. Tekrar		0,0288/ 28,8	29,64
		2. Tekrar		0,0305/ 30,5	
	Test Grubu	1. Tekrar		0,0408/ 40,8	40,33
		2. Tekrar		0,0398/ 39,8	
72 Saat	Kontrol Grubu	1. Tekrar		0,0286/ 28,6	26,93
		2. Tekrar		0,0253/ 25,3	
	Test Grubu	1. Tekrar		0,0377/ 37,7	34,5
		2. Tekrar		0,0313/ 31,3	



**Grafik 4.4:** 24. ve 72. saat sonucunda test ve kontrol gruplarının OCN değerlerinin karşılaştırılması (T1: 1. Tekrar, T2: 2. Tekrar).

### 4.2.3. OCN Bulgularının İstatistiksel Değerlendirilmesi

OCN bulgularının istatistiksel değerlendirmesine ait veriler Tablo 4.4 ve Grafik 4.5'te sunulmaktadır.

Bu sonuçlara göre grup içi karşılaştırmada;

- Test grubunda OCN değerlerinde 1. ve 3. günler grupları arasında ng/ml değerleri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmedi ( $p=0,117$ ) (Tablo 4.4).
- Kontrol grubunda ise 1. gündeki OCN ng/ml değerleri 3. güne göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0,014$ ) (Tablo 4.4).

**Tablo 4.4:** OCN bulgularının istatistiksel değerlendirilmesi.

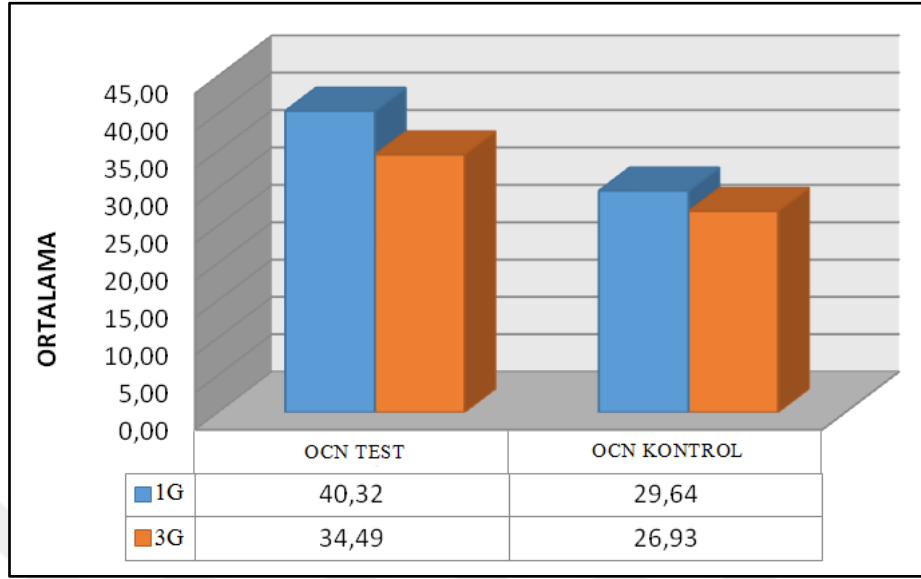
	OCN TEST					OCN KONTROL					p
	n	Ort±SS	Std. hata	Min	Max	n	Ort±SS	Std. hata	Min	Max	
<b>1.Gün</b>	6	40,32±1,36	0,56	38,92	42,16	6	29,64±0,99	0,41	28,53	31,00	<b>0,0001*</b>
<b>3.Gün</b>	6	34,49±8,20	3,35	28,34	50,21	6	26,93±2,00	0,82	23,93	29,18	0,053

p 0,117

**0,014\***

\*  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir

\*\*Bağımsız Gruplarda t Testi

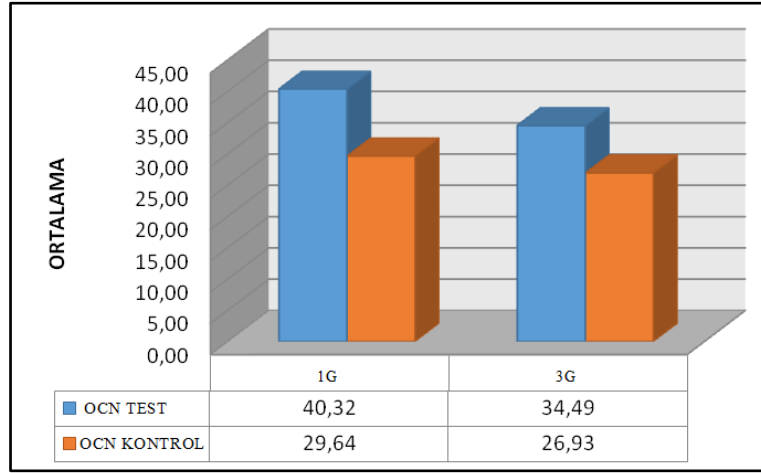


**Grafik 4.5:** Test ve kontrol gruplarının ait 1. ve 3. günler sonundaki OCN testlerinin grup içi karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik.

Değerlendirme sonuçlarına göre gün bazında karşılaştırmalar yapıldığında ise (Grafik 4.6);

- Birinci günde; OCN test grubundaki değerler kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek görülmektedir ( $p=0,0001$ ) (Tablo 4.4).
- Üçüncü günde; test ve kontrol grupları arasında ng/ml değerleri açısından anlamlı farklılık görülmemektedir ( $p=0,053$ ) (Tablo 4.4). İstatistiksel olarak anlamlı olmamakla birlikte OCN test grubunun değerleri daha yüksek görülmektedir (Tablo 4.4).





**Grafik 4.6:** Test ve kontrol gruplarına ait OCN testi sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik.

### 4.3. Alkalen Fosfataz (ALP) Aktivitesi

#### 4.3.1. Kontrol Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular

Ti disk yüzeyinde Saos-2 osteoblast hücrelerinin biyokimyasal belirteci olan ALP değerleri, 3., 7. ve 14. günler olarak üç farklı zaman sonunda incelendi. Ti diskler üzerinde 3, 7 ve 14 gün süreyle inkübe edilen osteoblast hücrelerinde ALP değerlerinin zaman içerisinde artış gösterdiği ve en yüksek değer 14. günde ve ortalama 73,24 IU/L olduğu tespit edildi (Tablo 4.5).

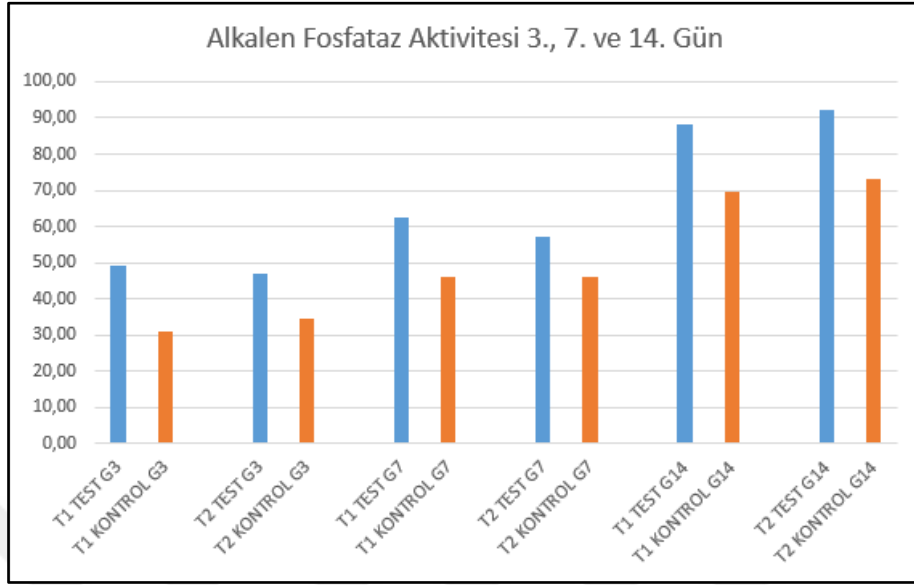
#### 4.3.2. Test Grubu Olarak Kullanılan Ti Disk Yüzeyine Ait Bulgular

KBF serumu ile yıkanmış Ti disk yüzeyinde Saos-2 osteoblast hücrelerinin biyokimyasal belirteci olan ALP değerleri, 3., 7. ve 14. günler olarak üç farklı zaman sonunda incelendi. Ti diskler üzerinde 3, 7 ve 14 gün süreyle inkübe edilen osteoblast hücrelerinde, ALP değerlerinin kontrol grubunda olduğu gibi 3. ve 7. güne kıyasla giderek arttığı, en yüksek değer 14. günde ve ortalama 92,23 IU/L olduğu tespit edildi (Tablo 4.5).

Genel olarak veriler incelendiğinde ise, KBF serumu uygulanmış örneklerdeki ALP değerlerinin, aynı gün içerisindeki kontrol grubuna göre daha yüksek olduğu gözlemlendi (Grafik 4.7).

**Tablo 4.5:** 3., 7. ve 14. günler sonunda test ve kontrol gruplarının ALP değerleri (T1: 1. Tekrar, T2: 2. Tekrar).

			Ortalama (IU/L)	Grupların Genel Ortalaması (IU/L)
3. Gün	Kontrol Grubu	T1	30,86	32,64
		T2	34,42	
	Test Grubu	T1	49,26	48,19
		T2	47,12	
7. gün	Kontrol Grubu	T1	46,17	46
		T2	45,82	
	Test Grubu	T1	62,55	59,94
		T2	57,33	
14. Gün	Kontrol Grubu	T1	69,68	71,46
		T2	73,24	
	Test Grubu	T1	88,19	90,71
		T2	92,23	



**Grafik 4.7:** 3., 7. ve 14. günler sonunda test ve kontrol gruplarının ALP değerlerinin karşılaştırılması (T1: 1. Tekrar, T2: 2. Tekrar, G3: 3. Gün, G7: 7. Gün, G14: 14. Gün).

### 4.3.3. ALP Bulgularının İstatistiksel Değerlendirilmesi

ALP bulgularının istatistiksel değerlendirmesine ait veriler Tablo 4.6 ve Grafik 4.8'de sunulmaktadır.

Bu sonuçlara göre grup içi karşılaştırmada;

- Test grubunda ALP değerleri açısından 3 periyod arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlemlendi (Tablo 4.6). On dördüncü günde ALP değerleri, 3. ve 7. günlere göre istatistiksel olarak daha yüksekken, 7. gündeki ALP değerleri ise 3. güne göre anlamlı derecede yüksek bulundu ( $p=0.0001$ ) (Tablo 4.6).
- Kontrol grubunda ise; ALP değerleri 3 periyod arasında anlamlı farklılık gözlemlendi ( $p=0,0001$ ) (Tablo 4.6). On dördüncü gündeki ALP değerleri, 3. ve 7. günlere göre daha yüksekken, 7.gündeki ALP değerleri 3.güne göre anlamlı derecede yüksek bulundu (Tablo 4.6).

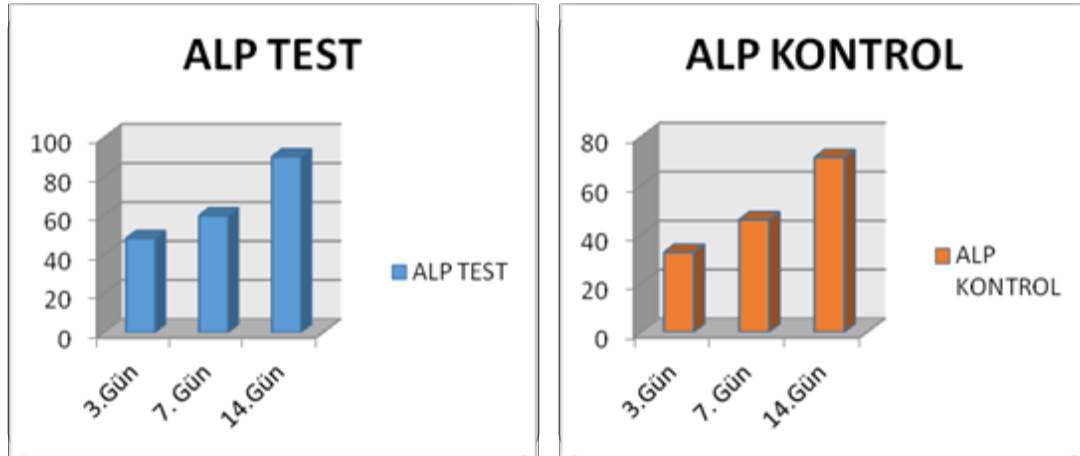
**Tablo 4.6:** ALP bulgularının grup içi ve gruplar arasında istatistiksel değerlendirilmesi.

	ALP TEST					ALP KONTROL					p
	n	Ort±SS	Std. Hata	Min	Max	n	Ort±SS	Std. Hata	Min	Max	
<b>3. Gün</b>	6	48,19±6,00	2,45	41,19	56,14	6	32,64±3,53	1,44	26,23	35,49	<b>0,0001*</b>
<b>7. Gün</b>	6	59,94±5,03	2,05	54,01	68,25	6	46,00±2,09	0,85	42,61	49,02	<b>0,0001*</b>
<b>14.Gün</b>	6	90,21±4,26	1,74	84,63	95,31	6	71,46±2,42	0,99	67,54	73,95	<b>0,0001*</b>
<b>p</b>	<b>0,0001*</b>					<b>0,0001*</b>					

\* p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

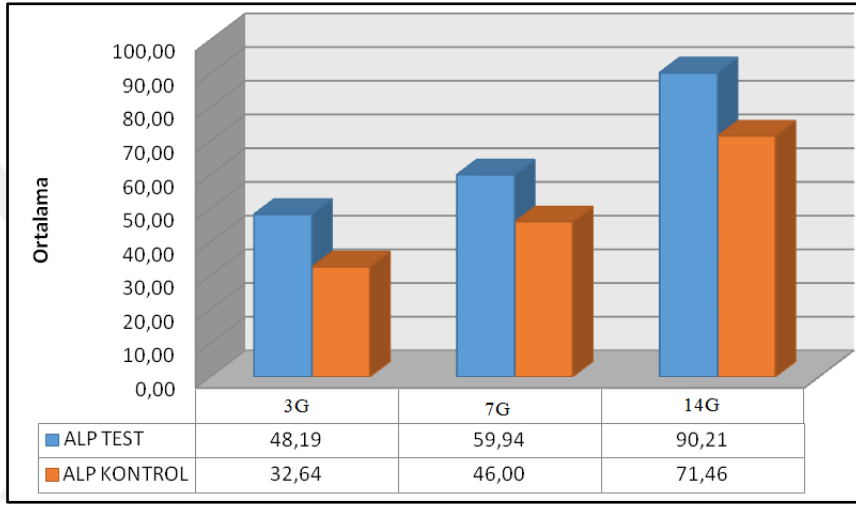
\*\*Grup içi karşılaştırmalar tek yönlü varyans analizi (ANOVA), ikili karşılaştırmalar Scheffe testi ile gerçekleştirilmiştir.

\*\*\*Gruplar arası karşılaştırmalar bağımsız gruplarda t testi ile gerçekleştirilmiştir.



**Grafik 4.8:** Test ve kontrol gruplarının ait 3., 7. ve 14. günler sonundaki ALP testlerinin grup içi karşılaştırması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik.

Değerlendirme sonuçlarına göre gün test ve kontrol grupları arasında 3, 7. ve 14. günlerde karşılaştırmalar yapıldığında ise, her üç günde de de test grubunun ALP değerleri istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu ( $p=0.0001$ ) (Tablo 4.6).

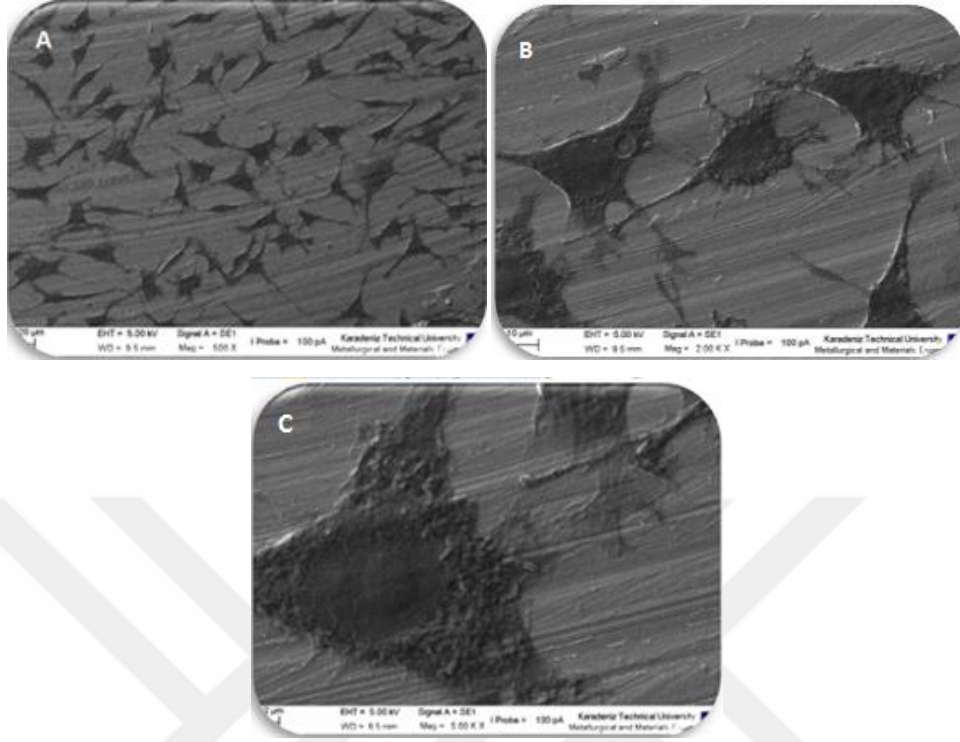


**Grafik 4.9:** ALP testi sonuçlarının gruplar arasında karşılaştırılması sonucunda elde edilen istatistik sonuçlarına ait grafik.

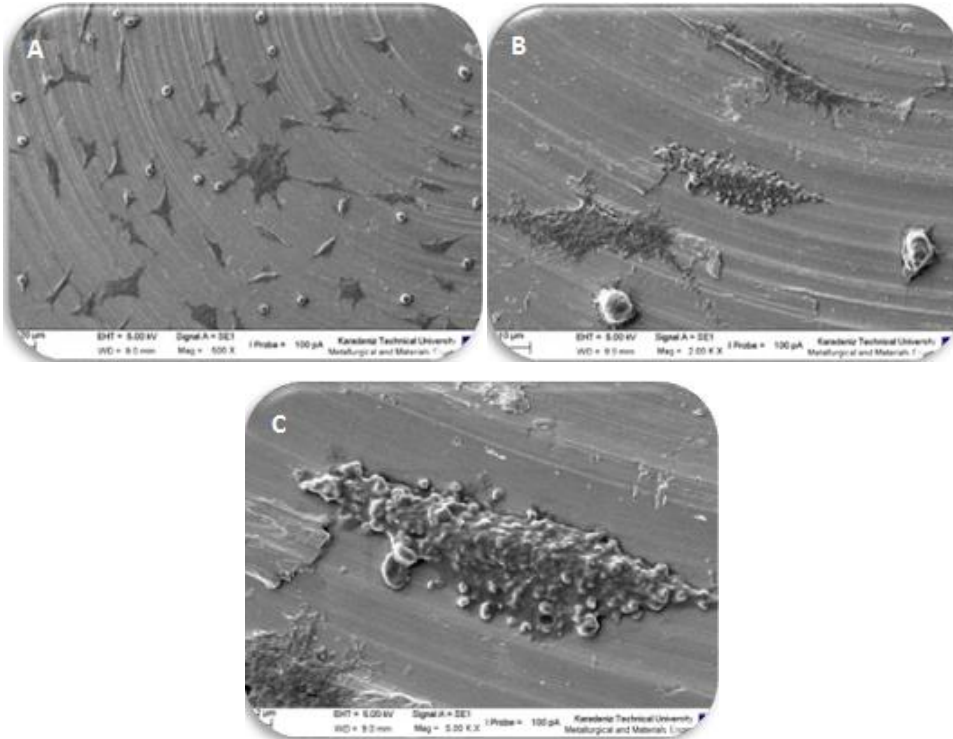
#### 4.4. Scanning Elektron Mikroskobu (SEM) ile Hücre Morfolojilerinin Saptanması

##### 4.4.1. Kontrol Grubuna Ait Bulgular

Ti disk yüzeyinde Saos-2 osteoblast hücreleri 24 saat ve 72 saat olarak iki farklı zaman sonunda bakıldı ve hücrelerin morfolojileri incelendi.



**Şekil 4.1:** 24 saat sonunda kontrol grubundaki Ti disk yüzeyinden alınan SEM görüntüsü (A: Magnifikasyon 500 X, B: Magnifikasyon 2.00 K X, C: Magnifikasyon 5.00 K X).



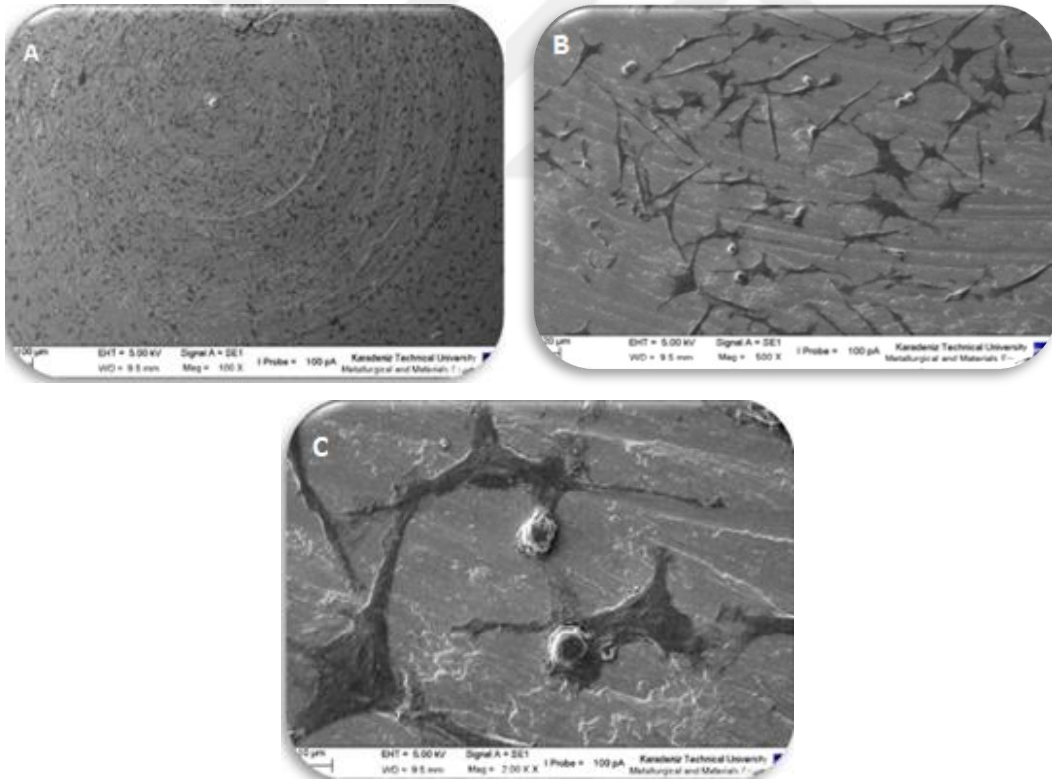
**Şekil 4.2:** 72 saat sonunda kontrol grubundan alınan SEM görüntüsü (A: Magnifikasyon 500 X, B: Magnifikasyon 2.00 K X, C: Magnifikasyon 5.00 K X).

Ti diskler üzerinde osteoblast hücreleri 24 ve 72 saat süreyle inkübe edildi. Bu sürenin sonunda diskler çeşitli işlemlere tabi tutularak kurutuldu ve altın kaplanarak SEM (JSM 5200, Jeol, Tokyo, Japan) incelemeleri yapıp çeşitli büyütme ve açılarda görüntüler alındı.

Yüzey üzerinde birbirleri ile iyice bağlanmış, monolayer (tek tabaka) dağılım gösteren, yüzeye tutunan ve düzgün bir morfolojiye sahip olan hücreler görüldü (Şekil 4.1, 4.2).

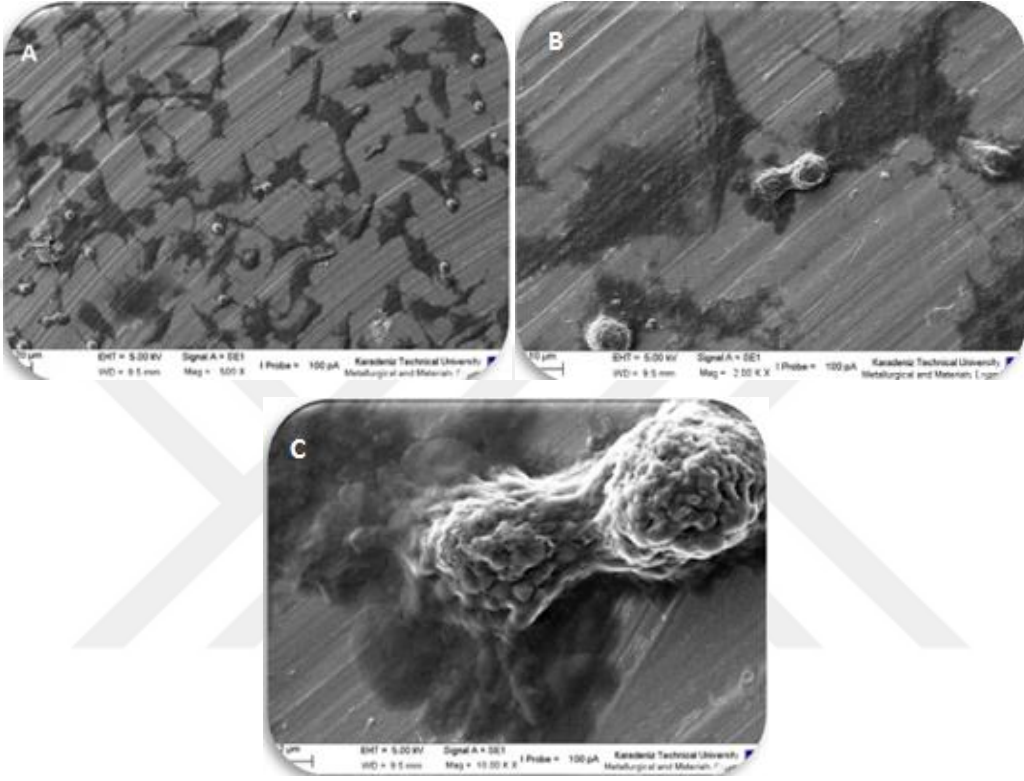
#### 4.4.2. Test Grubuna Ait Bulgular

KBF serumu ile yıkanmış Ti disk yüzeyinde, inkübe edilen Saos-2 osteoblast hücreleri 24 saat ve 72 saat olarak iki farklı zaman sonunda incelenerek hücrelerin morfolojileri incelendi.



Şekil 4.3: 24 saat sonunda test grubundan alınan SEM görüntüsü (A: Magnifikasyon 100 X, B: Magnifikasyon 500X, C: Magnifikasyon 2.00 K X).

Bu sürenin sonunda diskler çeşitli işlemlere tabi tutularak kurutuldu ve altın kaplanarak SEM (JSM 5200, Jeol, Tokyo, Japan) incelemeleri yapıp çeşitli büyütme ve açılarda görüntüler alındı.



**Şekil 4.4:** 72 saat sonunda test grubundan alınan SEM görüntüsü (A: Magnifikasyon 500 X, B: Magnifikasyon 2.00 KX, C: Magnifikasyon 10.00 K X).

Yüzey üzerine monolayer (tek tabaka) karakterde dağılım gösteren, sitoplazmik uzantıları ile birbirlerine bağlanmış, yüzeye tutulumları iyi olan, basık şekilli (yassı) düzgün morfolojili hücreler görüldü (Şekil 4.3,4.4).



## 5. TARTIŞMA

Günümüzde diş hekimliğinde rutin olarak kullanılan dental implantların temeli 1960'larda Branemark tarafından yürütülen çalışmalara dayanmaktadır. Bu yıllarda rutin olarak uygulanan dental implantlar sürekli yenilenen teknikler neticesinde vazgeçilmez bir tedavi haline geldi (Branemark, 2005). Ayrıca günümüzde başarılı implant tedavileri için en önemli gereksinimin, osseointegrasyonun sağlanması ve devam ettirilebilmesi olduğu da benimsendi (Albrektsson ve Wennerberg, 2005).

Başarılı implant uygulamaları için özellikle implant-kemik bağlantısının yani osseointegrasyonun başarısını artırılabilmek amacıyla günümüzde çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda, canlı dokuların bu tedaviden nasıl etkileneceği veya yabancı bir cisme karşı nasıl tepki göstereceğinin iyi bilinmesi gerekmektedir.

İmplant uygulamalarında implant çevresi dokulardaki yara iyileşmesi temelde, cerrahi protokol neticesinde oluşan iatrojenik hasara yanıt olarak başlamaktadır. Peri-implant kemik iyileşmesindeki bu mekanizma bölgedeki kan damarlarının hasarlanması ve bu hasar neticesinde oluşan hemoraji, pıhtı formasyonu veya hematom ile sonuçlanmaktadır (Davies, 2003). Bu iyileşme sürecinde, iatrojenik travma ile yaralanan damarlardan çıkan trombositler endotel altı kollajen ile temas ederek kümeleşmeye başlamakta ve pıhtılaşma mekanizması harekete geçmektedir. Trombositlerin kollajenle temas etmesi ve önceden ortamda bulunan trombin ve fibrinonektin etkisiyle de, trombosit alfa granüllerinden sitokinler ve büyüme faktörleri (PDGF, TGF- $\beta$  gibi büyüme faktörleri ile serotonin ve histamin gibi vazoaaktif faktörler) salınmaktadır (Kılıçoğlu ve ark., 2005). Büyüme faktörü salınımı yara oluşmasından sonraki ilk 48 saat içerisinde meydana gelmektedir (Steed, 1997). Yapılan bir çok in vivo ve in vitro çalışma salınan bu büyüme faktörlerinin, çeşitli hücre tiplerinin proliferasyonu ve migrasyonu üzerinde stimüle edici etkisi olduğunu (Deuel ve ark., 1982; Lynch ve ark., 1989; Mustoe ve ark., 1991; Gruber ve ark., 2002) ve yara iyileşmesi mekanizmasının düzenlenmesinde önemli rol oynadığını göstermiştir (Marx, 2000; Park ve ark., 2001). Ayrıca yapılan araştırmalar sonucunda PDGF ve TGF- $\beta$ 'nın fibroblastlar için sadece

mitojenik olmadığı aynı zamanda fibroblastlarla birlikte nötrofiller, endotelial hücreler, monosit (makrofaj), kas hücreleri (Seppa ve ark., 1982; Postlethwaite ve ark., 1987; Lucas ve Caplan, 1988; Steed,1997) ve osteojenik hücreler için de (Pfeilschifter ve ark.,1990; Hughes ve ark., 1992; Chandrasekhar ve Harvey, 1996; Lind, 1998) kemotaktik faktörler olduğu gösterilmiştir. Ayrıca son zamanlarda insan osteoblastlarının proliferasyonunu sadece PDGF'nin stimüle etmediği (Graves ve ark., 1989; Tsukamoto ve ark., 1991), trombosit salgılarının da kemik iliği kökenli hücrelerin migrasyonunu ve proliferasyonunu stimüle edebileceği gösterilmiştir (Oprea ve ark., 2003).

Literatürden edinilen bilgiler ışığında, implant çevresindeki iyileşme değerlendirildiğinde canlı doku ile implant materyalleri (özellikle de titanyum) arasındaki etkileşim hakkında söylenebilecek çok şey vardır. Etkileşim kemik açısından değerlendirildiğinde, iyileşme süreci boyunca kemik kenarından materyalin yüzeyine doğru gelişme olduğu görülmektedir. Bu nedenle implant yüzeylerinin farklı aktif tabakalarla veya moleküllerle farklı zaman dilimlerinde etkileme olasılığı biyomateryallere ilişkin önemli bir araştırma konusudur. Titanyum yüzeyin hidroksiapatit, florür, bifosfonat veya yeni gelişen faktörler özellikle de trombosit kaynaklı faktörler (örneğin büyüme faktörleri; TGF, TGF $\beta$ , TGF $\beta$ , KGF) ile modifikasyonu yara iyileşmesinin ve kemik gelişiminin hızlanması ile kemik oluşumunu etkileyebileceği ve yara iyileşmesinin hızlandırılmasında bir yöntem olabileceği belirtilmiştir (Bostrom ve ark., 2000; Zechner ve ark., 2003; Branemark, 2005; Anitua, 2006; Abramson ve ark., 2007; Anitua ve ark., 2008; Eğilmez ve ark., 2012). Bu modifikasyonların amacı, biyomateryaller üzerindeki protein, peptid ve enzimleri hareketlendirerek doku cevabındaki belirli hücrelerin aktivasyonu ile implant-kemik arayüzündeki olayları yönlendirebilmektir. Bu anlamda son zamanlarda implantolojide rejeneratif tedavi uygulamaları popüler hale gelmiştir. Büyüme faktörlerinin konsantre halde bulunduğu ve otojen olarak elde edilen TGF, TGF ve KGF materyalleri yumuşak dokunun ve kemik dokusunun iyileşmesini indükleme ve hızlandırma özelliği nedeniyle son zamanlarda sıkça kullanılmaya başlamıştır (Kim ve ark., 2014a; Kim ve ark., 2014b; Yu ve Wang, 2014; Park ve ark., 2016). Bu

materyallerden TZP ve TZF'ye dair elimizde daha fazla veri mevcuttur ancak özellikle KBF materyalinin osteoblastik hücreler üzerindeki etkilerinin geliştirilmesi için daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır (Rahal ve ark., 2000).

KBF, venöz kanın özel bir santrifüj prosedürü sonucunda üretilmektedir. Birbirini takip eden ve kontrollü hızlı santrifüj prosedürü sayesinde KBF'nin, TZP ve TZF'ye kıyasla daha büyük ve yoğun fibrin matrisi oluşumunu sağlamaktadır. KBF'den elde edilen fibrin bloğun, iç içe geçmiş fiberlerden oluşan üç boyutlu polimer ağ yapısında olduğu ve bu fibrin ağ yapısı içerisinde çok sayıda trombosit bulunmaktadır. KBF'nin bu üstünlüğü materyale, büyüme faktörlerinin yavaş yavaş salınabilmesi özelliğini kazandırmaktadır. Bu nedenle, KBF doku rejenerasyonu için büyüme faktörlerini içeren güçlü bir biyolojik iskele olarak kabul edilebilir (Qiao ve An, 2016).

Yu ve arkadaşları (2014), Beagle cinsi köpeklerin KBF ile birlikte kültür edilen periodontal ligament hücrelerinin (PDL) proliferasyonunu ve osteojenik diferansiyasyonunu inceledikleri çalışmalarında, KBF'nin PDL hücrelerinin proliferasyonunun belirgin derecede arttırdığını, kök hücrelerin aktivasyonu ve diferansiyasyonu üzerinde doza-bağlı etki gösterdiğini tespit etmiştir. Qin ve arkadaşları (2016) ise in vivo olarak, KBF'nin Schwann hücresi proliferasyonunu ve nörotrofik faktör sekresyonunu arttırdığını ve fonksiyonel sinir tedavisini teşvik ettiğini belirtmiştir.

Tüm bu bilgiler ışığında bu çalışmada, KBF'nin osteoblast hücreleri üzerindeki etki mekanizmasının, ve titanyum diskler üzerine KBF sıvısı uygulamasının, diskler üzerindeki osteoblast hücrelerinde meydana getirebileceği değişikliklerin araştırılması amaçlandı. Tıbbi deneylerin canlılar üzerinde yapılması etik açıdan birçok sorunu da beraberinde getirebildiğinden (Kiremitçi, 1993; Peter ve ark., 1998), deneylerin yapılabilmesi adına canlı ortamın küçük kopyaları elde edilmeye çalışıldı ve bu çalışmada hücre kültürü tekniklerinden faydalanıldı.

In vitro çalışmaların temelini oluşturan hücre kültürü sistemleri bugün birçok alanda uygulanabilirliği nedeniyle büyük öneme sahiptir (ADA, 1976; Ishaug-Riley ve ark., 1998). Hücre kültür tekniğini içeren in vitro çalışmalar, osteoblastik hücreler ile

biyomateryaller arasındaki ilişkiyi değerlendirmek açısından da oldukça yararlıdır ve sadece hücre hareketi değil aynı zamanda elektron mikroskobu seviyesinde gözlemlemeye de olanak tanımaktadır (Kanbe ve ark., 1997; Aybar ve ark., 2004). Dental implant araştırmalarında uygulanan hücre kültürleri de, osteoblastik sistemlerin izole edilebilirliği ve hücresel olayların belirlenen zaman dilimlerinde gerçekleştirilebilirliği, daha ekonomik olmaları, çoklu kültürlerin yeniden üretilmelerini, hayvanların hastalanmasına veya ölümüne sebebiyet verilmemesi ve ayrıntılı biyokimyasal ve moleküler analizlere uygun olmaları gibi avantajları nedeniyle kullanılmıştır (Cooper ve ark., 1998). Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda hücre kültürü yönteminden faydalanıldı.

In vitro hücre kültür çalışmalarında, primer (primary, sınırlı) veya devamlı (sürekli, daimi, permanent) hücre hatları kullanılmaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda primer hücrelerin, orijinal hücreler gibi çok özel bir metabolik potansiyele sahip olmaları nedeniyle, in vitro koşulları devamlı hücre hatlarına göre daha iyi yansıtabildiklerini bildirilmiştir (Arenholt-Bindslev ve Bleeg, 1990; Nevins ve ark., 1998). Ancak düşük maliyet, kullanım kolaylığı, sınırsız materyal desteği, insan ve hayvan dokularının kullanımı ile ilişkili etik sorunların ortadan kaldırılması gibi avantajları nedeniyle devamlı hücre hatları genellikle araştırmalarda primer hücrelerin yerine kullanılmaktadır (MacDonald, 1990; Gómez-Lechón ve ark., 2003; Schurr ve ark., 2009). Ayrıca literatürde, platelet kaynaklı büyüme faktörü içeren materyaller (örneğin TZP) üzerinde yürütülen çalışmalarda hayvan hücre hatları (Soffer ve ark., 2004; Kawase ve ark., 2005; Goto ve ark., 2006) ya da ticari hatlar, (Kawase ve ark., 2003; Ferreira ve ark., 2005; Slapnicka ve ark., 2008) genellikle insan osteosarkom kaynaklı Saos-2 hücre hattı kullanılmıştır. Bu nedenle bu çalışmada da devamlı hücre hattının kullanılması tercih edildi ve literatürle uygunluk gösterecek şekilde pürüzsüz Ti disklerin KBF ile muamele edilmesinin biyolojik açıdan uyumluluklarının saptanması ve osteoblast hücreleri ile ilişkilerinin incelenmesi amacıyla insan osteosarkom dokularından kültür edilen SaOs-2 devamlı hücre hattı kullanıldı.

Günümüze kadar yapılan birçok hücre kültürü çalışmasında, deney ortamının hazırlanmasında kullanılan hücre yoğunlukları farklılıklar göstermektedir. Ancak

çalışmalarda sıklıkla  $6 \times 10^3$  ile  $5 \times 10^4$  arasında değişen hücre yoğunluklarında kültür ortamları oluşturulmuştur (Castellani ve ark., 1999; Orsini ve ark., 2000; Deligianni ve ark., 2001). Çalışmamızda  $10^4$  yoğunluktaki hücre konsantrasyonu tercih edildi (Györgyey ve ark., 2013; Sun ve ark., 2013).

Çalışmalarda kullanılan hücre yoğunluğunun yanı sıra hücre kültürlerinde kullanılan besi yeri yani medyumun içeriği de oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalarda osteoblastların uzun dönem davranışlarının kültür ortamından etkilendiği bildirilmiştir (Yliheikkilä ve ark., 1996; Matsuura ve ark., 2000; Campoccia ve ark., 2003; Anselme ve Bigerelle, 2005). Bu nedenle bu çalışmada, osteoblast hücrelerinin morfolojik ve fizyolojik cevaplarını tam anlamıyla değerlendirebilmek amacıyla medyum içeriğine dışarıdan besin niteliğinde katkı yapılmasından kaçınıldı ve kontrol grubunda American Type Culture Collection (ATCC) 'nin önerdiği içeriğe ve oranlara sahip bir kültür medyumunu içeriği hazırlandı.

Test grubunda ise medyum içerisine KBF ilave edildi. KBF'nin elde edilmesinde ise canlı bireyden alınan kan örneği kullanıldı. Başlangıçta bu uygulamanın Saos-2 osteosarkom hücresine karşı immün bir yanıt geliştirebileceğinden endişe edilmesine karşın, Ehrenfest ve arkadaşlarının (2009) çalışmasında TZF bileşenleri içinde kültür edilen hücrelerin ne lökositler, ne de başka materyal ile olumsuz etkileşimi olmadığı gözlenmiş olması nedeniyle sağlıklı bir bireyden elde edilen kan kullanıldı. Dohan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda da (2006b, 2006c), TZF'nin periodontal hücrelere karşı sitotoksiste göstermediği belirtilmiştir. De Mos ve arkadaşlarının çalışmasında (2008) ise farklı donörlerden doku örnekleri (tendinosit) ve TZP hazırlamak için kan alınmıştır. Bu durumda 'graft-versus host reaksiyonu' (doku uyumsuzluğu) gelişebilmesinden endişe duyulmuştur. Ancak bu potansiyel etkinin, TZP hazırlanırken içerisindeki lökositlerin %98'inin elimine edilmesi sayesinde minimize edildiğini belirtilmiştir. Ayrıca Tsai ve arkadaşları (2009) da benzer bir çalışmada, TZF'nin biyouyumluluğunun hücre tipine spesifik olmadığını, periodontal hücreler üzerinde biyolojik bir materyal gibi rol oynadığını tespit etmiştir. Bu bilgiler ışığında uygulamanın doğruluğundan emin olmak adına çalışmamızın planlanma aşamasında KBF içerisinde bireye ait olan lökositlerin Saos-2 osteosarkom hücresine karşı immün

bir yanıt gelişebilme ihtimaline karşın bir ön çalışma ile sitotoksikite testi (MTT) yapılmıştır ve KBF'nin Saos-2 osteosarkom hücresine karşı sitotoksik olmadığı belirlenmiştir. Ön çalışma sonucunda elde edilen veriler benzer bir çalışma olan Dohan ve arkadaşlarının (2007), TZF'nin preadipositlere, keratinositlere, osteoblastlara veya büyüme faktörlerine karşı sitotoksikite göstermediğine dair yaptıkları çalışmaların sonuçlarıyla uyumlu bulundu.

Hücre kültürü çalışmalarında kullanılan hücre yoğunlukları ve ortam özellikleri farklılık göstermektedir. Ayrıca hücresel cevapların değerlendirilmesinin amaçlandığı periyodlar da çalışmalara göre değişkenlik sergilemektedir. Osteoblast aktivitesi kısa dönemli (15 dakikadan 60 saate kadar) ya da uzun dönemli (1 ila 21 gün arasında) ölçümlerle değerlendirilebilmektedir (Bowers ve ark., 1992; Yliheikkilä ve ark., 1995; Yliheikkilä ve ark., 1996; Shah ve ark., 1999; Campoccia ve ark., 2003). Hem kısa hem de uzun dönemde hücre sayısı ve hücre proliferasyonunu araştırmayı amaçladığımız bu çalışmada, literatürle uyumlu olarak kısa dönem için 24 saatlik inkübasyon süresi (Kieswetter ve ark., 1996; Scotchford ve ark., 2003; Kim ve ark., 2005), uzun dönem içinse 14 günlük inkübasyon süresi tercih edildi (Ito ve ark., 2013; Sun ve ark., 2013; Walter ve ark., 2013).

Dental implantlara ait yapılan hücre kültürü çalışmalarında kullanılan implant yüzey özelliklerinin (yüzey topografisi ve kimyasal kompozisyon) ve implant materyallerinin de hücre büyümesi, migrasyonu, diferansiyasyonu, ekstrasellüler matriks sentezi ve doku morfogenezini gibi çok çeşitli biyolojik olay üzerinde etkili olabildiği gözlemlenmiştir (Curtis ve Wilkinson, 1997; Shah ve ark., 1999; Guizzardi ve ark., 2004; Marinucci ve ark., 2006). Hatta pürüzlü implant yüzeylerinde, pürüzsüz yüzeylerden daha hızlı osseointegrasyon meydana geldiği; kemik-implant temas yüzeyinin artırılmasıyla daha iyi bir stabilite sağlandığı birçok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (Buser ve ark., 1991; Wennerberg ve ark., 1996; Boyan ve ark., 1996; Buser ve ark., 1998; Tinsley ve ark., 1999). Ayrıca osteoblast hücrelerinin de implant yüzey özelliklerinden etkilenebileceği düşünülmektedir (Cooper ve ark., 1999). Makinelenmiş pürüzlü yüzeyler ile SLA ve SLActive yüzeylerin osteoblast hücreleri üzerine etkisinin incelediği bir çalışmada (Kaya, 2010), hücre sayısı bakımından erken

dönemde (24. saat) makinelenmiş pürüzlü yüzeyler ile SLActive yüzeyli implantlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilirken, 72. saatte ise belirgin bir farklılık bulunamamıştır. Bu sonuçlar neticesinde, uzun dönemde osteoblast hücrelerinin yüzey özelliklerine bağlı olmaksızın sayısını arttırabildiği sonucuna varıldı ve klinik uygulama açısından, uzun dönem iyileşme sürecinde implant yüzey özellikleri açısından belirgin bir fark oluşmayacağı düşünüldü. Bu nedenle bu çalışmada, sadece KBF materyalinin etkileri üzerine yoğunlaşabilmek amacıyla makinelenmiş yüzeyli implantlar tercih edildi.

İmplantoloji alanında yapılan birçok çalışma sonucunda klinik uygulamalarda yaygın olarak kullanılan titanyum implantların biyouyumluluğunun kemik-implant ilişkisi açısından önemli bir rol oynadığı ve metal orjinli implant materyalleri açısından altın standart olduğu tespit edilmiştir (Lee ve ark., 2002; Lossdörfer ve ark., 2004; Kaya, 2010). Bu nedenle çalışmamızda Grade 4 saf titanyum tercih edildi. Günümüze kadar yapılan in vitro çalışmalarda hazırlanan titanyum diskler farklı çaplara ve kalınlıklara sahiptir. Örneğin, Wall ve arkadaşları (2009) çalışmalarında 15 mm çapında ve 1 mm kalınlığında, Anselme ve arkadaşları (2002) 14 mm çapında ve 2 mm kalınlığında, Kazuo ve arkadaşları (2005) 20 mm çapında ve 2 mm kalınlığında ve Aybar ve arkadaşları ise (2009) 10 mm çapında ve 1 mm kalınlığında titanyum diskleri kullanmıştır. Bu çalışmada ise, 96 kuyucuklu plakada rahatlıkla kullanılabilmesi amacıyla çapı 5 mm ve kalınlığı 1 mm titanyum diskler tercih edildi (Hofstetter ve ark., 2013; Kalđerović ve ark., 2014; Kalđerović ve ark., 2016).

İmplant çevresi iyileşme fazında temel olay osteoprogenitör (preosteoblast) hücrelerinin osteojenik olarak gelişmesini sağlayabilmektir. Bu gelişim safhasında hücreler osteoblastlara dönüşmek için birçok diferansiyasyon basamağından geçmektedir. Bu basamaklar dönüşüm fazı, proliferasyon fazı, hücre agregasyon sekresyonu fazı ve ekstraselüler matriks kalsifikasyon periyodudur (Yoshikawa ve ark., 2005). Hücrelerde meydana gelen diferansiyasyon işleminin özel belirteçleri ise, ALP aktivitesi, matriks mineralizasyonu, osteokalsin ve Tip 1 kollajen miktarıdır. Bu belirteçlerden Tip 1 kollajen hücre proliferasyon fazında üretilmektedir (Liu ve ark., 2008). Osteoblastik diferansiyasyon belirteci olarak kullanılan iki tipik parametre,

spesifik ALP aktivitesi ve osteokalsin üretimidir (Owen ve ark., 1990; Kolanç, 1997; Schwartz ve ark., 1999; Liu ve ark., 2008). Osteokalsin kemik matriks proteindir ve diferansiye osteoblastların biyokimyasal belirteci olarak kullanılmaktadır (Cooper ve ark., 2001). Osteoblastik ve fibroblastik fenotipler osteokalsin üretebilmeleri ve in vitro olarak mineralize olabilmeleriyle birbirlerinden ayrılmaktadır. Osteokalsin, mineralize olmuş olgun matrikste daha geç dönemde ortaya çıkmakta ve kemiğin yeniden yapılanmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Zhang ve ark., 2003). Yao ve arkadaşları (1994), Snyder ve arkadaşları (1997) osteoblast hücre kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmalarında osteokalsinin, kemik dokunun başlangıç oluşumunda gözlenmediğini hücrenin osteoblastik fenotipini gösteren geç belirteci olduğunu bildirmiştir. Ayrıca osteokalsinin ekstraselüler matriks kalsifikasyon fazında üretildiğini belirtmişlerdir (Liu ve ark., 2008). ALP ise kemik metabolizmasıyla ve osteoblast diferansiyasyonu ile bağlantılı olduğu bilinen bir kemik matriks enzimidir ve ALP erken bir diferansiyasyon belirteci olarak kabul edilmektedir (Owen ve ark., 1990; Kolanç, 1997; Schwartz ve ark., 1999). ALP hücre agregasyon-sekresyon fazında üretilmekte, kemik mineralizasyonunda önemli rol oynamaktadır ve başlayan osteogenezin analizi için sıklıkla kullanılmaktadır (Cooper ve ark., 2001; Zhang ve ark., 2003; Liu ve ark., 2008). ALP aktivitesi ise osteoblast diferansiyasyonu ve osteojenik özelliğin belirlenmesinde en sık kullanılan parametredir (Ohbayashi ve ark., 1999; Liu ve ark., 2008).

Yu ve Wang'ın yaptıkları çalışmada (2014), PDL hücrelerinin osteoblast diferansiyasyonunu tanımlayan belirteçlerin, mineralize nodül formasyonu, ALP aktivitesi, Tip I kollajen sentezi, BSP ve OCN spesifik protein ekspresyonu olduğu gösterilmiştir. Li ve arkadaşları (2003), Koh ve arkadaşları (1997), Aparicio ve arkadaşları (2002), Scotchford ve arkadaşları (1998), Oliva ve arkadaşları (1996), Kurachi ve arkadaşları (1997) hücre diferansiyasyonunu ve hücrelerin fenotipik karakterlerini belirlemek için ALP aktiviteleri ve osteokalsin üretimlerini incelemiştir. Bu bilgiler neticesinde çalışmamızda KBF'nin osteoblast hücreleri üzerine etkisinin tespit edilebilmesi ve hücre karakterizasyonunun belirlenebilmesi amacıyla ALP ve osteokalsin ölçümleri, hücre canlılığı ve proliferasyonunun tespit için de MTT testinin kullanılmasına karar verildi.



TZP'nin kemik formasyonu ve büyümesi üzerine olumlu etkilerini gösteren birçok çalışma bulunurken; ilave olumlu etkisinin olmadığını belirten çalışmalar da mevcuttur (Marx ve ark., 1998; Okuda ve ark., 2003; Soffer ve ark., 2004; Roldan ve ark., 2004). Jung ve arkadaşları çalışmalarında (2015), %20 oranında TZP içeriğinin PDLSCs'nin proliferasyonu en yüksek seviyede arttırdığını belirtmiştir; hücre proliferasyon oranının %40 TZP'de %20TZP'ye oranla daha az olduğunu bildirmiştir. Liu ve arkadaşları da çalışmalarında (2002), % 8.8, % 17.5, % 35 TZP içeriğini karşılaştırdıklarında, fibroblastların en yüksek proliferasyon oranının % 17.5 TZP ortamında gözlendiğini, yüksek yoğunluktaki TZP'nin ortamın pH'sını değiştirdiğinden proliferasyonu inhibe edici olabildiğini belirtmiştir. Olası sebepler arasında TGF- $\beta$ 'nın konsantrasyonuna bağlı olarak anti-mitojenik aktivite gösterebildiğini ve yüksek konsantrasyonlardaki büyüme faktörlerinin sitotoksik etkisinin gelişebileceğini belirten çalışmalar mevcuttur (Floege ve ark., 1991; Pollard, 2001).

KBF'nin hücre proliferasyonundan sorumlu olması KBF, TGF- $\beta$ , PDGF-AB, VEGF, ve IGF-1 gibi birçok büyüme faktörü açısından oldukça zengin olmasına bağlanabilir (Rodella ve ark., 2011). Bu büyüme faktörleri kendi fonksiyonlarını yürütürken (Zhao ve ark., 2009; Zeiter ve ark., 2009; Nakano ve ark., 2010; Wirz ve ark., 2011; Fang ve ark., 2013), aynı zamanda sinerjik etki göstermektedir ve doku tamiri düzenleyici sistemleriyle yakın temas içerisindedir (Dohan ve ark., 2006b; Raja ve Naidu, 2008; Rodella ve ark., 2011). Yu ve Wang 'ın (2014) yaptıkları bir çalışmada, KBF'nin PDLSCs hücrelerinin proliferasyonunu belirgin olarak teşvik ettiğini ve KBF'nin doza-bağlı olarak etki gösterdiğini tespit etmiştir. Xin ve arkadaşlarının (2015) çalışmasında, KBF'nin osteoblast hücrelerinin proliferasyonu ve diferansiyasyonunu etkili bir şekilde uyarabildiği belirtilmiştir. Çalışmamızda, hem 24. hem de 72. saat sonunda yapılan ölçümlerde KBF uygulanan test grubunda proliferasyon oranları kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı derece yüksektir. Bu durum KBF'nin osteoblast proliferasyonu üzerine olumlu etkisini net bir şekilde göstermektedir. Kontrol grubunda 24. saatten 72. saate kadar proliferasyon oranının istatistiksel olarak anlamlı derece arttığını, ancak test grubunda artış olmadığını görmekteyiz. Bu durumun sebebi olarak test grubunda besi yerinin 24. saatten sonra hücresel doygunluğa ulaştığını, bu

yüzden proliferasyon oranının daha fazla artış gösteremediğini düşünmekteyiz. Bu çalışmada KBF'nin farklı dozları kullanılmazken, klinik uygulamayı taklit etmek adına tek doz üzerinden araştırma yapıldı. Titanyum diskler KBF sıvısına daldırılarak ıslatılıp, daha sonra besi yerine konuldu. Çalışmalardaki çeşitlilik dolayısıyla KBF'nin optimal indüksiyon dozunu tespit etmek ve doza-bağlı mekanizmayı doğru açıklayabilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu söylenebilir.

Osteokalsin, mineralizasyonu düzenleyen kemik-spesifik non-kollejenöz matriks proteindir (Boskey ve ark., 1998) ve hem osteoklast progenitör hücrelerinin hem de osteoblast hücrelerinin diferansiyasyonunda belirgin rol oynadığından kemik remodeling aktivitesini arttırmaktadır (Webber ve ark., 1990; Graziani ve ark., 2005). Bu nedenle osteoblast fonksiyonunun değerlendirildiği çalışmalarda, proliferasyonun yanı sıra osteokalsin üretimi de araştırılmaktadır (Graziani ve ark., 2006). Graziani ve arkadaşlarının (2006) çalışmasında, proliferasyonun yanı sıra OCN üretimini değerlendirilmiştir. Farklı TZP konsantrasyonlarının osteoblast ve fibroblast hücreleri üzerindeki etkisi, 24. ila 72. saatlerde osteoblast ve fibroblast hücrelerindeki OCN seviyeleri incelenmiştir ve TZP'nin her iki hücre grubu üzerinde de doza bağımlı bir etkisi olduğu görülmüştür. Çalışmada, yüksek TZP konsantrasyonlarının OCN aktivitesinde artış oluşturduğu görülürken, düşük TZP konsantrasyonlarının ise 24. saatten 72. saate doğru OCN seviyelerinin azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Dolder ve arkadaşlarının (2006) rat kemik iliği hücreleri üzerinde TZP büyüme faktörlerinin etkilerini inceledikleri çalışmalarında ise, TZP'nin OCN üretimini 1. gün sonunda arttırdığı, 8. gün sonunda ise azalttığı tespit edilmiştir. Bu konuda yapılan başka bir çalışmada da, büyüme faktörlerinin osteoblast ilişkili gen ekspresyonu üzerine etkisi incelenmiştir ve PDGF'nin osteoblast hücrelerinin diferansiyasyonunu inhibe ettiği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise KBF'nin osteoblast hücrelerindeki OCN seviyesi üzerine etkisi incelendi ve 1 ila 3. günlerdeki OCN seviyeleri değerlendirildi. Çalışmanın sonucunda test ve kontrol grupları kendi içerisinde karşılaştırıldığında, test grubunda 1. ve 3. günlerde elde edilen OCN değerleri anlamlı bir farklılık göstermezken, kontrol grubunda ise 1. gündeki OCN değerlerinin 3.güne göre anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Elde edilen sonuçlar gün bazında karşılaştırıldığında

ise 1. günde test grubundaki OCN değerleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunurken; 3. günde test ve kontrol grupları arasında OCN değerleri açısından anlamlı bir farklılık tespit edilemedi. Çalışmamızda gün bazında yapılan değerlendirmelerde 24. saatte test grubu lehine tespit edilen istatistiksel olarak yüksek anlamlı farklılık, 72. saat sonunda görülmedi. Bu sonuç daha önce yapılan bazı çalışmalarda tespit edildiği gibi, KBF içeriğindeki büyüme faktörlerinden PDGF ve/veya TGF- $\beta$ 'nin osteoblast diferansiyasyonu ve OCN değerleri üzerine olumsuz etkileri olabileceğini düşündürmektedir (Hock ve Canalis, 1994; Tanaka ve Liang, 1995; Alvares ve ark., 1995; Giannobile ve ark., 1997; Strayhorn ve ark., 1999; Ochiai ve ark., 2012; Takede ve ark., 2015). Bu nedenle ilerleyen çalışmalarda kullanılacak KBF içeriğinin ayrıntılı olarak incelenmesi ve içerikteki büyüme faktörlerinin miktarının tespit edilmesi, büyüme faktörlerinin OCN aktivitesi üzerine etkisinin daha net yorumlanması açısından fayda sağlayabilir (Strayhorn ve ark., 1999).

Ayrıca hücrel aktivitenin değerlendirildiği yüzeyin özelliklerinin de biyolojik belirteçler üzerinde etkisi bulunmaktadır. Andruklov ve arkadaşlarının (2016) titanyum yüzey pürüzlülüğünün osteoblastların proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonu üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmasında, yüzey pürüzlülük değerlerinin hem ALP hem de OCN aktivitesini doğrudan etkilediği bildirilmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre ALP ve OCN aktivitesinin, düşük ya da yüksek pürüzlülük gösteren yüzeylerde, orta derecede pürüzlülük gösteren yüzeylere göre daha düşük olduğu bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da kontrol grubunda 24. ve 72. saatler arasında tespit edilen OCN seviyesindeki düşüşün bir başka nedeni de, kullanılan düşük yüzey pürüzlülüğündeki makinelanmış titanyum yüzeyin etkisi olabilir. Bu nedenle benzer bir çalışmanın, farklı yüzey özelliğindeki titanyum materyalleri kullanımıyla yapılması, materyal yüzey özelliklerinin OCN aktivitesi üzerine etkisinin daha net yorumlanması açısından faydalı olabileceğini düşünmekteyiz.

Kök hücrelerin osteojenik diferansiyasyonu için kullanılan bir diğer spesifik belirteç ALP'dir ve osteojenik diferansiyasyonun tespitinde ALP'nin araştırıldığı çok sayıda çalışma mevcuttur (Yu ve Wang 2014, Xin ve ark. 2015, Herrera ve ark. 2012). Yu ve Wang'ın (2014) KBF'nin in vitro sıçan kemik iliği hücresi üzerindeki etkisini

inceledikleri çalışmalarında, büyüme faktörlerinin osteoblastik diferansiyasyonu teşvik ettiği sonucuna varılmıştır. Xin ve arkadaşları da (2015) başka bir çalışmada benzer sonuçlara ulaşmıştır. Herrera ve arkadaşlarının (2012) çalışmasında da, TZP'nin Saos-2 osteosarkom hücrelerini doza-bağımlı olarak indüklediği, % 20 TZP oranında en yüksek ALP aktivitesi gözlemlendiği belirtilmiştir. TZP ile yapılan başka çalışmalarda da benzer sonuçlarla karşılaşılmıştır (Kanno ve ark., 2005; Bertoldi ve ark., 2009). Arpornmaeklong ve arkadaşlarının (2004) çalışmasında ise, yüksek konsantrasyondaki TZP'nin osteoblastik proliferasyon oranını arttırdığı, osteoblastik diferansiyasyonu ise inhibe ettiği sonucuna varılmıştır. Bizim çalışmamızda ise KBF'nin ALP aktivitesi 3., 7. ve 14. günlerde değerlendirildi. Hem test ve hem de kontrol grubunda gün bazında değerlendirme yapıldığında, 14. günde ALP değerleri, 3. ve 7. günlere göre istatistiksel olarak daha yüksekken, 7. gündeki ALP değerleri de 3. güne göre anlamlı derecede yüksek bulundu. Yani her iki grupta da zaman içerisinde ALP değerlerinde kademeli bir artış gözlemlendi. Ancak her üç günde de test grubundaki ALP değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu görüldü. Böylece, önceki çalışmalarla uyumlu olarak, KBF'nin, ALP aktivitesi üzerine olumlu etkisi olduğunu düşünmekteyiz.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın neticesinde,

1. Sağlıklı bir bireyden alınan kandan elde edilen konsantre büyüme faktörünün (KBF) başka bir insan-kaynaklı osteoblast hücrelerine karşı sitotoksosite göstermediği tespit edildi.
2. KBF'nin osteoblast hücrelerinin proliferasyonunun ve diferansiyasyonunu belirgin şekilde arttırdığı gözlemlendi.
3. KBF'nin OCN düzeylerini kısa dönemde belirgin derecede arttırdığı gözlemlendi. Ancak OCN aktivitesi diferansiyasyonun geç belirteci olduğundan, gruplarda zaman ilerledikçe OCN düzeylerinde düşüş olduğu gözlemlendi.
4. Osteoblast hücrelerindeki ALP aktivitesinin zaman içinde her iki grupta da artış gösterdi. Bu durum hücre diferansiyasyonunun devam ettiğini gösterdi. Ayrıca test grubunda ALP aktivitesinin tüm değerlendirme periyotlarında kontrol grubundan istatistiksel olarak yüksek olduğu belirlendi.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bu sonuçlar gözönüne alındığında, KBF' nin implant çevresindeki iyileşmeyi hızlandırabileceği ve implantın yüklenmesi için beklenmesi gereken süreyi azaltabileceği ileri sürülebilir. Ancak daha kesin sonuçlara ulaşabilmek için, farklı yüzey özelliğindeki titanyum materyallerinin karşılaştırıldığı, kullanılacak KBF sıvısının içeriğinin tam anlamıyla tespit edildiği çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 7. KAYNAKLAR

Aboushelib M.N., Osman E., Jansen I., Everts V., Feilzer A.J. (2013). Influence of a nanoporous zirconia implant surface of on cell viability of human osteoblasts. *Journal of Prosthodontics*, 22(3), 190-195.

Abramson Z.R., Chang P., Cirelli J.A., Jin Q., Sugai J., Giannobile W.V. (2007). PDGF gene therapy to promote oral implant osseointegration. *European Cells and Materials* 13, 43-44.

Abt E., Carr A.B., Worthington H.V. (2012). Interventions For Replacing Missing Teeth: Partially Absent Dentition. *Cochrane Database of Systematic Review*, Issue 2: CD003814. Doi:10.1002/14651858.Cd003814, Pub2.

ADA. (1976). Guide to dental materials and devices. 8th edition. Chicago.

Akman M.A., (1993). Mechanical properties of plazma surface modified Calcium Carbonat/PP Composite, MS thesis, *The graduate school of natural and applied science*, Middle East Technical University, Ankara.

Akca K., Akkocaoğlu M., Cömert A., Tekdemir I., Cehreli M.C. (2005). Human ex vivo bone tissue strains around immediately loaded implants supporting maxillary overdentures. *Clinical Oral Implants Restorations*, 16, 715-722.

Albrektsson T., Wennerberg A. (2004). Oral implant surfaces: Part 1--review focusing on topographic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them. *International Journal of Prosthodontics*, 17(5).

Albrektsson T., Wennerberg A. (2004). Oral implant surfaces: Part 2--review focusing on clinical knowledge of different surfaces. *International Journal of Prosthodontics*, 17(5).

Albrektsson T., Wennerberg A. (2005). The impact of oral implants - past and future. *Journal Canadian Dental Association*, 71: 327, 1966-2042.

Albrektsson T., Zarb G.A. (1998). Determinants Of Correct Clinical Reporting. *International Journal of Prosthodontics*, 11(5), 517-21.

Alvares O., Klebe R., Grant G., Cochran D.L. (1995). Growth factor effects on the expression of collagenase and TIMP-1 in periodontal ligament cells. *Journal of Periodontology*, 66(7), 552-558.

American Academy Of Implant Dentistry: Glossary Of Implant Terms. (1986). *Journal of Oral Implantology*, 12, 284-294.

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

Anitua E.A. (2006). Enhancement of osseointegration by generating a dynamic implant surface. *Journal of Oral Implantology*, 32: 72-76.

Anitua E., Andia I., Ardanza B., Nurden P., Nurden A.T. (2004). Autologous Platelets As A Source Of Proteins For Healing And Tissue Regeneration. *Thromb Haemost*, 91, 4-15.

Anitua E., Orive G., Aguirre J.J., Andia I. (2008a). Clinical outcome of immediately loaded dental implants bioactivated with plasma rich in growth factors: a 5-year retrospective study. *Journal of Periodontology*, 79: 1168-1176.

Anitua E., Orive G., Aguirre J.J., Ardanza B., Andia I. (2008b). 5- year clinical experience with BTI dental implants: risk factors for implant failure. *Journal of Clinical Periodontology*, 35: 724-732.

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.

Anselme K. (2000). Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, 21(7), 667-681.

Anselme K., Bigerelle M. (2005). Topography Effects Of Pure Titanium Substrates On Human Osteoblast Long-Term Adhesion. *Acta Biomaterialia*, 1, 211-222.

- Anselme K., Bigerelle M., Noel B., Iost A., Hardouin P. (2002). Effect of grooved titanium substratum on human osteoblastic cell growth. *Journal of Biomedical Materials Research*, 60(4), 529-540.
- Aparicio C., Gil F.J., Planell J.A. (2002). Human-osteoblast proliferation and differentiation on grit-blasted and bioactive titanium for dental applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(12), 1105-1111.
- Arenholt-Bindslev D., Bleeg H. (1990). Characterization of two types of human oral fibroblast with a potential application to cellular toxicity studies: tooth pulp fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts. *International Endodontic Journal*, 23(2), 84-91.
- Arpornmaeklong P., Kochel M., Depprich R., Kübler N.R., Würzler K.K. (2004). Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 33(1), 60-70.
- Arrington E.D., Smith W.J., Chambers H.G., Bucknell A.L., Davino N.A. (1996). Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 329, 300-309.
- ATCC. <http://www.atcc.org/attachments/2273.pdf> [Access date: November 14, 2012]
- Atik O., Günel I., Korkusuz F. (2006). Burden Of Osteoporosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 443,19-24.
- Augat P., Simon U., Liedert A., Claes L. (2005). Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporosis International*, 16(2), S36-S43.
- Aybar B., Bilir A., Akçakaya H., Ceyhan T. (2004). Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clinical Oral Implants Research*, 15(1), 119-125.
- Aybar B., Emes Y., Atalay B., Tanrikulu S., Kaya A.S., Issever H., Bilir A. (2009). The influence of titanium surfaces in cultures of neonatal rat calvarial osteoblast-like cells: an immunohistochemical study. *Implant Dentistry*, 18(1), 75-85.



Ayubianmarkazi N., Karimi M., Koohkan S., Sanasa A., Foroutan T. (2015). An in vitro evaluation of the responses of human osteoblast-like SaOs-2 cells on SLA titanium surfaces irradiated by different powers of CO2 lasers. *Lasers in Medical Science*, 30(8), 2129-2134.

Ayukawa Y., Okamura A., Koyano K. (2004). Simvastatin promotes osteogenesis around titanium implants. *Clinical Oral Implants Research*, 15(3), 346-350.

Baker D., London R.M., O'Neal R. (1999). Rate of pull-out strength gain of dual-etched titanium implants: a comparative study in rabbits. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 14(5).

Balcı H., Toker H. (2011). Trombositten Zengin fibrin: Özellikleri ve Diş hekimliğinde kullanımı. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 29(3), 183-192.

Ballı B. (2004). Kemik İyileşmesi ve İyileşmeyi Etkileyen Faktörler. Bitirme Tezi. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, İstanbul.

Barboza E.P., Caula A.L., Caula Fde O., De Souza R.O., Geolas Neto L., Sorensen R. G., Li X.J., Wikesjo U.M. (2004). Effect of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in an Absorbable Collagen Sponge With Space-Providing Biomaterials on the Augmentation of Chronic Alveolar Ridge Defects. *Journal of Periodontology*, 75, 702-708.

Başarır K., Erdemli B., Can A., Erdemli E., Zeyrek T. (2009). Osseointegration in arthroplasty: can simvastatin promote bone response to implants?. *International Orthopaedics*, 33(3), 855-859.

Berg E., Wagnere W.C., Davik G., Dootz E.R. (1995). Mechanical Properties of Laser-Welded Cast And Wrought Titanium. *Journal of Prosthetic Dentistry*, 74, 250-7.

Berglundh T., Abrahamsson I., Lang N.P., Lindhe J. (2003). De Novo Alveolar Bone Formation Adjacent to Endosseous Implants. *Clinical Oral Implants Research*, 14, 251-262.

Bernard G.W. (1991). Healing And Repair of Osseous Defects. *Dental Clinic of North America*, 35, 469-477.

- Bertoldi C., Pinti M., Zaffe D., Cossarizza A., Consolo U., Ceccherelli G. B. (2009). Morphologic, histochemical, and functional analysis of platelet-rich plasma activity on skeletal cultured cells. *Transfusion*, 49(8), 1728-1737.
- Bikfalvi A. (2004). Recent developments in the inhibition of angiogenesis: examples from studies on platelet factor-4 and the VEGF/VEGFR system. *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1017-1021.
- Biocompare.com. <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/117892-Cell-Proliferation-Assays/> [Access date: November 05, 2012]
- Bischof M., Nedir R., Szmukler-Moncler S., Bernard J.P., Samson J. (2004). Implant stability measurement of delayed and immediately loaded implants during healing. *Clinical Oral Implants Research*, 15, 529-539.
- Bolind P., Johansson C.B., Johansson P., Granström G., Albrektsson T. (2006). Retrieved implants from irradiated sites in humans: a histologic/histomorphometric investigation of oral and craniofacial implants. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 8(3), 142-150.
- Border W.A., Noble N.A. (1994). Transforming growth factor  $\beta$  in tissue fibrosis. *New England Journal of Medicine*, 331(19), 1286-1292.
- Bornstein M.M., Hart C.N., Halbritter S.A., Morton D., Buser D. (2009). Early Loading of Nonsubmerged Titanium Implants with a Chemically Modified Sand-Blasted and Acid-Etched Surface: 6-Month Results of a Prospective Case Series Study in the Posterior Mandible Focusing on Peri-Implant Crestal Bone Changes and Implant Stability Quotient (ISQ) Values. *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, 11(4), 338-347.
- Boskey A.L., Gadaleta S., Gundberg C., Doty S.B., Ducey P., Karsenty G. (1998). Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin. *Bone*, 23(3), 187-196.
- Bostrom M.P.G., Yang X., Koutras I. (2000). Biologics in bone healing. *Current Opinion in Orthopaedics*, 11, 403-412.

- Bowers K.T., Keller J.C., Randolph B.A., Wick D.G., Michaels C.M. (1992). Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 7(3).
- Boyan B.D., Bonewald L.F., Paschalis E.P., Lohmann C.H., Rosser J., Cochran D.L., Boskey A.L. (2002). Osteoblast-mediated mineral deposition in culture is dependent on surface microtopography. *Calcified Tissue International*, 71(6), 519-529.
- Boyan B.D., Hummert T.W., Dean D.D., Schwartz Z. (1996). Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials*, 17(2), 137-146.
- Boyan B.D., Sylvia V.L., Liu Y., Sagun R., Cochran D.L., Lohmann C.H., Schwartz Z. (1999). Surface roughness mediates its effects on osteoblasts via protein kinase A and phospholipase A 2. *Biomaterials*, 20(23), 2305-2310.
- Bragdon C.R., Burke D., Lowenstein J.D., O'Connor D.O., Ramamurti B., Jasty M., Harris W.H. (1996). Differences in stiffness of the interface between a cementless porous implant and cancellous bone in vivo in dogs due to varying amounts of implant motion. *The Journal of Arthroplasty*, 11(8), 945-951.
- Brånemark, P., (2005). *The Osseointegration Book: From Calvarium To Calcaneus*. Berlin, Chicago: Quintessence.
- Brånemark P., Adell R., Breine U., Hansson B., Lindström J., Ohlsson A. (1969). Intra-Osseous Anchorage of Dental Prostheses. I. Experimental Studies. *Scandinavian Journal of Plastic Reconstructive Surgery*, 3(2), 81-100.
- Branemark P., Zarb G., Albrektsson T. (1986). *Tissue-Integrated Prostheses. Osseointegration in Clinical Dentistry*. Chicago: Quintessence Publ. Co. Inc.
- Branemark P.I., Hansson B.O., Adell R., Breine U., Lindstrom J., Hallen O., Ohman A. (1977). Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scandinavian Journal of Plastic Reconstructive Surgery*, 16:1-132.

- Brånemark R., Emanuelsson L., Palmquist A., Thomsen P. (2011). Bone response to laser-induced micro-and nano-size titanium surface features. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 7(2), 220-227.
- Brasseur M., Brogniez V., Grégoire V., Reychler H., Lengelé B., D'Hoore W., Nyssen-Behets C. (2006). Effects of irradiation on bone remodelling around mandibular implants: an experimental study in dogs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 35(9), 850-855.
- Breme J., Steinhäuser E., Paulus G. (1988). Commercially pure titanium Steinhäuser plate-screw system for maxillofacial surgery. *Biomaterials*, 9(4), 310-313.
- Browne M., Gregson P.J. (2000). Effect of mechanical surface pretreatment on metal ion release. *Biomaterials*, 21(4), 385-392.
- Bruder S.P., Caplan A.I. (1989). First Bone Formation and the Dissection of an Osteogenic Lineage in the Embryonic Chick Tibia is Revealed by Monoclonal Antibodies Against Osteoblasts. *Bone*, 10, 359.
- Brunski J.B., Puleo D.A., Nanci A. (2000). Biomaterials and Biomechanics of Oral and Maxillofacial Implants: Current Status and Future Developments. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 15, 15-46.
- Buckwalter J.A., Glimcher M.J., Cooper R.R., Recker R. (1995). Bone Biology. Part 1. Structure, Blood Supply, Cells, Matrix And Mineralization. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 77a, 1256.
- Buma P., Arts J.J., Gardeniers J. W., Verdonschot N., Schreurs B.W. (2008). No effect of bone morphogenetic protein-7 (OP-1) on the incorporation of impacted bone grafts in a realistic acetabular model. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 84(1), 231-239.
- Buser D., Belser U. C., Lang N. P. (1998). The original one-stage dental implant system and its clinical application. *Periodontology 2000*, 17(1), 106-118.

- Buser D., Mericske-Stern R., Bernard J.P. (1997). Long-term evaluation of non-submerged ITI implants. Part 1: 8-year life table analysis of a prospective multi-center study with 2359 implants. *Clinical Oral Implants Research*, 8, 161–172.
- Buser D., Nydegger T., Hirt H. P., Cochran D.L., Nolte L.P. (1998). Removal torque values of titanium implants in the maxilla of miniature pigs. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 13(5).
- Buser D., Schenk R.K., Steinemann S., Fiorellini J.P., Fox C.H., Stich H. (1991). Influence of surface characteristics on bone integration of titanium implants. A histomorphometric study in miniature pigs. *Journal of Biomedical Materials Research*, 25(7), 889-902.
- Butt A. J., Firth S.M., Baxter R.C. (1999). The IGF axis and programmed cell death. *Immunology and Cell Biology*, 77(3), 256-262.
- Callahan B.C., Lisecki E.J., Banks R.E., Dalton J.E., Cook S.D., Wolff J.D. (1995). The effect of warfarin on the attachment of bone to hydroxyapatite-coated and uncoated porous implants. *Journal of Bone and Joint Surgery, American Volume*, 77(2), 225-230.
- Callens A. (1998). Growth factors in periodontal regeneration. Chemicals in Periodontics. Eds, Lang&Karring Lindhe, 284-302.
- Cameron H.U., Pilliar R.M., Macnab I. (1973). The effect of movement on the bonding of porous metal to bone. *Journal of Biomedical Materials Research*, 7(4), 301-311.
- Campoccia D., Arciola C.R., Cervellati M., Maltarello M.C., Montanaro L. (2003). In vitro behaviour of bone marrow-derived mesenchymal cells cultured on fluorohydroxyapatite-coated substrata with different roughness. *Biomaterials*, 24(4), 587-596.
- Carlsson L., Röstlund T., Albrektsson B., Albrektsson T., Brånemark P. (1986). Osseointegration of Titanium Implants. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 57(4), 285-9.
- Carter D.R., Giori N.J. (1991). Effect of mechanical stress on tissue differentiation in the bony implant bed. *The Bone-Biomaterial Interface*, 367-379.

Casati M.Z., De Vasconcelos Gurgel B.C., Goncalves P.F., Pimentel S.P., Da Rocha Nogueira Filho G., Nociti F.H., Jr. Sallum E.A. (2007). Platelet-Rich Plasma Does Not Improve Bone Regeneration Around Peri-Implant Bone Defects-A Pilot Study in Dogs. *International Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, 36, 132-136.

Castellani R., de Ruijter A., Renggli H., Jansen J. (1999). Response of rat bone marrow cells to differently roughened titanium discs. *Clinical Oral Implants Research*, 10(5), 369-378.

Celis, J.E. (1998). Cell biology: A laboratory handbook, Vol. 2. Academic Press, San Diego, CA.

Chacon G.E., Stine E.A., Larsen P.E., Beck F.M., McGlumphy E.A. (2006). Effect of alendronate on endosseous implant integration: an in vivo study in rabbits. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 64(7), 1005-1009.

Chandrasekhar S., Harvey A.K. (1996). Modulation of PDGF mediated osteoblast chemotaxis by leukemia inhibitory factor LIF. *Journal of Cellular Physiology*, 169(3), 481-490.

Chang P.C., Liu B.Y., Liu C.M., Chou H.H., Ho M.H., Liu H.C., Wang D.M., Hou L.T. (2007). Bone Tissue Engineering With Novel Rbmp2- Plla Composite Scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research*, 81, 771-780.

Chang P.C. (2009). Functional Assessments Of Platelet-Derived Growth Factor Gene Delivery On Accelerating Oral Implant Osseointegration. Ann Arbor: University Of Michigan.

Chappard D., Aguado E., Huré G., Grizon F., Basle M.F. (1999). The early remodeling phases around titanium implants: a histomorphometric assessment of bone quality in a 3-and 6-month study in sheep. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 14(2), 189-196.

Chikazu D., Tomizuka K., Ogasawara T., Saijo H., Koizumi T., Mori Y., Takato T. (2007). Cyclooxygenase-2 activity is essential for the osseointegration of dental implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36(5), 441-446.

- Cho Y.D., Shin J.C., Kim H.L., Gerelmaa M., Yoon H.I., Ryoo H.M., Han J.S. (2014). Comparison of the osteogenic potential of titanium-and modified zirconia-based bioceramics. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4442-4452.
- Choukroun J., Diss A., Simonpieri A., Girard M.O., Schoeffler C., Dohan S.L., Dohan A.J., Mouhyi J., Dohan D.M. (2006). 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 Endodontology*, 101, 299-303.
- Cochran D.L., Buser D., Ten Bruggenkate C.M., Weingart D., Taylor T.M., Bernard J. P., Simpson J.P. (2002). The use of reduced healing times on ITI® implants with a sandblasted and acid-etched (SLA) surface. *Clinical Oral Implants Research*, 13(2), 144-153.
- Cochran D.L., Nummikoski P.V., Higginbottom F.L., Hermann J.S., Makins S.R., Buser D. (1996). Evaluation of an endosseous titanium implant with a sandblasted and acid-etched surface in the canine mandible: radiographic results. *Clinical Oral Implants Research*, 7(3), 240-252.
- Colnot C., Romero D. M., Huang S., Rahman J., Currey J.A., Nanci A., Brunski J.B., Helms J.A. (2007). Molecular Analysis of Healing at a Bone-Implant Interface. *Journal of Dental Research*, 86, 862-867.
- Cook S.D., Barrack R.L., Dalton J.E., Thomas K.A., Brown T.D. (1995). Effects of indomethacin on biologic fixation of porous-coated titanium implants. *The Journal of Arthroplasty*, 10(3), 351-358.
- Cook S.D., Thomas K.A., Delton J.E., Volkman T.K., Whitecloud T.S., Key J.F. (1992). Hydroxylapatite coating of porous implants improves bone ingrowth and interface attachment strength. *Journal of Biomedical Materials Research*, 26(8), 989-1001.
- Corigliano M., Sacco L., Baldoni E. (2011). The CGF-A Therapeutic Proposal For Regenerative Medicine, *e-Dentico*, 1-29, 48-64.

- Cooper L.F., Harris C.T., Bruder S.P., Kowalski R., Kadiyala S. (2001). Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis. *Journal of Dental Research*, 80(1), 314-320.
- Cooper L.F., Masuda T., Yliheikkilä P.K., Felton D.A. (1998). Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part II. In vitro studies. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 13(2), 163-174.
- Cooper L.F., Masuda T., Whitson S. W., Yliheikkilä P., Felton, D.A. (1999). Formation of mineralizing osteoblast cultures on machined, titanium oxide grit-blasted, and plasma-sprayed titanium surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 14(1), 37-47.
- Craig, R.G., Powers, J.M. (2000). *Restorative Dental Materials*. St. Louis, Missouri: Elsevier Mosby.
- Curtis A., Wilkinson C. (1997). Topographical control of cells. *Biomaterials*, 18(24), 1573-1583.
- Çetin Ü. (2012). Aşırı atrofik mandibulada farklı implant tasarımlarının 3 boyutlu sonlu elemanlar analizi ile değerlendirilmesi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.
- Dahners L.E., Mullis B.H. (2004). Effects of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs on Bone Formation and Soft-Tissue Healing. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 12(3), 139-143.
- Dalby M.J., Di Silvio L., Harper E. J., Bonfield W. (2001). Initial interaction of osteoblasts with the surface of a hydroxyapatite-poly (methylmethacrylate) cement. *Biomaterials*, 22(13), 1739-1747.
- Darby I.B., Morris K.H. (2013). A systematic review of the use of growth factors in human periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*, 84(4), 465-476.
- David A., Eitenmüller J., Muhr G., Pommer A., Bär H.F., Ostermann P.A.W., Schildhauer T.A. (1995). Mechanical and histological evaluation of hydroxyapatite-coated, titanium-coated and grit-blasted surfaces under weight-bearing conditions. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 114(2), 112-118.



- Davies J.E. (1998). Mechanisms of endosseous integration. *International Journal of Prosthodontics*, 11(5).
- Davies J.E. (2003). Understanding peri-implant endosseous healing. *Journal of Dental Education*, 67(8), 932-949.
- Davis J.M. (1994). Basic cell culture: a practical approach (No. Sirsi) i9780199634347).
- Dayer R., Badoud I., Rizzoli R., Ammann P. (2007). Defective implant osseointegration under protein undernutrition: prevention by PTH or pamidronate. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(10), 1526-1533.
- DeCarlo A.A., Whitelock J.M. (2006). The role of heparan sulfate and perlecan in bone-regenerative procedures. *Journal of Dental Research*, 85(2), 122-132.
- Degidi M., Perrotti V., Piattelli A., Iezzi G. (2010). Mineralized bone-implant contact and implant stability quotient in 16 human implants retrieved after early healing periods: a histologic and histomorphometric evaluation. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 25: 45-48.
- De Jonge L.T., Leeuwenburgh S.C., Wolke J.G., Jansen J.A. (2008). Organic-inorganic surface modifications for titanium implant surfaces. *Pharmaceutical Research*, 25(10), 2357-2369.
- de Mos M., van der Windt A.E., Jahr H., van Schie H.T., Weinans H., Verhaar J.A., van Osch G.J. (2008). Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *The American Journal of Sports Medicine*, 36(6), 1171-1178.
- Deligianni D.D., Katsala N., Ladas S., Sotiropoulou D., Amedee J., Missirlis Y.F. (2001). Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti-6Al-4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption. *Biomaterials*, 22(11), 1241-1251.
- Denissen H.W., Kalk W., De Nieuport H.M., Maitha J.C., Van de Hooff A. (1990). Mandibular bone response to plasma-sprayed coatings of hydroxyapatite. *International Journal of Prosthodontics*, 3(1).

Dergin C. (2006). ITI dental implant sisteminde hemen yüklemenin marjinal kemik kaybına ve implantın stabilitesine olan etkisinin değerlendirilmesi. Doktora tezi. İstanbul.

Deuel T.F., Senior R.M., Huang J.S., Griffin G.L. (1982). Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *Journal of Clinical Investigation*, 69(4), 1046.

D'Ippolito G., Schiller P.C., Ricordi C., Roos B.A., Howard G.A. (1999). Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(7), 1115-1122.

Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L., Dohan A.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 Endodontology*, 101, E37-44.

Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L., Dohan A.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 Endodontology*, 101, E45-50.

Dohan D.M., Choukroun J., Diss A., Dohan S.L., Dohan A.J., Mouhyi, J., Gogly, B. (2006c). 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 Endodontology*, 101, E51-55.

Dohan D.M., Del Corso M., Charrier J.B. (2007). Cytotoxicity analyses of Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF) on a wide range of human cells: The answer to a commercial controversy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 103(5), 587-593.

Dohan Ehrenfest D.M., de Peppo G.M., Doglioli P., Sammartino G. (2009). Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, 27(1), 63-69.

- Dolder J.V.D., Mooren R., Vloon A.P., Stoelinga P.J., Jansen J.A. (2006). Platelet-rich plasma: quantification of growth factor levels and the effect on growth and differentiation of rat bone marrow cells. *Tissue Engineering*, 12(11), 3067-3073.
- Donley T.G., Gillette W.B. (1991). Titanium Endosseous Implant-Soft Tissue Interface: A Literature Review. *Journal of Periodontology*, 62(2), 153-60.
- Duyck J., Vandamme K., Geris L., Van Oosterwyck H., De Cooman M., Vandersloten J., Naert I. (2006). The influence of micro-motion on the tissue differentiation around immediately loaded cylindrical turned titanium implants. *Archives of Oral Biology*, 51(1), 1-9.
- Duymuş Z.Y., Güngör H. (2013). Dental İmplant Materyalleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 23(1), 142-152.
- Eberhardt C., Habermann B., Müller S., Schwarz M., Bauss F., Kurth A.H. (2007). The bisphosphonate ibandronate accelerates osseointegration of hydroxyapatite-coated cementless implants in an animal model. *Journal of Orthopaedic Science*, 12(1), 61-66.
- Eberhardt C., Habermann B., Tiemann S., Bauss F., Kurth A.A. (2006). Improvement of Osseointegration of Cementless Metal Implant under Ibandronate is dose-dependent. *Bone*, 38(3), 48.
- Eberhardt C., Stumpf U., Brankamp J., Schwarz M., Kurth A.H. (2006). Osseointegration of cementless implants with different bisphosphonate regimens. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 447, 195-200.
- Eder A., Watzek G. (1999). Treatment of a patient with severe osteoporosis and chronic polyarthritis with fixed implant-supported prosthesis: a case report. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 14(4), 587-592.
- Ergun, G., Egilmez, F., Cekic-Nagas, I., Karaca, İ. R., Bozkaya, S. (2013). Effect of Platelet-Rich Plasma on the Outcome of Early Loaded Dental Implants: A 3-Year Follow-up Study. *Journal of Oral Implantology*, 39(1), 256-263.

- Eğilmez F., Yıldırım Biçer A.Z., Ergün G. (2010). Zirkonyumla Güçlendirilmiş Seramikler ve Dental İmplantolojide Kullanımı. *Cumhuriyet Dental Journal*, 13(2),72-80.
- Ehrenfest D.M.D., 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 Endodontology*, 108(3), 341-352.
- Elias C.N., Oshida, Y., Lima J.H.C., Muller C. A. (2008). Relationship between surface properties (roughness, wettability and morphology) of titanium and dental implant removal torque. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 1(3), 234-242.
- Eriksson R.A., Albrektsson T., Magnusson B. (1984). Assessment of Bone Viability After Heat Trauma. A Histological, Histochemical and Vital Microscopic Study in The Rabbit. *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery*, 18, 261-268.
- Fakhry A., Ratisoontorn C., Vedhachalam C., Salhab I., Koyama E., Leboy P., Nah H.D. (2005). Effects of FGF-2/-9 in calvarial bone cell cultures: differentiation stage-dependent mitogenic effect, inverse regulation of BMP-2 and noggin, and enhancement of osteogenic potential. *Bone*, 36(2), 254-266.
- Fang Y., Wang L., Du F.L., Liu W.J., Ren G.L. (2013). Effects of insulin-like growth factor I on alveolar bone remodeling in diabetic rats. *Journal of Periodontal Research*, 48(2), 144-150.
- Feng X., Clark R.A., Galanakis D., Tonnesen M.G. (1999). Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of  $\alpha$ v/ $\beta$ 3 mRNA by fibrin1. *Journal of Investigative Dermatology*, 113, 913-919.
- Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669-676.

Ferreira C.F., Carriel Gomes M.C., Granjeiro J.M., Oliveira Simões C.M., Magini R.D.S. (2005). Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clinical Oral Implants Research*, 16(4), 456-460.

Fini M., Giardino R. (2002). In vitro and in vivo tests for the biological evaluation of candidate orthopedic materials: Benefits and limits. *Journal of Applied Biomaterials Biomechanics: JABB*, 1(3), 155-163.

Fini M., Giavaresi G., Torricelli P., Borsari V., Giardino R., Nicolini A., Carpi A. (2004). Osteoporosis and biomaterial osteointegration. *Biomedicine Pharmacotherapy*, 58(9), 487-493.

Fini M., Giavaresi G., Torricelli P., Krajewski A., Ravaglioli A., Belmonte M.M., Giardino R. (2001). Biocompatibility and osseointegration in osteoporotic bone. *Bone Joint Journal*, 83(1), 139-143.

Fini M., Nicoli A.N., Gandolfi M.G., Mattioli B.M., Giavaresi G., Zucchini C., Rocca M. (1997). Biomaterials for orthopedic surgery in osteoporotic bone: a comparative study in osteopenic rats. *The International Journal of Artificial Organs*, 20(5), 291-297.

Fini M., Nicoli Aldini N., Gandolfi M.G., Mattioli Belmonte M., Giavaresi G., Zucchini C., De Benedittis A., Amati S, Ravaglioli A., Krayewski A., Rocca M., Fontana S., Olmedo D.G., Linares J.A., Guglielmotti M.B., Crosa M.E. (2004). *Effect Of Platelet-Rich Plasma On The Peri-Implant Bone Response: An Experimental Study*. *Implant Dentistry*, 13, 73-78.

Floege J., Topley N., Resch K. (1991). Regulation of mesangial cell proliferation. *American Journal of Kidney Diseases*, 17(6), 673-676.

Foster B.L., Somerman M.J. (2005). Regenerating the periodontium: is there a magic formula?. *Orthodontics Craniofacial Research*, 8(4), 285-291.

Franchi M., Bacchelli B., Martini D., De Pasquale V., Orsini E., Ottani V., Ruggeri A. (2004). Early detachment of titanium particles from various different surfaces of endosseous dental implants. *Biomaterials*, 25(12), 2239-2246.

- Franchi M., Fini M., Martini D., Orsini E., Leonardi L., Ruggeri A., Giavaresi G., Ottani, V. (2005). Biological Fixation of Endosseous Implants. *Micron*, 36, 665-671.
- Frosch K.H., Sondergeld I., Dresing K., Rudy T., Lohmann C.H., Rabba J., Stuermer K.M. (2003). Autologous osteoblasts enhance osseointegration of porous titanium implants. *Journal of Orthopaedic Research*, 21(2), 213-223.
- Fuerst G., Gruber R., Tangl S., Sanroman F., Watzek G. (2003). Enhanced Bone-To-Implant Contact by Platelet-Released Growth Factors in Mandibular Cortical Bone: A Histomorphometric Study In Minipigs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 18, 685-690.
- Futami T., Fujii N., Ohnishi H., Taguchi N., Kusakari H., Ohshima H., Maeda T. (2000). Tissue Response to Titanium Implants in the Rat Maxilla: Ultrastructural And Histochemical Observations Of The Bone-Titanium Interface. *Journal of Periodontology*, 71, 287-298.
- Gabet Y., Müller R., Levy J., Dimarchi R., Chorev M., Bab I., Kohavi D. (2006). Parathyroid hormone 1–34 enhances titanium implant anchorage in low-density trabecular bone: a correlative micro-computed tomographic and biomechanical analysis. *Bone*, 39(2), 276-282.
- Gailit J., Clark R.A. (1994). Wound repair in the context of extracellular matrix. *Current Opinion in Cell Biology*, 6(5), 717-725.
- Garant, P.R. (2003). Oral Cells And Tissues. Illinois: Quintessence Publishing Co. Inc., Chapter 7-8.
- Garbuz D.S., Hu Y., Kim W.Y., Duan K., Masri B.A., Oxland, T. R., Duncan, C. P. (2008). Enhanced gap filling and osteoconduction associated with alendronate-calcium phosphate-coated porous tantalum. *The Journal of Bone Joint Surgery*, 90(5), 1090-1100.
- Gartland A., Buckley K.A., Dillon J.P., Curran J.M., Hunt J.A., Gallagher J.A. (2005). Isolation and culture of human osteoblasts. *Human Cell Culture Protocols*, 29-54.

- Gartner, L.P., Hiatt, J.I. (1997). Cartilage And Bone. Color Textbook Of Histology., Saint Louis: Saunders, 114-130.
- Geissler U., Hempel U., Wolf C., Scharnweber D., Worch H., Wenzel K.W. (2000). Collagen type I-coating of Ti6Al4V promotes adhesion of osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 51(4), 752-760.
- Giannobile W.V. (1996). Periodontal Tissue Engineering By Growth Factors. *Bone*, 19, 23-37.
- Giannobile W.V., Whitson S.W., Lynch S.E. (1997). Non-coordinate control of bone formation displayed by growth factor combinations with IGF-I. *Journal of Dental Research*, 76(9), 1569-1578.
- Giori N.J., Ryd L., Carter D.R. (1995). Mechanical influences on tissue differentiation at bone—cement interfaces. *The Journal of Arthroplasty*, 10(4), 514-522.
- Gomez-Lechon M.J., Donato M.T., Castell J.V., Jover R. (2003). Human hepatocytes as a tool for studying toxicity and drug metabolism. *Current Drug Metabolism*, 4(4), 292-312.
- Goodman S.B., Ma T., Mitsunaga L., Miyanishi K., Genovese M.C., Smith R.L. (2005). Temporal effects of a COX-2-selective NSAID on bone ingrowth. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 72(3), 279-287.
- Gorski J.P. (1998). Is All Bone The Same? Distinctive Distributions and Properties of Noncollagenous Matrix Proteins in Lamellar and Woven Bone Imply the Existence of Different Underlying Osteogenic Mechanisms. *Critical Review in Oral Biology and Medicine*, 9, 201.
- Gotfredsen K., Nimb L., Hjørting-hansen E., Jensen J. S., Holmén A. (1992). Histomorphometric and removal torque analysis for TiO<sub>2</sub>hyphen; blasted titanium implants. An experimental study on dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 3(2), 77-84.
- Goto H., Matsuyama T., Miyamoto M., Yonamine Y., Izumi Y. (2006). Platelet-rich plasma/osteoblasts complex induces bone formation via osteoblastic differentiation

following subcutaneous transplantation. *Journal of Periodontal Research*, 41(5), 455-462.

Göçer B. (2010). Dişsel İmplant Sistemlerinin Gerilme Analizi. Bitirme Projesi, Dokuz Eylül Üniversitesi, İzmir.

Grandin H.E., Berner S., Dard M. (2012). Review of Titanium Zirkonium (TiZr) Alloys for Use in Endosseous Dental Implants. *Materials*, 5, 1348-1360.

Graves D.T., Valentin-Opran A., Delgado R., Valente A.J., Mundy G., Piche J. (1989). The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connective Tissue Research*, 23(2-3), 209-218.

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.

Gruber R., Varga F., Fischer M.B., Watzek G. (2002). Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clinical Oral Implants Research*, 13(5), 529-535.

Guizzardi S., Galli C., Martini D., Belletti S., Tinti A., Raspanti M., Scandroglio R. (2004). Different titanium surface treatment influences human mandibular osteoblast response. *Journal of Periodontology*, 75(2), 273-282.

Gül E.B. (2009). Farklı Açılarda Yerleştirilen İmplantlarla Desteklenen Barlı Tutucularda Kemikteki Gerilme Dağılımının İncelenmesi. Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Günay A., Durakbaşı N., Katiboğlu A.B. (2013). Dental İmplantolojide Kullanılan G4 Saf Titanyum İmplantların Kumlama ve Asitleme Teknikleriyle Oluşturulan Yüzey Modifikasyonlarının İmalat Aşamalarını Ele Alarak Değerlendirilmesi. *Mühendis Ve Makine*, 54(641), 37-43.

Györgyey Á., Ungvári K., Kecskeméti G., Kopniczky J., Hopp B., Oszkó A., Turzó K. (2013). Attachment and proliferation of human osteoblast-like cells (MG-63) on laser-



ablated titanium implant material. *Materials Science and Engineering: C*, 33(7), 4251-4259.

Hallgren C. (2003). An in vivo study of bone response to implants topographically modified by laser micromachining. *Biomaterials*, 24(5): 701-710.

Hannink G., Aspenberg P., Schreurs B. W., Buma P. (2006). High doses of OP-1 inhibit fibrous tissue ingrowth in impaction grafting. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 452, 250-259.

Hayashi K., Uenoyama K., Mashima T., Sugioka Y. (1994). Remodelling of bone around hydroxyapatite and titanium in experimental osteoporosis. *Biomaterials*, 15(1), 11-16.

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 Endodontology*, 108, 707-713.

Herrera B.S., Coimbra L.S., Bastos A.S., Teixeira S.A., Steffens J.P., Muscara M.N., Spolidorio L.C. (2012). Platelet-rich plasma stimulates cytokine expression and alkaline phosphatase activity in osteoblast-derived osteosarcoma cells. *Archives of Oral Biology*, 57(9), 1282-1289.

Hobo, S., Ichida, E., Garcia, L. (1991). Osseointegration and Occlusal Rehabilitation. 3rd Ed. Tokyo: Quintessence Publishing Co., Chapter 1.

Hock J.M., Canalis E. (1994). Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. *Endocrinology*, 134(3), 1423-1428.

Hofmann A.A., Bloebaum R.D., Koller K.E., Lahav A. (2006). Does celecoxib have an adverse effect on bone remodeling and ingrowth in humans?. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 452, 200-204.

- Hofstetter W., Sehr H., Wild M.D., Portenier J., Gobrecht J., Hunziker E.B. (2013). Modulation of human osteoblasts by metal surface chemistry. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 101(8), 2355-2364.
- Hollinger, J.O., Buck, C.D., Bruder, P.S. (1999). Biology of Bone Healing: Its Impact On Clinical Therapy. In "Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery And Periodontics". 1st Edition, Quintessence Publishing, Chap 1.
- Huang F.M., Yang S.F., Zhao J.H., Chang Y.C. (2010). Platelet-rich fibrin increases proliferation and differentiation of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*, 36(10), 1628-1632.
- Huang Y.H., Polimeni G., Qahash M., Wikesjö U.M. (2008). Bone morphogenetic proteins and osseointegration: current knowledge–future possibilities. *Periodontology 2000*, 47(1), 206-223.
- Hughes F.J., Aubin J.E., Heersche J.N. (1992). Differential chemotactic responses of different populations of fetal rat calvaria cells to platelet-derived growth factor and transforming growth factor  $\beta$ . *Bone and Mineral*, 19(1), 63-74.
- Huiskes R., Van Driel W.D., Prendergast P.J., Soballe K. (1997). A Biomechanical Regulatory Model for Periprosthetic Fibrous-Tissue Differentiation. *Journal of Material Science: Materials in Medicine*, 8, 785-788.
- Hüdayioğlu M.K. (2003). Çeşitli restoratif materyallerin sitotoksik açıdan değerlendirilmesi. Doktora Tezi. İstanbul.
- Iseki S., Wilkie A.O., Morriss-Kay G.M. (1999). Fgfr1 and Fgfr2 have distinct differentiation-and proliferation-related roles in the developing mouse skull vault. *Development*, 126(24), 5611-5620.
- Ishaug-Riley S.L., Crane-Kruger G.M., Yaszemski M.J., Mikos A.G. (1998). Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 19(15), 1405-1412.

- Ito H., Sasaki H., Saito K., Honma S., Yajima Y., Yoshinari M. (2013). Response of osteoblast-like cells to zirconia with different surface topography. *Dental Materials Journal*, 32(1), 122-129.
- Javed F., Al-Askar M., Al-Rasheed A., Al-Hezaimi K. (2011). Significance of the platelet-derived growth factor in periodontal tissue regeneration. *Archives of Oral Biology*, 56(12), 1476-1484.
- Jokstad, A. (2009). Osseointegration and Dental Implants. In. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, p,419.
- Jovanovic S.A., Hunt D. R., Bernard G. W., Spiekermann H., Wozney J. M., Wikesjo U. M. (2007). Bone Reconstruction Following Implantation of Rbmp-2 and Guided Bone Regeneration in Canine Alveolar Ridge Defects. *Clinical Oral Implants Research*, 18, 224-230.
- Jung G.U., Lee S.K., Ji S., Pang E.K. (2015). The effects of platelet-rich plasma on the proliferation and release of growth factors from periodontal ligament cells. *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 12(6), 442-448.
- Jungueria Carlos L., Carnerio J., Kelley O. (1999). Bone In: Basic Histology. *Appleton And Lange*, 132-151.
- Junguiera L.C., Carneiro J., Kelley R.O. (1998). Temel Histoloji. 8.Baskı. İstanbul: Barış Kitabevi Ltd. Şti., 132-151.
- Kaiser P.K. (2006). Antivascular endothelial growth factor agents and their development: therapeutic implications in ocular diseases. *American Journal of Ophthalmology*, 142(4), 660-668.
- Kaluđerović M.R., Schreckenbach J.P., Graf H.L. (2014). First titanium dental implants with white surfaces: preparation and in vitro tests. *Dental Materials*, 30(7), 759-768.
- Kaluđerović M.R., Schreckenbach J.P., Graf H.L. (2016). Plasma-electrochemical deposition of porous zirconia on titanium-based dental material and in vitro interactions with primary osteoblasts cells. *Journal of Biomaterials Applications*, 30(6), 711-721.

Kanno T., Takahashi T., Tsujisawa T., Ariyoshi W., Nishihara T. (2005). Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 63(3), 362-369.

Kawase T., Okuda K., Saito Y., Amizuka N., Suzuki H., Yoshie H. (2005). Platelet-rich plasma provides nucleus for mineralization in cultures of partially differentiated periodontal ligament cells. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Animal*, 41(5-6), 171-176.

Kawase T., Okuda K., Wolff L.F., Yoshie H. (2003). Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *Journal of Periodontology*, 74(6), 858-864.

Kaya A.S. (2010). SLA ve SLActive Titanyum İmplantların Neonatal Sıçan Kalvaryal Osteoblast Hücreleri Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, İstanbul.

Keskin D., Tezcaner A., Bilgili H., Geçit M.R. (2007). Değişik Kompozisyonlarda Biyocam/Kalsiyum Sülfat Temelli Kompozit Malzemelerin Geliştirilmesi, Mekanik ve Biyoetkinlik Özelliklerinin İncelenmesi. Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Bilimi Bölümü.

Kılınç Y., Ergüven S. S., Erkmekçi E. Dental İmplant Yüzey Özellikleri ve Biyolojik Ortamla Etkileşimler: Bölüm I: Doku İmplant Etkileşimleri ve Moleküler Olaylar. Yayın Kuralları, 816.

Kieswetter K., Schwartz Z., Hummert T.W., Cochran D.L., Simpson J., Dean, D.D., Boyan B. D. (1996). Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells. *Journal of Biomedical Materials Research*, 32(1), 55-63.

Kim H.J., Kim S.H., Kim M.S., Lee E.J., Oh H.G., Oh W.M., Koh J.T. (2005). Varying Ti-6Al-4V surface roughness induces different early morphologic and molecular responses in MG63 osteoblast-like cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74(3), 366-373.

Kiremitçi M. Doku Mühendisliği. (1993). *Bilim ve Teknik Dergisi*, 26(307), 465-466.

Kleespies A., Guba M., Jauch K.W., Bruns C.J. (2004). Vascular endothelial growth factor in esophageal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, 87(2), 95-104.

Knabe C., Gildenhaar R., Berger G., Ostapowicz W., Fitzner R., Radlanski R.J., Gross U. (1997). Morphological evaluation of osteoblasts cultured on different calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*, 18(20), 1339-1347.

Koh E.T., Torabinejad M., Pitt Ford T.R., Brady K., McDonald F. (1997). Mineral trioxide aggregate stimulates a biological response in human osteoblasts. *Journal of Biomedical Materials Research*, 37(3), 432-439.

Kokubo T., Kim H.M., Kawashita M. (2003). Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*, 24(13), 2161-2175.

Kolancı C. (1997). Oral teofilin tedavisindeki kişilerde kemik homeostazisinin osteoblastik/osteoklastik göstergeler ve serum pirolidaz aktivitesi ile araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı. İstanbul.

Korkusuz F., Tamin E., Yetkinler D.N., Timuçin M., Öztürk A., Korkusuz P. (2011). Yapay Kemik Dokusu. *Totbid Dergisi*, 10(2), 134-142.

Kou W., Akasaka T., Watari F., Sjögren G. (2013). An in vitro evaluation of the biological effects of carbon nanotube-coated dental zirconia. *ISRN Dentistry*, 2013.

Ku Y., Chung C.P., Jang J.H. (2005). The effect of the surface modification of titanium using a recombinant fragment of fibronectin and vitronectin on cell behavior. *Biomaterials*, 26(25), 5153-5157.

Kudo M., Matsui Y., Ohno K., Michi K.I. (2001). A histomorphometric study of the tissue reaction around hydroxyapatite implants irradiated after placement. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 59(3), 293-300.

Kurachi T., Nagao H., Nagura H., Enomoto S. (1997). Effect of a titanium surface on bone marrow-derived osteoblastic cells in vitro. *Archives of Oral Biology*, 42(6), 465-468.

- Kutlu M. (2006), Mineral ve kemik metabolizması Cecil Textbook of medicine 22. baskı çevirisi, Goldman L, Auseiello D, Ünal S, Güneş kitabevi, 1545.
- Lan J., Wang Z., Wang Y., Wang J., Cheng X. (2006). The Effect of Combination of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 and Basic Fibroblast Growth Factor or Insulin-Like Growth Factor-I on Dental Implant Osseointegration by Confocal Laser Scanning Microscopy. *Journal of Periodontology*, 77, 357-363.
- Langer R., Vacanti J.P. (1993). Tissue Engineering. *Science*, 260, 920-926.
- Le Guehennec L., Soueidan A., Layrolle P., Amouriq Y. (2007). Surface Treatments of Titanium Dental Implants For Rapid Osseointegration. *Dental Materials*, 23, 844-854.
- Lee M.B. (1997). Bone morphogenetic proteins: background and implications for oral reconstruction. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(6), 355-365.
- Lee T.M., Tsai R.S., Chang E., Yang C.Y., Yang M.R. (2002). Biological responses of neonatal rat calvarial osteoblasts on plasma-sprayed HA/ZrO<sub>2</sub> composite coating. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 13(3), 281-287.
- Lefebvre C.A., Schuster G.S. (1994). Biocompatibility of visible light-cured resin systems in prosthodontics. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 71(2), 178-185.
- Leucht P., Kim J.B., Wazen R., Currey J.A., Nanci A., Brunski J.B., Helms J.A. (2007). Effect of mechanical stimuli on skeletal regeneration around implants. *Bone*, 40(4), 919-930.
- Li J.K., Chang W.H., Lin J.C., Ruaan R.C., Liu H.C., Sun J.S. (2003). Cytokine release from osteoblasts in response to ultrasound stimulation. *Biomaterials*, 24(13), 2379-2385.
- Lind M. (1998). Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta orthopaedica Scandinavica*. Supplementum, 283, 2-37.
- Linder L., Obrant K., Boivin G. (1989). Osseointegration of metallic implants: II. Transmission electron microscopy in the rabbit. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 60(2), 135-139.

- Lindh C., Petersson A., Klinge B., Nilsson M. (1997). Trabecular Bone Volume and Bone Mineral Density in the Mandible. *Dentomaxillofacial Radiology*, 26, 101-06.
- Lionberger D.R., Noble P.C. (2005). Celecoxib does not affect osteointegration of cementless total hip stems. *The Journal of Arthroplasty*, 20, 115-122.
- Liu G., Shu C., Cui L., Liu W., Cao Y. (2008). Tissue-engineered bone formation with cryopreserved human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cryobiology*, 56(3), 209-215.
- Liu Y., Kalén A., Risto O., Wahlström O. (2002). Fibroblast proliferation due to exposure to a platelet concentrate in vitro is pH dependent. *Wound Repair and Regeneration*, 10(5), 336-340.
- Lossdörfer S., Schwartz Z., Wang L., Lohmann C.H., Turner J.D., Wieland M., Boyan B.D. (2004). Microrough implant surface topographies increase osteogenesis by reducing osteoclast formation and activity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 70(3), 361-369.
- Louis K.S., Siegel A.C. (2011). Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*, 7-12.
- Lucas P.A. (1989). Chemotactic response of osteoblast-like cells to transforming growth factor beta. *Bone*, 10(6), 459-463.
- Lucas P.A., Caplan A.I. (2009). Chemotactic response of embryonic limb bud mesenchymal cells and muscle-derived fibroblasts to transforming growth factor- $\beta$ . *Connective Tissue Research*.
- Lundquist R., Dziegiel M.H., Ågren M.S. (2008). Bioactivity and stability of endogenous fibrogenic factors in platelet-rich fibrin. *Wound Repair and Regeneration*, 16(3), 356-363.
- Lynch S.E., Buser D., Hernandez R.A., Weber H.P., Stich H., Fox, C.H., Williams, R.C. (1991). Effects of The Platelet-Derived Growth Factor/Insulin-Like Growth Factor-I Combination on Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants. Results of a Pilot Study In Beagle Dogs. *Journal of Periodontology*, 62, 710-716.

- Lynch S.E., Williams R.C., Poison A.M., Howell T.H., Reddy M.S., Zappa U.E., Antoniadis H.N. (1989). A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration. *Journal of Clinical Periodontology*, 16(8), 545-548.
- Macdonald C. (1990). Development of new cell lines for animal cell biotechnology. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10(2), 155-178.
- Maeda H., Fujii S., Tomokiyo A., Wada N., Akamine A. (2011). Periodontal tissue engineering: defining the triad. *Oral Craniofacial Tissue Engineering*, 1(4).
- Maniatopoulos C., Pilliar R.M., Smith D.C. (1986). Threaded versus porous-surfaced designs for implant stabilization in bone-endodontic implant model. *Journal of Biomedical Materials Research*, 20(9), 1309-1333.
- Marco F., Milena F., Gianluca G., Vittoria O. (2005). Peri-implant osteogenesis in health and osteoporosis. *Micron*, 36(7), 630-644.
- Marie P.J. (1999). Cellular and Molecular Alterations of Osteoblasts in Human Disorders of Bone Formation. *Histology and Histopathology*, 14, 525.
- Marinho V.C., Celletti R., Bracchetti G., Petrone G., Minkin C., Piattelli A. (2003). Sandblasted and acid-etched dental implants: a histologic study in rats. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 18(1).
- Marinucci L., Balloni S., Becchetti E., Belcastro S., Guerra M., Calvitti M., Locci P. (2006). Effect of titanium surface roughness on human osteoblast proliferation and gene expression in vitro. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 21(5).
- Marx R.E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 62: 489-496.
- Marx R.E. (2001). Platelet-Rich Plasma (Prp): What Is Prp And What Is Not Prp? *Implant Dentistry*, 10, 225-228.
- 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 Endodontology*, 85(6), 638-646.



- Marx R.E., Davies J.E. (2000). Platelet concentrate: a strategy for accelerating and improving bone regeneration. *Bone Engineering, Toronto: University of Toronto*, 447-453.
- Matin K., Nakamura H., Irie K., Ozawa H., Ejiri S. (2001). Impact of recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 On Residual Ridge Resorption After Tooth Extraction: An Experimental Study In The Rat. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 16, 400-411.
- Matsuo M., Nakamura T., Kishi Y., Takahashi K. (1999). Microvascular Changes After Placement of Titanium Implants: Scanning Electron Microscopy Observations of Machined and Titanium Plasma-Sprayed Implants in Dogs. *Journal of Periodontology*, 70, 1330-1338.
- Matsuura T., Hosokawa R., Okamoto K., Kimoto T., Akagawa Y. (2000). Diverse mechanisms of osteoblast spreading on hydroxyapatite and titanium. *Biomaterials*, 21(11), 1121-1127.
- McDonald A.R., Pogrel M.A., Sharma A. (1998). Effects of chemotherapy on osseointegration of implants: a case report. *Journal of Oral Implantology*, 24(1), 11-13.
- Mekikoglu S. (2008). Trombositten zengin plazmanın implant stabilitesi üzerindeki etkisinin rezonans frekans analizi ile incelenmesi Ankara: Gazi Üniversitesi, s:155.
- Meyer U., Joos U., Mythili J., Stamm T., Hohoff A., Fillies T., Stratmann U., Wiesmann H.P. (2004). Ultrastructural Characterization of the Implant/Bone Interface of Immediately Loaded Dental Implants. *Biomaterials*, 25, 1959-1967.
- Misch, C. (2005). *Dental Implant Prosthetics*. 1<sup>st</sup> Edition. St. Louis: Elsevier Mosby.
- Mombelli A., Cionca N. (2006). Systemic diseases affecting osseointegration therapy. *Clinical Oral Implants Research*, 17(S2), 97-103.
- Monov G., Fuerst G., Tepper G., Watzak G., Zechner W., Watzek G. (2005). The effect of platelet-rich plasma upon implant stability measured by resonance frequency analysis in the lower anterior mandibles. *Clinical Oral Implants Research*, 16: 461-465.

- Morais S., Sousa J.P., Fernandes M.H., Carvalho G.S. (1998). In vitro biomineralization by osteoblast-like cells I. Retardation of tissue mineralization by metal salts. *Biomaterials*, 19(1), 13-21.
- Murai K., Takeshita F., Ayukawa Y., Kiyoshima T., Suetsugu T., Tanaka T. (1996). Light and electron microscopic studies of bone-titanium interface in the tibiae of young and mature rats. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30(4), 523-533.
- Mustafa K., Wroblewski J., Hultenby K., Silva Lopez B., Arvidson K. (2000). Effects of titanium surfaces blasted with TiO<sub>2</sub> particles on the initial attachment of cells derived from human mandibular bone. *Clinical Oral Implants Research*, 11(2), 116-128.
- Mustoe T.A., Pierce G.F., Morishima C., Deuel T.F. (1991). Growth factor-induced acceleration of tissue repair through direct and inductive activities in a rabbit dermal ulcer model. *Journal of Clinical Investigation*, 87(2), 694.
- Nakano N., Nakai Y., Seo T. B., Yamada Y., Ohno T., Yamanaka A., Ide C. (2010). Characterization of conditioned medium of cultured bone marrow stromal cells. *Neuroscience Letters*, 483(1), 57-61.
- Nevins M.L., Karimbux N.Y., Weber H.P., Giannobile W.V., Fiorellini J.P. (1998). Wound healing around endosseous implants in experimental diabetes. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 13(5).
- Nevins M., Kirker-Head C., Wozney J.A., Palmer R., Graham D. (1996). Bone Formation in The Goat Maxillary Sinus Induced by Absorbable Collagen Sponge Implants Impregnated With Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2. *International Journal of Periodontics Restorative Dentistry*, 16, 8-19.
- Nielsen J.S., McNagny K.M. (2008). Novel functions of the CD34 family. *Journal of Cell Science*, 121(22), 3683-3692.
- Niinomi M. (2008). Metallic Biomaterials. *Journal of Artificial Organs*, 11, 105-10.
- Noff D., Pitaru S., Savion N. (1989). Basic fibroblast growth factor enhances the capacity of bone marrow cells to form bone-like nodules in vitro. *FEBS Letters*, 250(2), 619-621.

Ochiai H., Okada S., Saito A., Hoshi K., Yamashita H., Takato T., Azuma T. (2012). Inhibition of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) expression by prolonged transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) administration suppresses osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(27), 22654-22661.

Ohbayashi E., Matsushima K., Hosoya S., Abiko Y., Yamazaki M. (1999). Stimulatory effect of laser irradiation on calcified nodule formation in human dental pulp fibroblasts. *Journal of Endodontics*, 25(1), 30-33.

Okuda K., Kawase T., Momose M., Murata M., Saito Y., Suzuki H., Yoshie H. (2003). Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor- $\beta$  and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of Periodontology*, 74(6), 849-857.

Okuda K., Tai H., Tanabe K., Suzuki H., Sato T., Kawase T., Yoshiex H. (2005). Platelet-rich plasma combined with a porous hydroxyapatite graft for the treatment of intrabony periodontal defects in humans: a comparative controlled clinical study. *Journal of Periodontology*, 76(6), 890-898.

Oliva A., Della Ragione F., Salerno A., Riccio V., Tartaro G., Cozzolino A., Zappia V. (1996). Biocompatibility studies on glass ionomer cements by primary cultures of human osteoblasts. *Biomaterials*, 17(13), 1351-1356.

Ong J.L., Carnes D.L., Sogal A. (1999). Effect of transforming growth factor- $\beta$  on osteoblast cells cultured on 3 different hydroxyapatite surfaces. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 14, 217-25.

Oprea W.E., Karp J.M., Hosseini M.M., Davies J.E. (2003). Effect of platelet releasate on bone cell migration and recruitment in vitro. *Journal of Craniofacial Surgery*, 14(3), 292-300.

Orbak R., Öztürk M., Demir T. (2014). Rejeneratif Tedavide Güncel Yaklaşımlar. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 14 (2): 39-46.

Orsini G., Assenza B., Scarano A., Piattelli M., Piattelli A. (2000). Surface analysis of machined versus sandblasted and acid-etched titanium implants. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 15(6).

- Ortęga N., L'Faqihi F.E., Plouët J. (1998). Control of vascular endothelial growth factor angiogenic activity by the extracellular matrix. *Biology of the Cell*, 90(5), 381-390.
- Otsuki B., Takemoto M., Fujibayashi S., Neo M., Kokubo T., Nakamura T. (2006). Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*, 27(35), 5892-5900.
- Owen T.A., Aronow M., Shalhoub V., Barone L.M., Wilming L., Tassinari M.S., Stein, G.S. (1990). Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro: reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation during formation of the bone extracellular matrix. *Journal of Cellular Physiology*, 143(3), 420-430.
- Ozaki A. (2000). Role Of Fracture Hematoma And Periosteum During Fracture Healing İn Rats. Interaction Of Fracture Hematoma And The Periosteum in The İnitial Step Of The Healing Process. *Journal of Orthopaedic Science*, 5(1), 64-70.
- Ökte (Aytuğ) E. (1991). Kemik İçi Dental İmplantlarda Bağ Dokusu ve Kemik Birleşimi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 8(2), 171-182.
- Öncü E. (2013). Trombositten Zengin Fibrinin İmplant Stabilitesi Üzerindeki Etkisinin Rezonans Frekans Analizi İle İncelenmesi. Doktora Tezi. Başkent Üniversitesi, Ankara.
- Özyazgan D., Çetinkaya E. (2013). Osseointegrasyon'daki Güncel Gelişmeler. *Bilimsel Dergi*, Ocak/Şubat, 2-5.
- Pablos A.B., Ramalho S.A., König Jr, B., Furuse C., de Araújo V.C., Cury P.R. (2008). Effect of meloxicam and diclofenac sodium on peri-implant bone healing in rats. *Journal of Periodontology*, 79(2), 300-306.
- Pardun K., Treccani L., Volkmann E., Streckbein P., Heiss C., Gerlach J.W., Rezwan K. (2015). Magnesium-containing mixed coatings on zirconia for dental implants: mechanical characterization and in vitro behavior. *Journal of Biomaterials Applications*, 30(1), 104-118.

- Park C.Y. (2005). Surface properties of endosseous dental implants after NdYAG and CO<sub>2</sub> laser treatment at various energies. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 63(10): 1522-1527.
- Park H.C., Kim S.G., Oh J.S., You J.S., Kim J.S., Lim S.C., Ji, H. (2016). Early Bone Formation at a Femur Defect Using CGF and PRF Grafts in Adult Dogs: A Comparative Study. *Implant Dentistry*, 25(3), 387-393.
- Park J.Y., Davies J.E. (2000). Red blood cell and platelet interactions with titanium implant surfaces. *Clinical Oral Implants Research*, 11(6), 530-539.
- Park J.Y., Gemmell C.H., Davies J.E. (2001). Platelet interactions with titanium: modulation of platelet activity by surface topography. *Biomaterials*, 22(19), 2671-2682.
- Park J., Lutz R., Felszeghy E., Wiltfang J., Nkenke E., Neukam F.W., Schlegel K.A. (2007). The effect on bone regeneration of a liposomal vector to deliver BMP-2 gene to bone grafts in peri-implant bone defects. *Biomaterials*, 28(17), 2772-2782.
- Park Y.J., Lee Y.M., Lee J.Y., Seol Y.J., Chung C.P., Lee S.J. (2000). Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate-chitosan sponge for guided bone regeneration. *Journal of Controlled Release*, 67(2), 385-394.
- Pathan D.S., Doshi S.B., Muglikar S.D. (2015). Nanotechnology in Implants: The Future is Small. *Universal Research Journal of Dentistry*, 5, 8-13.
- Peev S., Atanasov D. (2007). Platelet-Rich Plasma - An Accelerator of The Secondary Stability Of Immediate Loaded Implants. *Journal Of IMAB*, 13, 38-40.
- Peter S.J., Miller M.J., Yasko A.W., Yaszemski M.J., Mikos A.G. (1998). Polymer concepts in tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*, 43(4), 422-427.
- Petrungaro P.S. (2001). Using Platelet-Rich Plasma To Accelerate Soft Tissue Maturation in Esthetic Periodontal Surgery. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 22, 729- 732.
- Philippart P., Brasseur M., Hoyaux D., Pochet R. (2003). Human Recombinant Tissue Factor, Platelet-Rich Plasma, And Tetracycline Induce A Highquality Human Bone

Graft: A 5-Year Survey. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 18, 411- 416.

Pilliar R.M., Lee J.M., Maniopoulos C.D.D.S. (1986). Observations on the effect of movement on bone ingrowth into porous-surfaced implants. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 208, 108-113.

Pitaru S., Kotev-Emeth S., Noff D., Kaffuler S., Savion N. (1993). Effect of basic fibroblast growth factor on the growth and differentiation of adult stromal bone marrow cells: Enhanced development of mineralized bone-like tissue in culture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 8(8), 919-929.

Pollard J.W. (2001). Tumour-stromal interactions: Transforming growth factor- $\beta$  isoforms and hepatocyte growth factor/scatter factor in mammary gland ductal morphogenesis. *Breast Cancer Research*, 3(4), 1.

Postlethwaite A.E., Keski-Oja J., Moses H.L., Kang A.H. (1987). Stimulation of the chemotactic migration of human fibroblasts by transforming growth factor beta. *The Journal of Experimental Medicine*, 165(1), 251-256.

Probst A., Spiegel H.U. (2009). Cellular mechanisms of bone repair. *Journal of Investigative Surgery*.

Puzas, F.J., Lewis, G.D. (1999). Biology Of Osteoclasts And Osteoblasts, In Orthopaedics. *Principles of Basic and Clinical Science*, Chapter 3.

Qiao J., An N. (2016). Effect of concentrated growth factors on function and Wnt3a expression of human periodontal ligament cells in vitro. *Platelets*, 1-6.

Qin J., Wang L., Sun Y., Sun X., Wen C., Shahmoradi M., Zhou Y. (2016). Concentrated growth factor increases Schwann cell proliferation and neurotrophic factor secretion and promotes functional nerve recovery in vivo. *International Journal of Molecular Medicine*, 37(2), 493-500.

Rahal M.D., Delorme D., Brånemark P.I., Osmond D.G. (2000). Myelointegration of titanium implants: B lymphopoiesis and hemopoietic cell proliferation in mouse bone

marrow exposed to titanium implants. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 15(2).

Raja V.S., Naidu E.M. (2008). Platelet-rich fibrin: evolution of a second-generation platelet concentrate. *Indian Journal of Dental Research*, 19(1), 42.

Rammelt S., Schulze E., Bernhardt R., Hanisch U., Scharnweber D., Worch H., Biewener A. (2004). Coating of titanium implants with type-I collagen. *Journal of Orthopaedic Research*, 22(5), 1025-1034.

Ribeiro F.V., César-Neto J.B., Nociti Jr, F.H., Sallum E.A., Sallum A.W., De Toledo S., Casati M.Z. (2006). Selective cyclooxygenase-2 inhibitor may impair bone healing around titanium implants in rats. *Journal of Periodontology*, 77(10), 1731-1735.

Rigo E.C.S., Boschi A.O., Yoshimoto M., Allegrini S., Konig B., Carbonari M.J. (2004). Evaluation in vitro and in vivo of biomimetic hydroxyapatite coated on titanium dental implants. *Materials Science and Engineering: C*, 24(5), 647-651.

Robey P.G., Young M.F., Flanders K.C., Roche N.S., Kondaiah P., Reddi A.H., Roberts A.B. (1987). Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *The Journal of Cell Biology*, 105(1), 457-463..

Rocca M., Fini M., Giavaresi G., Nicoli A.N., Giardin R. (2001). Tibial implants: biomechanical and histomorphometric studies of hydroxyapatite-coated and uncoated stainless steel and titanium screws in long-term ovariectomized sheep. *The International Journal of Artificial Organs*, 24(9), 649-654.

Rode H.J. (2008). Apoptosis, cytotoxicity and cell proliferation. *Roche Diagnostics GmbH*, 4.

Rodella, L. F., Favero, G., Boninsegna, R., Buffoli, B., Labanca, M., Scari, G., 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.

- Roldán J.C., Jepsen S., Miller J., Freitag S., Rueger D.C., Açil Y., Terheyden H. (2004). Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*, 34(1), 80-90.
- Rosenqvist R., Bylander B., Knutson K., Rydholm U., Rööser B., Egund N., Lidgren L. (1986). Loosening of the porous coating of bicompartamental prostheses in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 68(4), 538-542.
- Rubin, E., & Farber, J. L. (1994). Environmental and nutritional pathology. *Pathology, JB Lippincott, Philadelphia, PA*, 296-300.
- Rupp F., Scheideler L., Olshanska N., De Wild M., Wieland M., Geis Gerstorfer J. (2006). Enhancing surface free energy and hydrophilicity through chemical modification of microstructured titanium implant surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 76(2), 323-334.
- Sacco L. (2006). Lecture, International Academy of Implant Prosthesis and Osteoconnection.
- Safdar N., Khan F., Cammisa Jr, H., Sandhu S., Ashish D. (2005). The biology of bone grafting. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 13(1), 77-86.
- Sahni A., Odrlijin T., Francis C.W. (1998). Binding of basic fibroblast growth factor to fibrinogen and fibrin. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 7554-7559.
- Sakakura C.E., Marcantonio E., Wenzel A., Scaf G. (2007). Influence of cyclosporin A on quality of bone around integrated dental implants: a radiographic study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research*, 18(1), 34-39.
- Sanchez-Fernandez M.A., Gallois A., Riedl T., Jurdic P., Hoflack B. (2008). Osteoclasts control osteoblast chemotaxis via PDGF-BB/PDGF receptor beta signaling. *PloS one*, 3(10), e3537.
- Schenk, R.K. (2003). *Biology Of Fracture: Skeletal Trauma*. Saunders, Philadelphia, 1, 29-74.



- Schliephake H., Scharnweber D., Dard M., Rossler S., Sewing A., Meyer J., Hoogestraat D. (2002). Effect of Rgd Peptide Coating Of Titanium Implants on Periimplant Bone Formation in the Alveolar Crest. an Experimental Pilot Study in Dogs. *Clinical Oral Implants Research*, 13, 312-319.
- Schmalz G. (1994). Use of cell cultures for toxicity testing of dental materials-advantages and limitations. *Journal of Dentistry*, 22, S6-S11.
- Schurr M.J., Foster K.N., Centanni J.M., Comer A.R., Wicks A., Gibson A.L., Allen-Hoffmann B.L. (2009). Phase I/II clinical evaluation of StrataGraft: a consistent, pathogen-free human skin substitute. *The Journal of Trauma*, 66(3), 866.
- Schwarz F., Wieland M., Schwartz Z., Zhao G., Rupp F., Geis Gerstorfer J., Ferguson S.J. (2009). Potential of chemically modified hydrophilic surface characteristics to support tissue integration of titanium dental implants. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 88(2), 544-557.
- Schwartz Z., Lohmann C.H., Oefinger J., Bonewald L.F., Dean D.D., Boyan B.D. (1999). Implant surface characteristics modulate differentiation behavior of cells in the osteoblastic lineage. *Advances in Dental Research*, 13(1), 38-48.
- Scotchford C.A., Ball M., Winkelmann M., Vörös J., Csucs C., Brunette D.M., Textor M. (2003). Chemically patterned, metal-oxide-based surfaces produced by photolithographic techniques for studying protein-and cell-interactions. II: Protein adsorption and early cell interactions. *Biomaterials*, 24(7), 1147-1158.
- Scotchford C.A., Cascone M.G., Downes S., Giusti P. (1998). Osteoblast responses to collagen-PVA bioartificial polymers in vitro: the effects of cross-linking method and collagen content. *Biomaterials*, 19(1), 1-11.
- Sennerby L., Thomsen P., Ericson L.E. (1992). A morphometric and biomechanic comparison of titanium implants inserted in rabbit cortical and cancellous bone. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 7(1).
- Seppä H., Grotendorst G., Seppä S., Schiffmann E., Martin G.R. (1982). Platelet-derived growth factor in chemotactic for fibroblasts. *The Journal of Cell Biology*, 92(2), 584-588.

- Shah A.K., Sinha R.K., Hickok N.J., Tuan R.S. (1999). High-resolution morphometric analysis of human osteoblastic cell adhesion on clinically relevant orthopedic alloys. *Bone*, 24(5), 499-506.
- Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman, M. L., Schuh, A. C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376(6535), 62-66.
- Shanbhag A.S. (2006). Use of bisphosphonates to improve the durability of total joint replacements. *Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 14(4), 215-225.
- Shimoaka T., Ogasawara T., Yonamine A., Chikazu D., Kawano H., Nakamura K., Kawaguchi H. (2002). Regulation of osteoblast, chondrocyte, and osteoclast functions by fibroblast growth factor (FGF)-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7493-7500.
- Sista S., Wen C.E., Hodgson P.D., Pande G. (2011). The influence of surface energy of titanium-zirconium alloy on osteoblast cell functions in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 97(1), 27-36.
- Skalak L., Branemark P.I. (1995). Summary Report On: Workshop On Molecular And Cellular Biology Of Osseointegration. London, September.
- Slapnicka J., Fassmann A., Strasak L., Augustin P., Vanek J. (2008). Effects of activated and nonactivated platelet-rich plasma on proliferation of human osteoblasts in vitro. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 66(2), 297-301.
- Snyder W.R., Hoover J., Khoury R., Farach-Carson M.C. (1997). Effect of agents used in perforation repair on osteoblastic cells. *Journal of Endodontics*, 23(3), 158-161.
- So, F., Daley, T. D., Jackson, L., Wysocki, G. P. (2001). Immunohistochemical localization of fibroblast growth factors FGF-1 and FGF-2, and receptors FGFR2 and FGFR3 in the epithelium of human odontogenic cysts and tumors. *Journal of oral pathology & medicine*, 30(7), 428-433.

- Søballe K. (1993). Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation: mechanical and histological studies in dogs. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 64(255), 1-58.
- Søballe K., Hansen E.S., Brockstedt-Rasmussen H., Bunge C. (1993). Hydroxyapatite coating converts fibrous tissue to bone around loaded implants. *Bone Joint Journal*, 75(2), 270-278.
- Søballe K., Hansen E.S., Rasmussen H., Jørgensen P.H., Bunge C. (1992). Tissue ingrowth into titanium and hydroxyapatite-coated implants during stable and unstable mechanical conditions. *Journal of Orthopaedic Research*, 10(2), 285-299.
- Soffer E., Ouhayoun J.P., Dosquet C., Meunier A., Anagnostou F. (2004). Effects of platelet lysates on select bone cell functions. *Clinical Oral Implants Research*, 15(5), 581-588.
- Spadaro J.A., Albanese S.A., Chase S.E. (1990). Electromagnetic effects on bone formation at implants in the medullary canal in rabbits. *Journal of Orthopaedic Research*, 8(5), 685-693.
- Steed D.L. (1997). The role of growth factors in wound healing. *Surgical Clinics of North America*, 77(3), 575-586.
- Stefani C.M., Machado M.A., Sallum E.A., Sallum A.W., Toledo S., Nociti F.H., Jr. (2000). Platelet-Derived Growth Factor/Insulin-Like Growth Factor-1 Combination And Bone Regeneration Around Implants Placed Into Extraction Sockets: A Histometric Study in Dogs. *Implant Dentistry*, 9, 126-131.
- Strayhorn C.L., Garrett J.S., Dunn R.L., Benedict J.J., Somerman, M.J. (1999). Growth factors regulate expression of osteoblast-associated genes. *Journal of Periodontology*, 70(11), 1345-1354.
- Su C.Y., Kuo Y.P., Tseng Y.H., Su C.H., Burnouf T. (2009). In vitro release of growth factors from platelet-rich fibrin (PRF): a proposal to optimize the clinical applications of PRF. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 108(1), 56-61.

Sumner D.R., Turner T.M., Pierson R.H., Kienapfel H., Urban R.M., Liebner E.J., Galante J.O. (1990). Effects of radiation on fixation of non-cemented porous-coated implants in a canine model. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 72(10), 1527-1533.

Sumner D.R., Turner T.M., Urban R.M., Viridi A.S., Inoue N. (2006). Additive Enhancement Of İmplant Fixation Following Combined Treatment With Rhtgf-Beta2 And Rhbmp-2 İn A Canine Model. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, 88, 806- 817.

Sun S., Yu W., Zhang Y., Zhang F. (2013). Increased preosteoblast adhesion and osteogenic gene expression on TiO<sub>2</sub> nanotubes modified with KRSR. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(4), 1079-1091.

Şahin S., Çehreli M., Yalçın E. (2002). The influence of functional forces on the biomechanics of implant-supported prostheses. *Journal of Dentistry*, 30, 271-282.

Takeda Y., Katsutoshi K., Matsuzaka K., Inoue T. (2015). The Effect of Concentrated Growth Factor on Rat Bone Marrow Cells In Vitro and on Calvarial Bone Healing In Vivo. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 30(5).

Takeuchi K., Saruwatari L., Nakamura H.K., Yang J.M., Ogawa T. (2005). Enhanced intrinsic biomechanical properties of osteoblastic mineralized tissue on roughened titanium surface. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 72(3), 296-305.

Tanaka H., Liang C.T. (1995). Effect of platelet-derived growth factor on DNA synthesis and gene expression in bone marrow stromal cells derived from adult and old rats. *Journal of Cellular Physiology*, 164(2), 367-375.

Terzioğlu G, Keskin AÜ, Demirel GY. (2013). Hücre Proliferasyonu Ölçüm Yöntemleri ve Çeşitli Ticari Proliferasyon Kitlerinin Karşılaştırılması. *Türk İmmunoloji Dergisi*, 1, 74-89.

Tinsley O., Walson C.J., Ogden A.R. (1999). A survey of failures. *Journal of oral rehabilitation*, 26,14-8

- Tsukamoto, T., Matsui, T., Fukase, M., Fujita, T. (1991). Platelet-derived growth factor B chain homodimer enhances chemotaxis and DNA synthesis in normal osteoblast-like cells (MC3T3-E1). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 175(3), 745-751.
- Tolstunov L. (2006). Dental İmplant Success-Failure Analysis: A Concept Of İmplant Vulnerability. *Implant Dentistry*, 15(4), 341-6.
- Tsai C.H., Shen S.Y., Zhao J.H., Chang Y.C. (2009). Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. *Journal of Dental Sciences*, 4(3), 130-135.
- Tuncer S., Demirci M. (2011). Dental materyallerde biyouyumluluk değerlendirmeleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2011(2).
- Turner C.H. (1998). Three rules for bone adaptation to mechanical stimuli. *Bone*, 23(5), 399-407.
- Tušek, L., Nitschke, M., Werner, C., Stana-Kleinschek, K., Ribitsch, V. (2001). Surface characterisation of NH 3 plasma treated polyamide 6 foils. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 195(1), 81-95.
- Uzun G., Keyf F. (2007). İmplantların Yüzey Özellikleri Ve Osseointegrasyon. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2, 43-50.
- Van Hinsbergh V.W., Collen A., Koolwijk P. (2001). Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Science*, 936, 426-437.
- Wyk C.V., Olivier A., Maritz J.S. (2001). Cultured pulp fibroblasts: are they suitable for in vitro cytotoxicity testing?. *Journal of Oral Pathology Medicine*, 30(3), 168-177.
- Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., & Persico, M. G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21. *Circulation*, 93(8), 1493-1495.
- Vogel J.P., Szalay K., Geiger F., Kramer M., Richter W., Kasten P. (2006). Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains

differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets*, 17(7), 462-469.

Wall I., Donos N., Carlqvist K., Jones F., Brett P. (2009). Modified titanium surfaces promote accelerated osteogenic differentiation of mesenchymal stromal cells in vitro. *Bone*, 45(1), 17-26.

Walsh S., Jefferiss C.M., Stewart K., Beresford J.N. (2003). IGF-I does not affect the proliferation or early osteogenic differentiation of human marrow stromal cells. *Bone*, 33(1), 80-89.

Walter M.S., Frank M.J., Sunding M.F., Gómez-Florit M., Monjo M., Bucko M.M., Haugen H.J. (2013). Increased reactivity and in vitro cell response of titanium based implant surfaces after anodic oxidation. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 24(12), 2761-2773.

Weibrich G., Hansen T., Kleis W., Buch R., Hitzler W.E. (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, 34: 665-671.

Wennerberg A., Albrektsson T., Lausmaa J. (1996). Torque and histomorphometric evaluation of cp titanium screws blasted with 25 and 75 $\mu$ m sized particles of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30(2), 251-260.

Wozney J.M. (1995). The Potential Role of Bone Morphogenetic Proteins in Periodontal Reconstruction. *Journal of Periodontology*, 66(6), 506-510.

Wang, R. R., & Fenton, A. (1996). Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature. *Quintessence International*, 27(6).

Wang E.A., Rosen V., D'Alessandro J.S., Bauduy M., Cordes P., Harada T., LaPan P. (1990). Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(6), 2220-2224.

Webber D., Osdoby P., Krukowski M., Hauschka P. (1990). Correlation of an osteoclast antigen and ruffled border on giant cells formed in response to resorbable substrates. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(4), 401-410.

- Weber H.P., Sukotjo C. (2007). Does The Type Of Implant Prosthesis Affect Outcomes In The Partially Edentulous Patient?. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, 22, 140-172.
- Weibrich G., Hansen T., Kleis W., Buch R., Hitzler W.E. (2004). Effect Of Platelet Concentration In Platelet-Rich Plasma On Peri-Implant Bone Regeneration. *Bone*, 34, 665-671.
- Wennerberg A., Albrektsson T., Lausmaa J. (1996). Torque And Histomorphometric Evaluation Of C.P. Titanium Screws Blasted With 25- And 75- Microns-Sized Particles Of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. *Journal of Biomedical Materials Research*, 30, 251-260.
- Wirz S., Dietrich M., Flanagan T.C., Bokermann G., Wagner W., Schmitz-Rode T., Jockenhoevel S. (2011). Influence of platelet-derived growth factor-AB on tissue development in autologous platelet-rich plasma gels. *Tissue Engineering Part A*, 17(13-14), 1891-1899.
- Wong M.M., Rao L.G., Ly H., Hamilton L., Ish-Shalom S., Sturtridge W., Murray T.M. (1994). In vitro study of osteoblastic cells from patients with idiopathic osteoporosis and comparison with cells from non-osteoporotic controls [1]. *Osteoporosis International*, 4(1), 21-31.
- Xin L., Zhihong J., Zhonghao L. (2015). Effects of concentrated growth factor extract on the proliferation and differentiation of MC3T3-E1 cells attached to titanium surfaces. *West China Journal of Stomatology*, 33(1).
- Yamada Y., Ueda M., Naiki T., Nagasaka T. (2004). Tissue engineered injectable bone regeneration for osseointegrated dental implants. *Clinical Oral Implants Research*, 15(5), 589-597.
- Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J., Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407(6801), 242-248.
- Yoshikawa T., Nakajima H., Takakura Y., Nonomura A. (2005). Osteogenesis with cryopreserved marrow mesenchymal cells. *Tissue Engineering*, 11(1-2), 152-160.

- Younger E.M., Chapman M.W. (1989). Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 3(3), 192-195.
- Yao K.L., Todescan R., Sodek J. (1994). Temporal changes in matrix protein synthesis and mRNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *Journal of Bone and Mineral Research*, 9(2), 231-240.
- Yliheikkilä P.K., Felton D.A., Whitson W., Ambrose W.W., Uoshima K., Cooper L.F. (1995). Correlative Microscopic Investigation of the Interface Between Titanium Alloy and the Osteoblast--Osteoblast Matrix Using Mineralizing Cultures of Primary Fetal Bovine Mandibular Osteoblasts. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 10(6).
- Yliheikkilä P.K., Masuda T., Ambrose W.W., Suggs C.A., Felton D.A., Cooper L.F. (1996). Preliminary comparison of mineralizing multilayer cultures formed by primary fetal bovine mandibular osteoblasts grown on titanium, hydroxyapatite, and glass substrates. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 11(4).
- Yu B., Wang Z. (2014). Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem cells in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 9(1), 235-242.
- Zachary I. (1998). Molecules in focus VEGF. *International Journal of Biochemical Cell Biology*, 30, 1169-74.
- Zechner W., Tangl S., Tepper G., Fürst G., Bernhart T., Haas R., Watzek G. (2003). Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *International Journal of Oral Maxillofacial Implants*, 18(1).
- Zeiter S., Lezuo P., Ito K. (2009). Effect of TGF  $\beta$ 1, BMP-2 and hydraulic pressure on chondrogenic differentiation of bovine bone marrow mesenchymal stromal cells. *Biorheology*, 46(1), 45-55.
- Zhang H., Lewis C.G., Aronow M.S., Gronowicz G.A. (2004). The effects of patient age on human osteoblasts' response to Ti-6Al-4V implants in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, 22(1), 30-38.



Zhao G., Schwartz Z., Wieland M., Rupp F., Geis Gerstorfer J., Cochran D.L., Boyan B.D. (2005). High surface energy enhances cell response to titanium substrate microstructure. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 74(1), 49-58.

Zhao L., Jiang S., Hantash B.M. (2009). Transforming growth factor  $\beta$ 1 induces osteogenic differentiation of murine bone marrow stromal cells. *Tissue Engineering Part A*, 16(2), 725-733.

Zhao M., Xiao G., Berry J.E., Franceschi R.T., Reddi A., Somerman M.J. (2002). Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(8), 1441-1451.

Zhang H., Ahmad M., Gronowicz G. (2003). Effects of transforming growth factor-beta 1 (TGF- $\beta$ 1) on in vitro mineralization of human osteoblasts on implant materials. *Biomaterials*, 24(12), 2013-2020.

Zhang X., Sobue T., Hurley M.M. (2002). FGF-2 increases colony formation, PTH receptor, and IGF-1 mRNA in mouse marrow stromal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 290(1), 526-531.

## ÖZGEÇMİŞ

### İSMAİL ONUR ŞAHİN

Ordu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Bülent Ecevit Bulvarı No:17 52100 Güzelyalı-

Altınordu/ORDU Cep (505) 8996237

[i.onursahin@hotmail.com](mailto:i.onursahin@hotmail.com)

#### **Bireysel Bilgiler**

**Doğum Yeri ve Tarihi:** İstanbul 03.01.1986

**Uyruğu:** T.C.

**Medeni Durumu:** Bekar

**İletişim Adresi:** Bülent Ecevit Bulvarı No:17 52100 Güzelyalı- Altınordu/ORDU

#### **Eğitim Bilgileri**

2013- Ordu Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim  
Dalı Araştırma Görevlisi (Uzmanlık Eğitimi)

2006-2011 Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

2001-2004 Bilecik Refik Arslan Öztürk Fen Lisesi

1997-2001 İstanbul Köy Hizmetleri Anadolu Lisesi

## **Yabancı Dil Bilgisi:**

İngilizce

## **ESERLER**

### **A. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:**

**A1. I.O. Şahin**, C. Gökmenoğlu, M.C. Yavuz, M. Topaloğlu, H. Selamet, C. Kara. Aggressive periodontitis with necrotizing ulcerative gingivitis: a case report. European Federation of Periodontology (Europerio). Londra-İngiltere, 2015 (Poster Sunumu).

**A2. Cinel S, Sağırkaya CE, Şahin İO.** Aesthetic rehabilitation with lithium disilicate glass Sunumu ceramic: Three case report. 39. Annual Conference of the EPA. Prag-Çek Cumhuriyeti, 2015 (Poster Sunumu).

**A3. C. Gökmenoğlu, E. Sadik, N. Beldüz Kara, M. Topaloğlu, O.Şahin, H. Selamet, C. Kara.** The knowledge of gynecologists about periodontal treatment needs in pregnant women. European Federation of Periodontology (Europerio). Londra-İngiltere, 2015 (Poster Sunumu).

**A4. M. Topaloğlu, C. Gökmenoğlu, M.C. Yavuz, O. Şahin, H. Selamet, C. Kara.** Management of physiological gingival hyperpigmentation by Nd:YAG laser. European Federation of Periodontology (Europerio). Londra-İngiltere, 2015 (Poster Sunumu).

**A5. M.C. Yavuz, H. Selamet, M. Topaloğlu, O.Şahin.** Bone graft combined with consantrated growth factor in maxillary sinus augmentation with one side crestal and the other side lateral window approach. European Federation of Periodontology (Europerio). Londra-İngiltere, 2015 (Poster Sunumu).

**B.Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler:**

**B1.** Yavuz MC, Cinel S, **Şahin İO.** A New Approach to Fixed Prosthesis in Athropic Posterior Mandible: Case Report. Türk Periodontoloji Derneği 45. Bilimsel Kongresi, Ankara-Türkiye, 2015 (Poster Sunumu).

**Proje ve Uzmanlık Tezi:** ‘‘Konsantre Büyüme Faktörü Uygulanmış Titanyum Yüzeylerinde Osteoblast Cevabı’’ konulu proje Uzmanlık Tezi kapsamında, Ordu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmektedir (Devam ediyor).