

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**LÖKOSİT VE TROMBOSİTTEN ZENGİN FİBRİNİN
BARIYER MEMBRAN OLARAK KULLANILMASI VE
KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Seren SÜRMEİİ BARAN

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
PERİODONTOLOJİ PROGRAMI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZCAN**

ADANA-2019

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**LÖKOSİT VE TROMBOSİT ZENGİN FİBRİNİN
BARİYER MEMBRAN OLARAK KULLANILMASI VE
KEMİK REJENERASYONU ÜZERİNE ETKİSİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dt. Seren SÜRMEİ BARAN

**PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI
PERİODONTOLOJİ PROGRAMI
UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZCAN**

Bu proje, Çukurova üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeler Birimi tarafından TDH-2018-10394 No'lu proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2019

KABUL VE ONAY

Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığı

Periodontoloji Anabilim Dalı

Diş Hekimliği'nde Uzmanlık Programı Çerçevesinde Yürütülmüş Olan "Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Bariyer Membran Olarak Kullanılması ve Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 23 / 07 / 2019

TEZ SINAV JÜRİSİ

Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZCAN
Çukurova Üniversitesi
Başkan

Prof. Dr. Mehmet Cenk HAYTAÇ
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Onur UÇAK TÜNER
Çukurova Üniversitesi
Üye

Prof. Dr. Gönen ÖZCAN
Gazi Üniversitesi
Üye

Dr. Öğr. Üyesi Bahar ALKAYA
Çukurova Üniversitesi
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun 23/07/19 tarih ve 29/3 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca benden desteğini ve bilgisini esirgemeyen, her zaman sevgilerini ve desteklerini hissettiğim, insani ve ahlaki değerleri ile kendime örnek edindiğim, öğrencileri olmaktan gurur duyduğum üzerimde büyük emekleri olan tez danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖZCAN, değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. M. Cenk HAYTAÇ, Sayın Prof. Dr. Onur UÇAK TÜRER ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi Bahar ALKAYA başta olmak üzere;

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca bilgisini ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Sayın Dr. Fariz SALİMOV'a, çalışmamızda kullanılan deney hayvanlarının anestezi ve bakımındaki yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Kenan DAĞLIOĞLU ve DETAUM personeline, tezimin laboratuvar aşamalarında emeği geçen Sayın Prof. Dr. Sait POLAT ve Arş. Gör. Tuğçe SAPMAZ'a, çalışmamın analiz aşamalarında bilgisiyile desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Mehmet KÜRKCÜ ve Sayın Dr. Öğr. Üyesi H. Can TÜKEL'e,

Periodontoloji anabilim dalında birlikte çalışmaktan keyif duyduğum değerli asistan arkadaşlarım Dt. Latife BİŞKİN, Dt. Bahar ANDAÇ URAL, Dt. Ali YÜKSEK, Dt. Seda CİRİTÇİ'ye, büyük bir mutlulukla birlikte çalıştığım, çok güzel anılar paylaştığım, destek ve sevgileriyle yanımda olan Dt. Ada Gizem ŞAHİN ve Dt. Serpil ÇEKİN YÜCEL'e,

Eğitim sürem boyunca bir aile ortamında çalıştığımı hissettiren, Gül KURTAR, Nergis KÜÇÜKBEY, Sevil ESENKURT ve değerli arkadaşım Ebru DAĞ a,

Beni her koşulda destekleyen, sonsuz sevgi ve emekleriyle bugünlere gelmemi sağlayan sevgili annem Suat SÜRMEİ ve babam İbrahim SÜRMEİ'ye, her zaman yanımda olan biricik kardeşlerim Mehmet SÜRMEİ ve Çağla SÜRMEİ ÇELİKER'e,

Anlayışı, sevgisi ve desteğiyle her zaman yanımda olan kıymetli hayat arkadaşım, en büyük şansım, Arif BARAN'a

Sevgi, saygı ve tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokusu	3
2.1.1. Kemik Dokusunun Yapısı	3
2.1.2. Kemik Hücreleri	3
2.1.3. Kemik Doku Yapım Mekanizmaları	4
2.1.4. Kemik Doku Çeşitleri	5
2.1.5. Kemik İyileşmesi	6
2.1.6 Kemik Yapımı ve Rezorpsiyonu	7
2.2. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR) ve Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu (YKR)	9
2.2.1. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu	9
2.2.2. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu	10
2.3. Kemik Greft Materyalleri	11
2.3.1. Kemik Greft Materyallerinin Biyolojisi ve Kemikleşme Mekanizmaları ..	11
2.3.2. YKR’de Kullanılan Kemik Greft Çeşitleri	12
2.4. YKR’de Kullanılan Bariyer Membranlar	14
2.4.1. Rezorbe Olmayan Bariyer Membranlar	15
2.4.2. Rezorbe Olan Bariyer Membranlar	16
2.5. YKR’de Güncel Yaklaşımlar	18
2.6. Trombositten Zengin Kan Ürünleri ve Tarihsel Gelişimi	19

2.6.1. Trombosit Konsantrlerinin Özellikleri	20
2.6.2. TZF'nin Hazırlanması	24
2.6.3. TZF Pıhtıdaki Trombosit, Lökosit ile Fibrinin Yapısı ve Dokulardaki Etkileri.....	26
2.6.4. TZF'nin İyileşme Mekanizması Üzerine Biyolojik Etkileri	31
2.6.5. TZF'nin Avantajları ve Dezavantajları	33
2.6.6. TZF'nin Kullanım Alanları	34
2.7. Lazer ve Düşük Doz Lazer Tedavisi	34
2.7.1. Lazerlerin Enerji Düzeylerine Göre Sınıflandırılması	35
2.7.2. Lazerin Dokudaki Biyolojik Etki Mekanizmaları.....	35
2.7.3. Düşük Doz Lazer Tedavi (DDLT)	36
2.7.4. Fotobiyostimülasyonun Hücre ve Doku Seviyesinde Etkileri	37
3. GEREÇ ve YÖNTEM	39
3.1. Deney Hayvanları.....	39
3.2. Gruplar	39
3.3. Kritik Boyutta Kemik Defekti.....	40
3.4. Cerrahi Girişim.....	40
3.5. Postoperatif Bakım.....	44
3.6. Denek Hayvanlarından Kemik Örneklerinin Elde Edilmesi	44
3.7. Kesit Hazırlama Yöntemi.....	44
3.8. Histomorfometrik Analiz	45
3.9. İstatiksel Analiz.....	46
4. BULGULAR.....	47
5. TARTIŞMA	55
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	66
7. KAYNAKÇA	67
ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞekilNo:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 1.	RANK-RANKL-OPG etkileşimi9
Şekil 2.	Mekanik bariyer kullanılmasıyla yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu prensibinin şematik gösterimi11
Şekil 3.	TZF fibrin pıhtı.25
Şekil 4	(a) Bilateral bağların gösterimi30
Şekil 5.	(b) Equilateral bağların gösterimi30
Şekil 6.	Fibrin yapıştırıcı ve TZP fibrin ağının görünümü31
Şekil 7.	TZF fibrin yapı.....31
Şekil 8.	İliak krete ulaşım ve bölgenin işaretlenmesi.....41
Şekil 9.	TZF'nin tüpten çıkarılıp TZF-kutu içine yerleştirilmesi42
Şekil 10.	Diyot lazer ile TZF'ye DDLT uygulaması42
Şekil 11.	Defekt oluşturulması, greftlenmesi ve gruplara uygun biçimde membran yerleştirilmesi.....43
Şekil 12.	Cilt altı kas dokusunun suture edilmesi.....44
Şekil 13.	Cilt dokusunun primer kapatılması.44
Şekil 14.	Gruplardan elde edilen kesitlerin 2X büyütme altındaki histolojik görüntüsü47
Şekil 15.	Gruplar arasında BV değerinin karşılaştırılması49
Şekil 16.	Gruplar arasında BV/TV değerinin karşılaştırılması.....50
Şekil 17.	Gruplar arasında BS değerinin karşılaştırılması.....51
Şekil 18.	Gruplar arasında Tb.Dm(Rod) değerlerinin karşılaştırılması.....52
Şekil 19.	Gruplar arasında Tb.Sp(Rod) değerlerinin karşılaştırılması.....53
Şekil 20.	Gruplar arasında Tb.N(Rod) değerlerinin karşılaştırılması54

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇizelgeNo:</u>	<u>Sayfa No:</u>
Çizelge 1. Histomorfometrik değerlendirme için doku takip işlemi.....	45
Çizelge 2. Histomorfometrik analiz sonucu grupların BV, BV/TV, BS, Tb.Dm, Tb.N, Tb.S ortalama, standart sapma değerleri.....	48
Çizelge 3. Gruplarda gözlenen yeni kemik formasyonu.....	48
Çizelge 4. Gruplar arasında BV parametresinin p değerleri.....	49
Çizelge 5. Gruplar arasında BV/TV' nin p değerleri,.....	50
Çizelge 6. Gruplar arasında BS' nin p değerleri,.....	51
Çizelge 7. Gruplar arasında Tb.Dm(Rod)' nin p değerleri,.....	52
Çizelge 8. Gruplar arasında Tb.Sp. (Rod)' nin p değerleri,.....	53
Çizelge 9. Gruplar Tb.N (Rod)' nin p değerleri,	54
Çizelge 10. Çalışmamız ve kolajen membranın etkinliğinin değerlendirildiği ilgili çalışmalar.....	59
Çizelge 11. Çalışmamız ve trombosit zengin fibrinin etkinliğinin değerlendirildiği ilgili çalışmalar	62

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

A-TZF	: İleri Trombositten Zengin Fibrin
ATP	: Adenozin-tri-fosfat
BMP	: Kemik morfogenez proteinini
CaCl₂	: Kalsiyum klorür
CaCO₃	: Kalsiyum karbonat
CGF	: Konsantre büyüme faktörü
DDL_T	: Düşük doz lazer tedavi
DFDB	: Deproteinize dondurulmuş kurutulmuş kemik
dk	: Dakika
DSKM	: Deproteinize sığır kaynaklı kemik minerali
EMD	: Mine matriks türevi
FDB	: Dondurulmuş kurutulmuş kemik
FB	: Dondurulmuş kemik
FBT	: Fotobiyostimülasyon
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
HA	: Sentetik hidroksiapatit
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IFN-γ	: İnterferon Gama
IL	: İnterlökin
i-TZF	: Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin
L-TZF	: Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin
mm	: Milimetre
nm	: Nanometre
OPG	: Osteoprotegrin
PDGF	: Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PRGF	: Trombositten zengin büyüme faktörü
PTFE	: Politetra-floro-etilen
RANK	: Reseptör aktivator nükleer kappa B
RANKL	: Reseptör aktivator nükleer kappa B ligand
rpm	: Dakikadaki devir sayısı

TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü-beta
TNF	: Tümör nekroz faktör
TZF	: Trombositten zengin fibrin
TZP	: Trombositten zengin plazma
VEGF	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü
YDR	: Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu
YKR	: Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu



ÖZET

Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrinin Bariyer Membran Olarak Kullanılması ve Kemik Rejenerasyonu Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Bu çalışmanın amacı, kritik boyutlu kemik defektlerinin tedavisinde Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (TZF) ve düşük doz lazer uygulanmış TZF (DDL-TZF)' nin bariyer membran olarak yeni kemik oluşumuna etkisinin, kolajen membranla karşılaştırılarak değerlendirilmesidir.

Bu çalışmada 5 adet, ortalama 40 kg ağırlığında, 18-24 aylık merinos tipi erişkin erkek koyun kullanıldı. Koyunlardan 4 tüp, 10 cc kan alındı ve 2700 rpm' de 12 dakika santrifüj edilerek TZF elde edildi. Genel anestezi altında, koyunların sağ iliak krestine mukoperiosteal elevasyon ile ulaşım sağlandı. Her bir koyunda toplam 8 adet kritik boyutlu defekt oluşturuldu. Defektlerin tümüne deproteinize sığır kaynaklı kemik grefti yerleştirildi. Bir gruptan iki adet defekt olacak şekilde defektler dört gruba ayrıldı. Defektler sırasıyla kolajen membranla, membran haline getirilmiş TZF ile ve membran haline getirilmiş DDL-TZF ile örtüldü. Bir gruba, kontrol grubu olarak membran yerleştirilmedi. Toplam 40 defekt elde edildi. Hayvanlar 12. haftanın sonunda sakrifiye edildi. Elde edilen kesitler histomorfometrik yöntem ile incelendi.

Çalışmanın sonuçlarına göre tüm gruplarda ana parametrelerimiz olan; yeni kemik oluşumu (BV/TV), kemik hacmi (BV) ve kemik yüzeyi (BS) değerlendirmelerinde artış gözlenmiştir. Gruplar arası karşılaştırmada tüm ana parametrelerde en yüksek değerler kolajen grubunda elde edilmiştir ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$). DDL-TZF grubunda; TZF ve kontrol gruplarına göre daha yüksek değerler gözlenmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur ($p>0,05$). TZF grubu, kontrol grubuna göre daha başarılı olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p>0,05$).

Bu bulgulara göre TZF ve DDL-TZF' nin bariyer membran olarak etkinlik gösterdiği anlaşılmaktadır. Ancak TZF membranının etkinliğini arttırmak için daha ileri çalışmalara gerek vardır.

Anahtar Kelimeler: Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu, Trombositten Zengin Fibrin, Düşük Doz Lazer Tedavisi

ABSTRACT

Using of Leukocyte and Platelet Rich Fibrin as a Barrier Membrane and Evaluation Its Effect on Bone Regeneration

The aim of this study was to compare the effects of Leukocyte and Platelet Rich Fibrin (PRF) and low-level-laser applied PRF (LLL-PRF) as barrier membranes with collagen membranes on new bone formation for the treatment of critical size bone defects.

In this study, 5 male sheep with average weight of 40 kg and 18-24 months old were used. 4 tubes of 10 cc blood were drawn from the sheep and centrifuged at 2700 rpm for 12 minutes to obtain PRF. The right iliac crest of sheep was exposed by the mucoperiosteal elevation under general anesthesia. A total of 8 critical defects were created in each sheep. A deproteinized bovine bone graft was placed in all defects. The defects were divided into four groups with two defects from each group. The defects were covered respectively with collagen membrane or PRF in membrane form or LLL-PRF in membrane form. Membrane was not placed in one group which served as the control group. A total of 40 defects were obtained. Animals were sacrificed at the end of 12th week. The sections obtained were analyzed by histomorphometric method.

According to the results of study, our main parametres which are the new bone formation (BV / TV), bone volume (BV) and bone surface (BS) rates were increased in all groups. In the comparison between the groups, the highest values in all main parameters were obtained in the collagen group and this difference was statistically significant ($p < 0,05$). Higher values were observed in the LLL-PRF group compared to the PRF and control groups, but there was no statistically significant difference between them ($p > 0,05$). Although the PRF group was more successful than the control group, no statistically significant difference was found ($p > 0,05$).

The findings of the current study suggest that PRF and LLL-PRF may act as barrier membranes. However, further studies are needed to increase the efficiency of the PRF membrane.

Key Words: Guided Bone Regeneration, Platelet Rich Fibrin, Low Level Therapy.

1. GİRİŞ

Periodontal hastalıklar, çürük, enfeksiyon, travma ve konjenital nedenler gibi durumlara bağlı olarak periodontal dokularda yumuşak/ sert doku defektleri gözlenebilmektedir [1, 2]. Estetik, fonetik ve fonksiyonel yetersizliklere neden olan bu kayıpların azaltılması, önlenmesi ve rekonstrüksiyonu için yönlendirilmiş doku rejenerasyonu (YDR) ve yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu (YKR) kullanılmaktadır [3]. YDR prensibi 1980' lerin başında Nyman ve Karring tarafından tanımlanmıştır [4]. Bu prensibe göre, bariyer membranın açığa çıkmış kök yüzeyi ve periodontal defekt üzerine yerleştirilmesiyle meydana gelen izole edilmiş alanda periodontal ligament, sement ve kemik hücrelerinin seçici olarak çoğalması sağlanabilmektedir [5-8]. YKR tedavi konsepti, YDR prensibinden temel olarak geliştirilmiştir [9]. YKR'nin biyolojik mantığı, istenmeyen yumuşak dokuların kemik defekti içine büyümesinin bariyer membranlar yoluyla mekanik olarak engellenmesidir. Böylece sadece komşu kemikten köken alan osteojenik hücrelerin çoğalmasına izin verilerek, defekt bölgesinin kemik dokusuyla iyileşmesi sağlanmaktadır [9, 10].

YDR/YKR'de kullanılan bariyer membranlar biyouyumlu olup dokuyla bütünleşebilme, defekt yüzeyine hücre tutunmasını kolaylaştırabilme, hücre proliferasyonunu ile hücre migrasyonunu uyarabilme, boşluk oluşturabilme ve kolay klinik kullanım özelliklerine sahip olmalıdır [11-15]. Bu materyaller temel olarak rezorbe olan ve olmayan olarak sınıflandırılmaktadır. YKR tekniğiyle ilgili ilk çalışmalar, rezorbe olmayan politetrafloroetilen (PTFE) membranlar kullanılarak yapılmıştır [1]. Birçok avantajının yanı sıra PTFE membranların dezavantajları, cerrahi prosedürden sonra membranın açığa çıkabilmesi ve rezorbe olmadığı için iyileşme döneminden sonra ikinci cerrahi müdahale ile çıkarılması zorunluluğudur [16, 17]. Membranın cerrahi işlemle çıkarılmasından kaçınmak isteyen araştırmacılar, 1990' ların başında rezorbe olabilen doğal ve sentetik membranları geliştirmişlerdir [18-20].

Rejeneratif cerrahi işlem sonrası, kemik iyileşmesini hızlandırmak ve arttırmak amacıyla çeşitli materyaller kullanılmaktadır [21]. Günümüze kadar geliştirilen bu biyomateryaller arasında, lokal ve sistemik olarak uygulanabilen büyüme faktörleri ve fibrin yapıştırıcıları veya bunların kombinasyonları bulunmaktadır [22-24].

Rejenerasyon potansiyelini arttırmak için uygulanan biyomateryallerden biri de, son yıllarda kullanımı artan, otojen trombosit konsantreleridir [25]. Trombosit konsantreleri, yara iyileşmesi ve rejenerasyonunda anahtar rol oynayan çok sayıda büyüme faktörü ve sitokin içermektedir [26]. Choukroun ve ark. tarafından geliştirilen trombosit zengin fibrin (TZF), yüksek rejeneratif potansiyeli olan bir trombosit konsantresi olarak tanımlanmaktadır [25]. Lökosit ve trombosit zengin fibrin (L-TZF) ikinci jenerasyon bir trombosit konsantresidir. L-TZF fibrin matriks içinde bulunan büyüme faktörleri ve sitokinlerin, yara bölgesinde uzun süre salınımı gerçekleştirerek osteojenik hücre proliferasyonunu arttırmaktadır [27]. L-TZF' nin yumuşak ve sert dokunun rejenerasyon potansiyelini arttırdığı çeşitli klinik ve deneysel çalışmalarda gösterilmiştir [28, 29]. L-TZF, bu özelliklerinden dolayı, son yıllarda periodontal rejeneratif cerrahide tek başına veya diğer biyomateryaller ile karıştırılarak geniş kullanım alanı bulmuştur [30].

TZF'nin YDR/YKR prosedürlerinde etkinliğinin artırılması amacıyla, fotobiyostimülasyon uygulanmasıyla ilgili çalışmalar bulunmaktadır. Düşük doz lazer tedavileri (DDL) düşük enerji seviyelerinde derin penetrasyon göstererek dokuda güçlü biyostimülatif etki yaratmaktadır [31]. Bu nedenle periodontal hastalıkların, yumuşak ve sert doku defektlerinin tedavisinde, rejenerasyon potansiyelini arttırmak için kullanılmaktadır [32].

Literatür incelemesi yapıldığında kemik defektlerinin YKR ile tedavisinde L-TZF ve DDL' nin tek başına kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır [33-35]. Ancak, bariyer membran olarak L-TZF'nin ve DDL uygulanmış L-TZF membranın bariyer olarak kullanılmasıyla ilgili çalışma bulunmamaktadır.

Çalışmamızda; L-TZF'nin bariyer membran olarak etkinliğinin yönlendirilmiş kemik rejenerasyonuna etkisi ve DDL uygulamasının L-TZF' nin rejeneratif potansiyeline etkisinin histomorfometrik olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

2.1.1. Kemik Dokusunun Yapısı

Kemik hem mineral hem de organik yapıdan oluşan metabolik olarak aktif özelleşmiş bir bağ dokusudur. Hücresel elemanları; osteoblastlar, osteositler, kemik örtü hücreleri ve osteoklastlardır. Morfolojik olarak, kansellöz (süngerimsi veya trabeküler) ve kortikal (kompakt veya lameller) kemikten oluşmaktadır [36].

2.1.2. Kemik Hücreleri

a. Osteoprogenitör Hücreler

Osteoprogenitor hücreler, embriyonik mezenşimden köken almaktadır. Spesifik bir doku hücresine farklılaşmadan kök hücre şeklinde kalabilmekte ve yaşamları boyunca çoğalabilme özelliğine sahiptir. Bu hücreler periosteum ve endosteumun içinde bulunmaktadır. Kemik dokuda görülen herhangi bir travma veya hastalık durumunda, kemik morfojenik proteini (BMP) aracılığıyla osteoblastlara dönüşerek, kemiğin tamir mekanizmasında görev almaktadır [37].

b. Osteoblastlar

Kemik yapımından sorumlu olan osteoblastlar, mezenşimal kökenlidir ve kemikteki en aktif hücrelerdir [38]. Osteoblastlar, % 90 oranında tip I kolajen olmak üzere; mineralizasyon için önemli olan glikoproteinler, proteoglikanlar, osteoprotegrin (OPG), osteonektin, osteokalsin, osteopontin gibi proteinleri ve tamir mekanizmasında önemli rolleri olan BMP, dönüştürücü büyüme faktörü- β (TGF- β), trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), insülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I), insülin benzeri büyüme faktörü-2 (IGF-2), interlökin-1 (IL-1) gibi sinyal proteinlerini salgılamaktadır [39, 40]. Bu hücreler, ışık mikroskopunda bazofilik boyanmaktadır [41].

c. Osteositler

Metabolizması yavaşlamış ve bölünme yetenekleri bulunmayan osteoblastlardan meydana gelen osteositler kemikte laküna olarak bilinen boşluklarda yer almaktadırlar

[39, 42]. Osteositlerin görevi, gap junction aracılığıyla kanaliküllerde yayılan diğer osteositlerle, osteoblastlarla veya kemik yüzeyinde bulunan kemik örtü hücreleriyle bağlantı kurmaktır [43, 44].

d. Kemik Örtü Hücreleri

Bölünme yeteneği olmayan osteoblastların sitoplazmalarını kaybedip farklılaşmaları sonucunda meydana gelmektedirler. Kemik örtü hücreleri, pasif yetişkin kemik yüzeyinde bulunmaktadır. Hücreler arası sinyal mekanizmasında görev almaktadırlar [45-47].

e. Osteoklastik Hücreler

Granülösitik makrofaj hücrelerinden köken alan monosit hücrelerinin birleşmeleriyle oluşan çok çekirdekli ve hareketli hücrelerdir [48]. Kemik yüzeyinde oluşturdukları “Hawship Lakünaları” adı verilen eroziv yüzeylerde bulunmaktadır [49]. Osteoklastlar, kemik rezorpsiyonundan sorumlu hücreler olup kemiğin fizyolojik şekillenmesinde, yeniden yapılanmasında ve kemik iyileşmesinde görev almaktadırlar [50].

2.1.3. Kemik Doku Yapım Mekanizmaları

İskelet kemikleri intramembranöz kemikleşme veya endokondral kemikleşme yoluyla meydana gelmektedir [51]. İki kemikleşme türünde de, ilk olarak primer kemik oluşmakta ve daha sonra primer kemik yerini sekonder kemiğe bırakmaktadır [52].

a. İnamembranöz Kemikleşme

Mezenşimal kök hücrelerin osteoblastlara farklılaşarak osteoblastların salgıladıkları matriksin doğrudan kemikleşmesiyle gerçekleşmektedir [53]. Kafatasının yassı kemiklerinde (frontal, pariyetal, oksipital, temporal), maksilla ve mandibulanın bazı bölgeleri ile klavikulanın bir kısmında bu tip kemikleşme gözlenmektedir.

b. Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşmede, mezenşimal kök hücreler ilk olarak kondrositlere farklılaşmaktadır [51]. Kondrositler, kemiğin son şeklini ve pozisyonunu belirlemek

üzere çoğalarak kıkırdak matriksini salgılamaktadır. Oluşan kıkırdak şablon, osteoprogenitör hücrelerden farklılaşan osteoblastlar aracılığıyla sonradan kemikleşmektedir. Bu kemikleşme; uzun kemiklerin formasyonunda, epifizyel büyüme plaklarının oluşumunda ve doğal kemik iyileşmesinde görülmektedir [36].

2.1.4. Kemik Doku Çeşitleri

a. Birincil (Olgunlaşmamış, Örgü, Primitif) Kemik Dokusu

Birincil kemik, embriyonik iskeleti oluşturduktan sonra rezorbe olarak olgun kemik ile yer değiştirmektedir [54]. Yetişkinlerde, kafadaki yassı kemikler, dış alveolleri ve tendonların kemiğe girdiği yerler gibi birkaç yer dışında yerini ikincil kemiğe bırakmaktadır. Birincil kemik dokusu, ikincil kemik dokusuna göre dağınık dizilmiş kolajen liflerin yanı sıra daha az mineral ve sekonder kemik dokusundan daha fazla osteosit içermektedir [49].

b. İkincil (Olgunlaşmış, Lameller, Sekonder) Kemik Dokusu

İkincil kemik dokusu, yetişkinlerde hem kortikal hem de spongiyoz kemikte bulunmaktadır [55]. İkincil kemiğin kolajen lifleri, birbirine paraleldir ve matriks içinde neredeyse homojen mineral dağılımıyla kalınlaşan 4-12 mikrometre arasında farklı tabakalar oluşturmaktadır [49]. Bu organizasyon, lameller kemiğe homojen radyografik görünüm vermektedir [56].

c. Kortikal Kemik ve Kansellöz Kemik

Kortikal (kompakt, lameller) ve spongiyoz (kansellöz, süngerimsi) kemik olarak sınıflandırılan kemikler hem birincil hem de ikincil kemik dokusunu içermektedirler. Bu iki tip kemik, benzer yapı ve matriks kompozisyonuna sahiptir, ancak kortikal kemik spongiyoz kemiğe göre daha büyük kütle/ hacim oranına sahiptir [57].

Kortikal kemik, tüm kemiklerin dış kısımlarını, uzun kemiklerin diyafizini, ilik boşluğunu ve spongiyoz kemik plaklarının etrafını çevrelemektedir. Olgun iskeletin % 80' ini oluşturmaktadır. Kortikal kemik, merkezinde damar ve sinir paketi bulunan, kemiğin uzun aksına paralel seyreden osteon adı verilen silindirik ünitelerden oluşmaktadır [56].

Tüm kemiklerin % 20'sini oluşturan, spongiyoz kemik, kemiklerin metafiz ve epifizlerinin iç kısımları ile yassı kemiklerin iç yüzeylerinde bulunmaktadır ve bu bölgelerde ince bir kortikal kemikle çevrilidir [57]. Trabeküler aralıkları geniştir ve yaşam döngüsü yavaştır. Trabekülleri arasında kemik iliği bulunmaktadır [49].

2.1.5. Kemik İyileşmesi

Kemik, fizyolojik olarak dinamik özelleşmiş bir bağ dokusudur. Kemik dokusu değişken biyomekanik kuvvetlere adapte olabilmek, bozulan kemik bütünlüğünü yeniden sağlayabilmek için lokal ve sistemik faktörlerce yönetilen fizyolojik olarak aktif reaksiyonlar göstermektedir [50].

Kemik dokudaki iyileşme süreci ardışık 3 fazda gerçekleşmektedir [58] ;

- a) İnflamasyon evresi
- b) Onarım evresi (Proliferasyon evresi)
- c) Kemik şekillenmesi ve yeniden şekillenmesi evresi

a. İnflamasyon Evresi

Kemikte meydana gelen hasar sonrasında vasküler endotelin devamlılığı bozulurak kanama başlamakta ve sonrasında hasarlı bölgede trombosit agregasyonu ile fibrin pıhtı meydana gelmektedir. Pıhtı, kemik iyileşmesinin erken döneminde hücrel faaliyetleri yönlendiren ve iyileşme sürecinde önemli olan fiziksel bir matriks görevi görmektedir. Bu fibrin yapı, mezenşimal hücreleri etkileyen ve inflamasyon hücrelerinin aktivitesini arttıran büyüme faktörleriyle iyileşme sürecini yönlendirmektedir [58].

Nötrofiller ve makrofajlar, yeni doku formasyonu başlamadan önce, bakterileri ve hasarlı dokuları temizlemek amacıyla defekt bölgesine göç ederler. İnflamatuar hücreler, vasküler yapılar ve immatür fibroblastlar birlikte granülasyon dokusunu oluşturmaktadır. Yara temizlenme süreci başladığında granülasyon dokusu kademeli olarak kolajen fibrillerden ve hücreden zengin, geçici bağ doku matriksiyle yer değiştirmektedir. Bu aşamadan sonra yara iyileşme sürecinin proliferatif evresi başlamaktadır [58].

b. Onarım Evresi (Proliferatif Faz)

Proliferatif safhada, fibroblast benzeri mezenşimal hücreler tarafından ekstraselüler matriks bileşenlerinin yoğun sentezi gerçekleşmekte ve buna fibroplazi adı verilmektedir [59]. Kemik formasyonundan sorumlu hücrelerin bulunduğu geçici matriks etrafında kan damarları yayılımına anjiyogenezis adı verilmektedir. Bu iki olayın kombinasyonu, geçici bağ dokusu meydana gelmiş olmaktadır. Geçici bağ dokusunun etrafında vaskülarizasyonun artmasıyla osteoprogenitör hücreler bölgeye göç etmektedir. Osteoprogenitör hücreler osteoblastlara farklılaşarak, kolajen sentezi ve mineralizasyon sürecini başlatmaktadır. Sonrasında örgü (woven) kemik oluşumu meydana gelir. Örgü kemik, defekt oluşuktan sonra 2 hafta kadar erken bir sürede iyileşme socketinde tespit edilebilir ve birkaç hafta boyunca yarada kalır. Örgü kemik, herhangi bir yük taşıma kapasitesi olmayan geçici bir kemik türüdür ve bu nedenle olgun kemik tipleri (spongiyoz ve kortikal) ile değiştirmesi gerekmektedir [58].

c. Yeniden Şekillenme Evresi (Remodelling Fazı)

Kemiğin son şeklini ve yapısını kazandığı evredir. Kemik şekillenme sürecinde ilk oluşan kemik, örgü kemiktir. Düzensiz lamelli yapıya sahip olan örgü kemik mekanik kuvvetlere karşı dirençsizdir, ancak vasküler yapı bakımından zengindir ve defekt için stabil bir destek sağlamaktadır. Yeniden şekillenme evresinde örgü kemik, yapım ve yıkım dengesine kavuşarak, mekanik olarak daha güçlü, kortikal ve trabeküler kemik yapısına dönüşümü gerçekleştirmektedir [58]. Bu dönüşüm, osteoklastik aktiviteyle örgü kemiğin (birincil kemik) rezorpsiyonu ve yerini osteoblastik aktiviteyle oluşan ikincil kemiğe bırakmasıyla meydana gelmektedir. Birincil kemik birkaç hafta gibi kısa bir sürede meydana gelirken, ikincil kemiğin tamamen oluşması aylar sürmektedir [60].

Remodelling sadece birincil kemiğin yerini ikincil kemiğe bırakmasında değil; ölü veya hasarlı dokuların tamirinde, kemiğin yüklere karşı adaptasyonunda, beslenmesinde ve/veya metabolik ihtiyaçlara cevapta önemli rol oynamaktadır [61].

2.1.6 Kemik Yapımı ve Rezorpsiyonu

Kemik dokusu normal fizyolojik koşullar altında, osteoklastlar aracılığıyla kemik rezorpsiyonunun ve osteoblastlar aracılığıyla kemik formasyonunun meydana

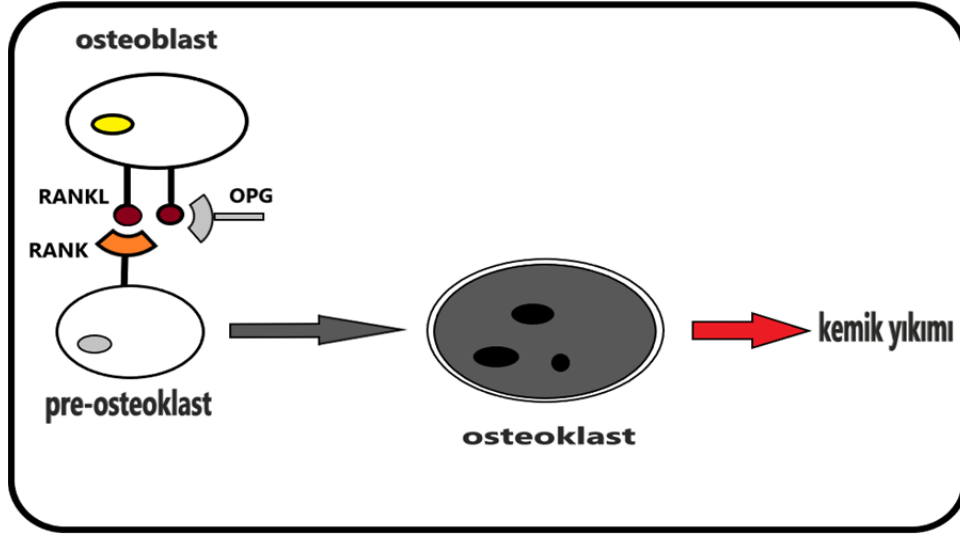
gelmesiyle her zaman dengededir [62]. Bu denge aracılığıyla kemikte sürekli yeniden yapılanma gözlenmektedir [63].

Osteopetrozis gibi bazı durumlarda denge, kemik formasyonun artışı yönünde bozulurken; periodontitis ve osteoporoz gibi inflamatuvar durumlarda ise denge, aşırı bir kemik rezorpsiyonu yönünde bozulmaktadır [64, 65].

Osteoblastlar kemik matriks proteinlerini sentezleyerek kemik yapımında, osteoklast olgunlaşmasını düzenleyerek kemik rezorpsiyonunda rol oynamaktadır [66]. Kemik yapım ve yıkım süreçleri, TNF ailesine bağlı bir dizi sitokin tarafından; (osteoklastogenez indükleyicileri) reseptör aktivator nükleer kappa B ligand (RANKL), reseptör aktivator nükleer kappa B (RANK) ve osteoprotegrin (OPG) tarafından modüle edilmektedir [67-71]. Bu üç peptidin tanımlanması, osteoklast farklılaşması ve aktivitesinin moleküler mekanizmalarını anlaşılmasına büyük katkı sağlamıştır [61, 72-74].

Osteoklast öncüsü (pre-osteoklast) hücrelerin, osteoklast hücrelerine dönüşümü RANKL-RANK etkileşimiyle meydana gelmektedir. İnflamatuvar cevap sırasında interlökin-1 β (IL-1 β), interlökin-6 (IL-6), interlökin-11 (IL-11), interlökin-17 (IL-17) ve Tümör Nekrozitan Faktör-alfa (TNF- α) gibi proinflamatuvar sitokinler, osteoklastlardan RANKL ekspresyonunu arttırıp, osteoblastlardan OPG ekspresyonunu azaltarak pre-osteoklast hücrelerin osteoklastlara dönüşümünü indükler. Aksine interlökin-4 (IL-4), interlökin-12 (IL-12), interlökin-13 (IL-13), interferon-gama (IFN- γ) gibi anti-inflamatuvar sitokinler RANKL ekspresyonunu azaltıp, OPG ekspresyonunu arttırarak pre-osteoklastların osteoklastlara dönüşümünü inhibe etmektedir [75].

Osteoklast farklılaşma faktörü olarak bilinen osteoblast yüzeyindeki RANKL, tümör nekroz faktör (TNF) süper ailesinin bir üyesidir [63]. RANKL pre-osteoklast hücre yüzeyindeki reseptörü RANK'a bağlandığında, proliferasyonu ve farklılaşmayı uyararak osteoklast formasyonunu desteklemektedir [73, 76-78]. OPG, osteoblast gibi hücreler tarafından üretilen bir reseptör proteindir. OPG, osteoblast yüzeyindeki RANKL'ı bağlayarak RANKL-RANK etkileşimini önler ve pre-osteoklastın osteoklasta dönüşümünü inhibe etmektedir (Şekil 1). Dolayısıyla, bu üç protein osteoblastların yönlendirdiği osteoklast farklılaşması için gereklidir ve osteoblastlardaki RANKL ve OPG arasındaki denge, yeni osteoklast üretimini yönetmektedir [73, 79-81].



Şekil 1. RANK-RANKL-OPG etkileşimi [71].

Osteoklast öncü hücreleri RANKL varlığında aktive olmakta ve kemik yıkımında rol almaktadır. OPG varlığında RANKL-RANK etkileşimi bozulmakta ve osteoklast farklılaşması inhibe olmaktadır [71].

2.2. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu (YDR) ve Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu (YKR)

2.2.1. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu

Periodontal tedavilerin amacı, bireyin doğal dişlerini tüm yaşam boyunca optimal fonksiyon ve estetik sağlayacak biçimde korumaktır. Periodontal cerrahiden sonra iyileşme tamir ya da rejenerasyonla olmaktadır. Tamir; yaralanan dokunun yapısal ve fonksiyonel olarak tamamen restore edilmeden iyileşmesidir. Rejenerasyon ise; kayıp ya da hasarlı dokuların yapısal ve fonksiyonel olarak yeniden yapılandırılmasıdır. Optimal periodontal tedavi, periodontal hastalık sonrası kaybedilen periodontal ligament, sement ve alveol kemiği gibi destekleyici dokuların yeniden oluşturulmasını, rejenerasyonunu amaçlamaktadır [4, 9, 82].

Periodontal yara iyileşmesiyle ilgili çalışmalar, periodontal tedavinin çoğunlukla rejenerasyon yerine tamirle sonuçlandığını bildirmiştir. Bu durumda kök yüzeyinde periodontal ligament yerine, uzun bağlantı epiteli; sement ve alveoler kemik yerine ise diş eti bağ doku formasyonu görülmektedir [5, 83, 84]. Melcher 1976' da periodontal tedavi sonrası iyileşme türünün, kök yüzeyine ilk yerleşen ve çoğalmaya başlayan hücre

tipinin belirlediğini açıklamışlardır [85]. Melcher' in "bölümlere ayırma konsepti" ve rejeneratif histolojik çalışmalar; periodontal ligament ve alveoler kemik kaynaklı hücrelerin kök yüzeyinde seçici olarak çoğalmasına izin verilirse periodontal rejenerasyonun gerçekleşebileceğini göstermiştir [4, 5, 82]. Bu bilgiler doğrultusunda yönlendirilmiş doku rejenerasyonu tedavisi ortaya çıkmıştır [86].

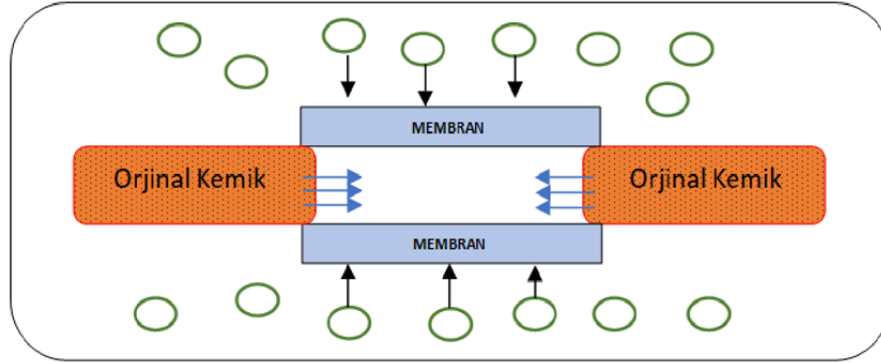
YDR' de, kök yüzeyi ve periodontal defekt bariyer membranla örtülerek izole bir alan oluşturulmaktadır. Böylece periodontal ligament ve osteoblast hücrelerine göre daha hızlı göç eden, diş eti bağ dokusu ve epitel hücreleri hücrelerinin defekt alanında çoğalması engellenmektedir [4, 9]. Membranla oluşturulan kapalı alanda pıhtı formasyonu korunarak defekt içinde, rejeneratif iyileşmeden sorumlu periodontal ligament hücrelerinin çoğalması ve mezenşimal kökenli hücrelerin sementoblastlar ile osteoblastlara dönüşümü sağlanabilmektedir [6, 86]. Bu sonuçlarda dolayı YDR tedavisi günümüzde periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinin rejenerasyonu için etkinliği kanıtlanmış bir yöntemdir [5, 9, 86].

2.2.2. Yönlendirilmiş Kemik Rejenerasyonu

Kemik defektlerinin iyileşme döneminde, farklı dokulardaki hücreler bölgeye göç etmektedir. Oral mukoza destek dokusu olan kemik yapıya kıyasla, daha yüksek iyileşme kapasitesine sahiptir. Bu nedenle ağız içinde meydana gelen sert doku defektlerinde, kemiğin rejenerasyonla iyileşmesi olumsuz etkilenmektedir [9]. Bu durum başarılı bir kemik iyileşmesi sürecinin önündeki en önemli engeldir ve osteojenik kemik hücrelerinden daha hızlı büyüyen bağ dokusu ve epitel hücreleri defekt alanı doldurabilmektedir. Bu tür bir iyileşme modeli osteogenezisi kısmen veya tamamen baskılayabilmektedir [87].

Kemik defektlerinin rejenerasyonunda YKR' ye yönelik çalışmalar Nyman ve Karring tarafından 1980'li yıllarda başlamıştır [88]. Bu yöntemle, YDR' den temel olarak yerleştirilen bariyer membran kullanılması sonucunda, defekt alanlarına bağ dokusu ile epitel hücrelerin göçünü engelleyen sadece osteojenik hücrelerin çoğalabileceği boşluk oluşturulmasıyla yeni kemik elde edilebilmektedir [89]. Bariyer membranların defekt bölgesini mekanik olarak kapatmasıyla defekt bölgesinde pıhtı stabilizasyonu sağlanmış olur ve pıhtı o bölgede doğal bir matriks görevi görmektedir.

Böylece osteojenik hücreler için kemik rejenerasyonuna elverişli izole bir alan elde edilmektedir (Şekil 2) [9, 87, 90].



Şekil 2. Mekanik bariyer kullanılmasıyla yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu prensibinin şematik gösterimi [87].

YKR prosedürü, periodontal defektler, yetersiz kemik hacmini ve yüksekliğini arttırmak amacıyla kemik ogmentasyonunda kullanılan en yaygın yöntemdir [91]. Günümüzde YKR konseptinde; kemik greft materyalleri ve bariyer membranlar birlikte kullanılmaktadır [90].

2.3. Kemik Greft Materyalleri

2.3.1. Kemik Greft Materyallerinin Biyolojisi ve Kemikleşme Mekanizmaları

Kemik defektlerini tedavi etmek amacıyla kemik greftleri ve kemik yerini tutabilecek biyomateryaller kullanılmaktadır. Klinik başarı, oluşan kemiğin yeniden şekillenme sonucu çevre kemik dokusu ile yapısal bütünleşmesi ve fonksiyon görmek için yeterli dayanıklılığa sahip olması ile belirlenmektedir. Kullanılan greft materyallerinin biyolojik mekanizması; osteogenezis, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon özellikleri üzerine kurulur ve biyomateryallerin bu özelliklerden en az birine sahip olması istenmektedir [38].

a. Osteogenezis (osteoproliferasyon)

Greft materyali içindeki canlı hücrelerin transplantasyon sonrası hayatta kalarak, defekt bölgesinde yeni kemik oluşturabilmesidir [38]. Osteojenik özelliğe sahip tek

greft materyali otojen kemiktir. Canlı kansellöz kemik ve kemik iliği örnek olarak gösterilebilmektedir [92].

b. Osteokondüksiyon

Defekt bölgesine yerleştirilen greft materyalinin çatı görevi üstlenerek yüzeyinde yeni kemik oluşumunu destekleyebilmesidir. Kortikal kemik, ksenogreft, allojenik ve alloplastik greft materyalleri osteokondüktif etki sağlamaktadır [92].

c. Osteoindüksiyon

Mezenşimal kök hücrelerin çevre dokularda osteoblastlara dönüşümünün uyarılarak, osteoblastik aktivitenin artırılmasıdır [92]. Böylece greft materyalinin hemen komşuluğunda bulunan çevre yumuşak dokuda kemik formasyonu aktive edilmektedir. Otojen kemik greftleri ve allogreftler osteoindüktif etki sağlamaktadır [93].

2.3.2. YKR’de Kullanılan Kemik Greft Çeşitleri

Kemik greftleri ve kemik grefti yerine kullanılan materyaller kökenlerine göre dört gruba ayrılmaktadır [91].

a. Otojen Greftler

Hastanın kendisinden elde edilen greftlerdir [91]. Otojen greftler çok iyi ostojenik, osteoindüktif ve osteokondüktif kapasiteye sahip oldukları için diş hekimliğinde kemik rejenerasyonunda altın standart olarak kabul edilmektedirler [28]. Otojen greftler bireyin kendisinden ağız içi (simfiz, ramus, ekzositoz vb) ve ağız dışı (iliak krest, tibia vb.) olarak iki farklı kaynaktan elde edilmektedir [94]. Alındıkları bölgeye göre kortikal, kansellöz veya kortiko-kansellöz özellikte olabilirler. Ancak sınırlı miktarda elde edilebilmesi, ikinci cerrahi bölgesi ve verici bölge morbiditesi gibi dezavantajları vardır [95].

b. Allogreftler

Aynı türden fakat farklı genotipe sahip bireylerden elde edilen materyalleridir. Allogreftler insan kadavrasından elde edilir ve dondurulmuş kemik (FB), dondurulmuş-

kurutulmuş kemik (FDB), demineralize dondurulmuş-kurutulmuş kemik (DFDB) olmak üzere üç çeşittir [91].

Allogreft kullanımının en önemli avantajları, verici alan gereksinimini ortadan kaldırması ve miktar kısıtlaması olmamasıdır. Başlıca kısıtlamaları ise; protein içeriğinin bir sonucu olarak gelişebilen immünolojik reaksiyon riski, olası hastalık geçişi ve yüksek maliyetli olmalarından kaynaklanmaktadır [96].

c. Ksenogreftler (Heterogreftler)

Bu materyaller, 1899'dan beri greft materyali olarak kullanılmaktadır ve farklı türler arasında kullanılan greft materyalleridir. Hayvanlar (sığır, domuz, vb.) , mercanlar veya alglerden deproteinize edilerek elde edilen tamamen anorganik mineral yapısındadırlar [91]. Bu materyaller tamamen inorganik yapıdadır, biyouyumludur ve osteokondüktif kapasitesiye sahiptir [97].

Ksenogreftler yüksek biyouyumluluğa sahip olup, yumuşak ve sert dokulara sıkı bir şekilde bağlanabilmektedir [98]. Ksenogreftlerin kullanıldığı deneysel hayvan çalışmalarında, alıcı sahadaki kemikte osteojenik hücrelerin rehberliğinde kemik formasyonunun başladığı, greft partikülleri arasında örgü kemik köprülerini meydana geldiği bildirilmektedir. Oluşan örgü kemiğin yeniden şekillenme ve yer değiştirme periyotları ile lameller kemiğe dönüştüğü gözlenmektedir [97, 99].

Diş hekimliğinde ksenogreftler içerisinde en sık kullanılan kemik greft materyali, deproteinize sığır kaynaklı kemik mineralidir (DSKM) [100]. Ksenogreftlerin başarısını etkileyen en önemli faktör materyalin rezorbsiyon süresidir ve literatürde rezorbsiyonu ile ilgili farklı sonuçlar bulunmaktadır. Uzun rezorbsiyon süresine bağlı olarak iyileşmekte olan kemiğin mekanik ve biyolojik özelliklerini olumsuz etkileyebilmesi, kırılabilirliği ve yüksek maliyeti gibi dezavantajları bulunmaktadır [101, 102].

d. Alloplastlar

Kimyasal yollarla elde edilen ve kemiğin inorganik yapısına benzeyen çeşitli sentetik greft materyalleri, kullanım kolaylıkları ve otojen greftlerin neden olduğu riskleri taşımamaları nedeniyle alternatif bir greft materyali olarak kullanıma sunulmuştur [91]. Kolay elde edilebilmelerinin yanında, materyale karşı yabancı cisim reaksiyonu ortaya çıkabilmesi gibi dezavantajı bulunmaktadır [94].

Farklı fiziksel özelliklere (mikroporöz, makroporöz, nanoporöz) ve farklı rezorpsiyon özelliklerine (rezorbe olan/ olmayan) sahip olan bu materyaller osteokondüktif potansiyele sahiptir [97]. Alloplast greft çeşitleri [103]:

- i. Sentetik Hidroksiapatit (HA)
- ii. Trikalsiyum Fosfat (TCP)
- iii. Hidroksiapatit/ Trikalsiyum Fosfat Kombinasyonu (HA/TCP)
- iv. Bioaktif Cam
- v. Kalsiyum Karbonat (CaCO_3)
- vi. Kalsiyum Sülfat ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- vii. Kompozit Polimerler

2.4. YKR'de Kullanılan Bariyer Membranlar

Periodontal rejenerasyon için YDR/ YKR prosedürleri uygulanmadığında; epitel hücrelerinin hızla defekt üzerine proliferasyon gösterip, osteojenik hücrelerin göçüne engel olarak rejenerasyonu engellediği bilinmektedir. Bu nedenle bariyer membranlar diş hekimliğinde, defekt ile diş eti arasında boşluk oluşturarak selektif hücre çoğalmasını sağlamak için kullanılmaktadır [104].

1992'de Scantlebury bariyer membranların sahip olması gereken beş ana özelliği tanımlamıştır [105]. Buna göre;

a. Biyouyumluluk

Materyal ve doku arasındaki etkileşim çevre dokuları, istenilen iyileşme sonucunu ve hastanın genel güvenliğini olumsuz etkilememelidir. Bu etkileşim defektli çevre dokuların iyileşmesine katkıda bulunarak olumlu etkilemelidir.

b. Boşluk yaratma özelliği

Membranlar istenilen kemik rejenerasyonunu elde etmek için gerekli boşluğu yaratıp devamlılığını sağlayacak kadar dayanıklı olmalıdır. Boşluk içine doku büyümesi için gerekli en uygun alanı korumalı ve dokuya yeterli desteği sağlamalıdır. Bu özellik genel olarak membran kalınlığı ile ilgilidir.

c. Bariyer görevi

Kemik defektinin iyileşmesi sırasında epitel ve bağ doku hücreleri, osteoblastlara göre daha hızlı proliferasyon olmaktadır [84, 106, 107]. Optimal bir bariyer, kemik oluşumunu geciktiren veya önleyen fibröz doku oluşumundan kaçınmak için yeteri kadar tıkaçıcı özelliğe sahip olmalıdır. Tıkaçıcılık membran porozitesiyle yakından ilgilidir, bu faktörün hücre invazyonu potansiyeli üzerinde büyük etkisi vardır [108]. Membranın gözenekli yapısı, doku rejenerasyonu için hayati olan sıvıların, oksijenin, yapı ve büyüme faktörlerinin difüzyonunu sağlamaktadır [109].

d. Dokuyla bütünleşebilme

Konak dokunun membran ile bütünleşmesi esasına dayanan doku integrasyonu, tüm doku rejenerasyon tekniklerinde belirleyici özelliktir. Bariyer zarın yapısal bütünlüğünün ve sınırlarının bitişik orijinal kemiğe uyulanabilirliğinin, öngörülebilir yeni kemik formasyonunun ön koşulu olduğu bilinmektedir [110]. Dokuyla bütünleşme yara iyileşme sürecini stabilize eder ve defekt bölgesine fibröz bağ doku integrasyonunu önlemek için kemik ile materyal arasında sızdırmalık oluşturulmasına yardımcı olmaktadır.

e. Kolay manipüle edilebilme

Membranlar kolay kullanıma sahip olmalıdır. Çok ezilebilir özellikte ve küçük cerrahi bölgelerde tekrarlanabilir şekilde kullanılmıyor ise komplikasyonlar gözlenebilmektedir. Diğer yandan çok sert olan membranlar, kolaylıkla şekillendirilemez ve keskin kenarları dış etini perforate ederek, membranın açığa çıkmasına neden olabilmektedir [105].

Bariyer membranlar rezorpsiyon özelliklerine göre iki jenerasyonda değerlendirilmektedir; birinci jenerasyon rezorbe olmayan bariyer membranlar, İkinci jenerasyon, rezorbe olabilen bariyer membranlardır [111].

2.4.1. Rezorbe Olmayan Bariyer Membranlar

YKR prosedürlerinde ilk kullanılan membranlar, rezorbe olmayan membranlardır [91]. Rezorbe olmayan bariyer membranlar, biyouyumludur ve kanıtlanmış klinik kullanım başarısına sahiptirler [91]. Rezorbe olan membranlara göre yapısal

bütünlüklerinin bozulmaması, defekt boşluğunu daha iyi korumaları, defekt bölgesine doğru çökme, büzülme göstermemeleri gibi fiziksel özellikleri bulunmaktadır. Ancak rijit yapısı nedeniyle membranın ekspoze olması buna bağlı kemik rezorbsiyonları gibi dezantajları vardır [105]. Ayrıca dokuyla bütünleşme özellikleri yoktur ve rezorbe olmadığı için çıkarılmaları için ikinci bir cerrahi müdahale gerektirirler [94]. Bu membranlar iki gruba ayrılmaktadır [105].

- a) Politetrafloroetilen (PTFE) Membran:
 - i. Genişletilmiş-PTFE (expanded/e-PTFE):
 - ii. ii)Yüksek Yoğunluklu-PTFE (high density/ d-PTFE)
 - iii. iii)Titanyumla Güçlendirilmiş-PTFE (titanium reinforced-PTFE)
- b) Titanyum-Mesh Membran

2.4.2. Rezorbe Olan Bariyer Membranlar

Membranın açığa çıkma ihtimalinden ve ikinci cerrahi prosedürden kaçınmak için rezorbe olabilen bariyer membranlar geliştirilmiştir [1]. Yerleştirildikleri bölgede yavaş bir şekilde enzimatik reaksiyonla veya hidroliz yoluyla rezorbe olurlarmaktadır. Bu nedenle çıkarılmaları için ikinci cerrahiye gerek yoktur. Bu membranlar biyoyumludur, esnek ve şekillendirilebilir yapıdadır. Rezorbe olabilen membranların esnek yapısı yetersiz bariyer sağlaması sonucu, fibröz doku oluşturan hücrelerin bölgeye göçünü engellemede başarısız olabilmektedir. Bu membranların mekanik direnci yetersizdir bu nedenle, kemik oluşumu için korunması gereken defekt boşluğunu dışardan gelecek kuvvetlere karşı korumada yetersiz kalabilmektedir [112]. Ayrıca, enzimatik reaksiyonla rezorbe oluşu için immün yanıtı tetikleme riskleri bulunmaktadır [94]. Sentetik ve doğal olmak üzere iki gruba ayrılırlar [94] :

a. Rezorbe Olan Sentetik Bariyer Membranlar

Glikolik asit ve laktik asidin polimerleri şeklinde bulunmaktadır. Bu membranların arasındaki ester bağları 30-60 gün arasında çözünmektedir ve bu çözünmenin sonucunda açığa çıkan serbest asitlere bağlı olarak inflamatuvar reaksiyon gerçekleşebilmektedir. Sentetik rezorbe olabilen bariyer membranlar diğer PTFE ve kolajen membranlar gibi YKR' de başarılı klinik sonuçlar vermektedir [113, 114].

b. Rezorbe Olan Doğal Membranlar

- i. Kolajen membranlar
- ii. Aselüler dermal matrix membranlar
- iii. Fasya lata membranlar
- iv. Pericardium membranlar
- v. Laminar kemikten elde edilen membranlardır.

Kolajen Membranlar:

Kolajen membranlar 1990' lardan beri diş hekimliğinde YDR/ YKR prosedürlerinde kullanılmaktadır [91]. Kolajen insan vücudunun ana yapısal makromolekölüdür ve bariyer membranlar dahil olmak üzere tıpta ihtiyaç duyulan farklı şekillerde kolayca yeniden hazırlanabilmektedir [115]. Membranın en baskın bileşeni olan tip I kolajen, periodontal bağ dokusunun da büyük kısmını oluşturmaktadır [116]. Bu materyallerin manipülasyonu kolaydır ve YKR işlemlerinde standart tedavi protokolünün bir parçası haline gelmiştir [117]. Bu membranlar yabancı cisim reaksiyonu göstermeden rezorbe olurlar, hızlı vaskülarizasyon ve iyi doku uyumu sergilemektedirler [118-120]. Ayrıca fibroblastlar, osteoblastlar için kemotaktik özellikleri bulunmaktadır [121]. Bağ dokusu hücrelerinin membran yapısındaki kolajen zara yapışması, periodontal rejenerasyonu destekler ve defektin pıhtıyla dolmasına yardımcı olarak hemostazı sağlamaktadır [122]. Bu özelliklerinden dolayı kolajen membranlar, rezorbe olabilen YKR bariyerleri içinde ideal bir seçim olarak görülmektedir [18]. Membranın açığa çıkması durumunda, o bölgede rezorbe olarak spontan iyileşme gösterirler bu nedenle rezorbe olmayan membranların aksine çıkarılması gerekmemektedir [91]. Kolajen membranların zayıf mekanik özelliklerinden dolayı defekt bölgesine doğru büzülme göstererek boşluk oluşturabilme özelliklerini [123] ve erken rezorbe olup bariyer özelliklerini kaybedebilmeleri en önemli dezavantajlarıdır [91, 124]. Ancak rezorbe olmalarına rağmen, rejenerasyon bölgesine epitelyal büyümeyi başarılı bir şekilde önleyebilmektedir [18]. Bütün bu özelliklerinde dolayı YDR/ YKR işlemlerinde sıklıkla tercih edilen kolajen membranların, bu prosedürlerinde iyi sonuçlar ve düşük komplikasyon oranına sahip olduğu hem hayvan [123, 125] hem de insan [126, 127] çalışmalarında gösterilmiştir [91].

2.5. YKR'de Güncel Yaklaşımlar

Biyomateryallerin rejenerasyon kapasitesini arttırmak için çeşitli rejeneratif prosedürler tanımlanmıştır. Bu amaçla YDR/ YKR'yi gerçekleştirmek için bariyer membranlarla kullanılan kemik greft materyallerinin yanı sıra, kemik morfogenetik proteinleri (BMP) ve mine matriks türevi (EMD) gibi biyoaktif büyüme faktörleri ve bunların kombinasyonu kullanılmaktadır [128-130]. Günümüzde dokuların iyileşme ve rejenerasyon potansiyelini arttırmak için hastanın kanından elde edilen trombosit konsantreleri araştırılmaktadır [131]. Bu ürünler ilk tanıtıldığında elde edilme protokolleri sırasında ilave maddeler kullanılmaktaydı [132, 133]. Ancak YDR/YKR ile ilgili gerçekleştirilen çalışmalarda, kullanılan yumuşak ve sert doku greft materyallerinde en iyi sonuçların otojen materyaller ile sağlandığı bildirilmiştir [134, 135]. Bu nedenle YDR/YKR operasyonlarında kullanmak amacıyla, trombosit konsantreleri içinde tamamen otojen bir ürün arayışına girilmiştir. 2001 yılında tanıtılan trombositten zengin fibrin (TZF), trombosit konsantreleri içinde tamamen otolog olan ilk üründür. Bu kan kaynaklı biyomateryaller, genellikle yüksek miktarda trombosit ve büyüme faktörü içeren fibrin yapısında ürünlerdir [23]. Fibrin yapı içindeki trombositlerin terapötik amaçla kullanımı iyileşme ve rejenerasyon gerektiren klinik durumlarda olumlu etki sağlamaktadır [136]. Bu nedenle TZF, YDR/YKR prosedürlerinde greft materyali olarak kullanılabilir [137].

Trombositten zengin kan kaynaklı biyomateryallere ilave olarak, periodontal [33] etkinliğini arttırmayı amaçlayan düşük doz lazer tedavisinin fotobiyostimülasyon (FBT) etkisi üzerine araştırmalar devam etmektedir [138]. Bu tedaviyle düşük enerji üretimine sahip hücrenin enerji üretimi artmaktadır [139]. Böylece hücre içi aktivitelerde, nükleik asit sentezinde ve dolayısıyla hücre proliferasyonunda artış meydana gelmektedir [33, 140, 141]. FBT' nin diş eti fibroblastları üzerinde proliferasyon ile hücreden salınan büyüme faktörü sayısını arttırdığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır [140, 142, 143]. Periodontolojide yara iyileşmesinde TZP veya DDLT'nin biyostimülasyon etkisi üzerine ayrı ayrı çalışmalar bulunmasına rağmen ikisinin birlikte etkinliğini araştıran çalışmaların sayısı çok azdır. Yeni bir yöntem olarak, TZF' ye düşük doz lazer ile FBT uygulamasının fibrin yapı içindeki hücrelerin, proliferasyon ve büyüme faktörü salınım miktarının artırılarak periodontal rejenerasyonu etkileyebileceği düşünülmektedir.

2.6. Trombositten Zengin Kan Ürünleri ve Tarihsel Gelişimi

Trombositten zengin biyomateryaller; yara iyileşmesini hızlandırma, rejenerasyon kapasitesini artırma, hemostaz ve iyileşme bölgesinde enfeksiyonu önlemek için 1970' lerin başından itibaren tıpta ve diş hekimliğinde kullanılmaktadır [144].

Kandan elde edilen biyomateryallerin cerrahi alanda toplikal kullanımı, ilk defa 1970' lerin sonlarında Matras'ın deneysel çalışmaları sonucunda fibrin yapıştırıcılarla gündeme gelmiştir [145]. Otojen ve allojen olarak elde edilmektedir. Otojen fibrin yapıştırıcılar plazmadaki fibrinojen konsantrasyonu düşük olduğundan dolayı allojen olanlara göre daha düşük stabiliteye sahiptir. Allojen yapıştırıcılar ise çapraz enfeksiyon geçişine neden olabilmektedir [146]. Fibrin yapıştırıcı içindeki trombosit yokluğu materyalin fiziksel ve biyolojik özelliklerini olumsuz etkilemektedir [144, 147]. Bu dezavantajlarından dolayı fibrin yapıştırıcının kullanımı sınırlı kalmıştır [27, 148].

Trombositlerin yara iyileşmesinde etkili olduğu 1986'da Knigton ve ark. tarafından bildirilmiştir [149]. Whitman ve ark. 1997'de yaranın iyileşme potansiyelini arttırmak amacıyla, fibrin yapıştırıcıların yerine trombosit konsantrelerinin kullanımı tanımlanmış ve elde ettiği ürüne "Trombosit Jeli" adı verilmiştir [150]. Marx ve arkadaşlarının 1998' de, mandibulada yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda trombositten zengin ürünlerin önemi ile ilgili yaptığı çalışmalardan sonra trombosit jeli yerine "Trombositten Zengin Plazma (TZP/PRP)" terimi kullanılmaya başlamıştır. Robert E. Marx tarafından TZP'nin YKR' de başarılı sonuçlar verdiği bildirildikten sonra, diş hekimliğinde kullanımı yaygınlaşmıştır [151]. TZP, trombosit içeriğinden dolayı fibrin yapıştırıcıların aksine büyüme faktörü bakımından zengin bir materyaldir [152].

TZP' nin formülasyonuna bağlı zayıf mekanik özellikleri ve karmaşık hazırlama protokolünden kaçınmak amacıyla Choukroun ve ark. 2001 yılında "Trombositten Zengin Fibrini (TZF/ PRF)" geliştirmişlerdir [144]. TZF, tamamen otolog bir ürün olduğu için ikinci nesil trombosit konsantresi olarak adlandırılmıştır [26, 144, 153]. Bu tanımlama trombosit ürünlerinin terminolojisi bakımından bir dönüm noktası olmuştur [154].

2006 yılında Sacco ve arkadaşları tarafından "Konsantre Büyüme Faktörü (CGF)" tanımlanmıştır [155, 156].

Ehrenfest ve arkadaşları 2009’ da trombosit konsantrelerini, lökosit ve fibrin içeriğine göre 4 kategoride sınıflandırmıştır; (1) saf trombosit zengin plazma (P-TZP), (2) lökosit ve trombosit zengin plazma (L-TZP/ TZP), (3) saf trombosit zengin fibrin (P-TZF), (4) lökosit ve trombosit zengin fibrin (L-TZF/ TZF) [157].

2014 yılında Choukroun ve ark. TZF’ ye göre lökosit içeriği daha yoğun olan “ileri (advanced) lökosit ve trombosit zengin fibrini (A-TZF)” tanımlamışlardır [158].

Choukroun ve arkadaşları 2017 yılında, adını enjekte edilebilir olma özelliğinden alan “enjekte edilebilir (injectable) lökosit ve trombosit zengin fibrin (i-TZF)” kullanımını bildirmişlerdir [159].

Trombosit konsantrelerinin yumuşak ve kemik dokunun rejeneratif potansiyelini arttırdığı in-vivo ve in-vitro çalışmalarla desteklenmiştir [26, 151, 160-162]. Kandan elde edilen bu biyomateryaller tıpta; ortopedik cerrahi, kardiyoloji, dermatoloji, plastik cerrahi, kulak-burun-boğaz gibi farklı alanlarda, diş hekimliğinde; çekim socketinin iyileşmesinde, dental implant osseointegrasyonunda, sinüs lift prosedürlerinde, periodontal yumuşak doku ve kemik defektlerinin iyileşmesinde, YDR ve YKR işlemlerinde tek başına defekt içine veya greft materyalleriyle karıştırılarak kullanılmaktadır [163].

Trombosit ürünlerinin iyileşmeye olan katkıları, yoğun trombosit ve lökosit içeriklerine bağlıdır. L-TZF’ de kanın santrifüj edilmesiyle elde edilen fibrin matriks içindeki trombosit konsantrasyonu yaklaşık 3000 kat artmaktadır [164]. Santrifüj sonrası konsantre hale gelen trombosit ve lökositlerden salınan çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin yumuşak doku ile kemik iyileşmesi üzerindeki olumlu etkileri, bu ürünlerin YDR/ YKR tedavilerinde kullanımının giderek artmasını sağlamıştır [163].

2.6.1. Trombosit Konsantrelerinin Özellikleri

a. Saf Trombosit Zengin Plazma (P-TZP/ P-PRP)

P-TZP, kanın santrifüjle aktivasyonundan sonra lökosit içermeyen, trombosit zengin, düşük yoğunlukta fibrin yapıya sahiptir. Lökositlerin fibrin yapıdan ayrılması için santrifüj cihazı yerine hücre ayırıcı sistemlerin kullanılması gerekmektedir. Hazırlanmasında pıhtılaşma faktörlerine ek olarak, dışarıdan CaCl₂ ve/veya sığır trombinini gerektiği için tamamen otolog değildir [165, 166]. Oluşan fibrin ağ, sıvı

formda olduğu için başka biyomateryallerle kombine edilerek kullanılması gerekmektedir. Hazırlama süresi çok uzundur ve yüksek maliyetlidir. Bu durumlar klinik uygulama aşamalarını zorlaştırdığından dolayı, P-TZP'nin rutin kullanımı sınırlı kalmaktadır [165].

P-PRP, Anitua tarafından geliştirilen manuel bir protokol olan, PRGF ticari adıyla da bilinmektedir [167]. Bu sistemde fibrin polimerizasyonu için trombin yerine CaCl₂ kullanılmaktadır. CaCl₂ trombine göre daha yavaş fibrin polimerizasyonuna neden olmaktadır [168]. Bu fibrin ağ büyüme faktörleri ve sitokinlerin daha uzun süreli salınımını gerçekleştirmektedir. Normal kana göre 2-3 kat daha fazla trombosit içermektedir ve bu hafif artış optimal terapötik etkiyle ilişkilendirilmektedir. Optimalden daha yüksek trombosit seviyesinin baskılayıcı etkiye neden olduğu bildirilmektedir [168, 169].

PRGF içinde lökositler yer almamaktadır [168, 170]. Lökositler antimikrobiyal etkinliğini gerçekleştirirken salgıladıkları enzimlerle sağlıklı çevre dokuda da tahribat yaratmaktadırlar. Bu durumun rejenerasyonu olumsuz etkileyebileceği düşünüldüğünden dolayı PRGF içindeki lökositler seçici olarak ayrılmıştır [168, 171].

Bu avantajlarının yanında PRGF, santrifüj parametreleri ve elde edilmiş yönteminde standardizasyon yakalanamamıştır. Elde edilme aşamalarındaki hatalara bağlı olarak, lökositler tam olarak ayrıştırılamadığı için materyal daha çok L-PRP'nin daha zayıf lökositli haline benzetilmektedir [157]. PRGF preparatları, bozulmaya dirençsizdir ve saklanması zordur [172]. L-TZF sistemlerine göre kullanımı daha zor ve maliyeti daha yüksektir. Bu dezavantajları göz önüne alındığında klinik kullanımı tercih edilmemektedir [132, 157].

b. Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma (TZP/ PRP/ L-TZP/ L-PRP)

Kan örneğinin santrifüjle aktivasyonundan sonra, lökosit ve trombosit zengin düşük yoğunlukta fibrin yapı meydana gelmektedir. Fibrin matrisi; % 95 trombosit, % 1 lökosit ve % 4 oranında eritrosit içermektedir [173].

Trombosit içeriği sayesinde büyüme faktörlerinin istenilen bölgede salınımı sağlanabilmektedir. Yapılan araştırmalarda TZP'nin yumuşak ve sert dokunun rejenerasyonunu arttırdığı gözlenmiştir [151, 174]. Lökosit içeriği sayesinde immün sistemi destekleyerek antimikrobiyal özelliğe sahip olduğu gösterilmiştir [175].

TZP yapısı hazırlandıktan sonra 8 saat boyunca stabil kalmaktadır ve bu süre içinde uygulanmalıdır [151]. İçeriğindeki büyüme faktörlerinin % 95' ini uygulandığı bölgeye 1 saat içinde salgılamaktadır ve etkinliği 7 gün boyunca devam etmektedir [176]. P-TZP gibi sıvı/ jel formdadır bu nedenle başka biyomateryallerle kombine edilerek veya istenilen bölgeye enjekte edilerek kullanılması gerekmektedir [165]. İki aşamalı santrifüj tekniğiyle elde edilmektedir. İçeriğine eklenen trombosit aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu için eklenen sıgır trombinine nadiren de olsa reaksiyon gelişebilmektedir. Bu nedenle içeriğindeki trombin miktarı zamanla azaltılmıştır [177]. Trombin miktarının azaltılması sonucu fibrin yapının mekanik özellikleri zayıfladığı için klinik kullanımı zorlaşmıştır. Ayrıca TZP, fibrin ağın yapısından dolayı büyüme faktörlerinin salınımını çok kısa sürede gerçekleştirdiğinden YKR tedavilerinde etkinliğinin sınırlı olduğu olduğu gözlenmiştir [165, 178].

c. Saf Trombositten Zengin Fibrin (P-TZF/ P-PRF)

Santrifüjle hazırlanıp aktivasyonundan sonra lökosit içermeyen, trombosit zengin yüksek yoğunluklu fibrin yapıya sahiptir [157]. Trombosit aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu trombin varlığında gerçekleşmektedir. Fibrin matriks yapısı TZP ürünlerine göre daha yoğun yapıdadır ve daha geç çözünmektedir. Bu ürün sadece jel formda elde edildiğinden enjekte edilen fibrin yapıştırıcılar gibi kullanılamazlar [157].

d. Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin (L-TZF/ TZF/ L-PRF/ PRF)

L-TZF 2000'li yılların başında, intraoral cerrahi prosedürlerini takiben yara iyileşmesini ve doku rejenerasyonunu arttırmak için terapötik bir biyomateryal olarak Dr. Joseph Choukroun ve ark. tarafından geliştirilmiştir [153]. Tamamen otolog olması ve trombosit aktivasyonu için ekstrensek bir maddeye ihtiyaç duyulmamasından dolayı, ikinci jenerasyon trombosit konsantrisi olarak kabul edilmektedir [157]. İlk olarak TZF olarak isimlendirilen bu fibrin yapı, zengin lökosit içeriğinden dolayı sonradan, L-TZF olarak da isimlendirilmektedir [153, 157]. TZF, venöz kanın herhangi bir biyokimyasal manipülasyon içermeden, antikoagülan içermeyen 10 mililitre (ml) tüpte tek aşama santrifüj işlemiyle elde edilmektedir [144, 179, 180].

Trombosit aktivasyonu, kanın cam tüpe temasından hemen sonra başladığı için bekletmeden santrifüj edilmelidir. Trombosit aktivasyonu, trombositlerin içinde

bulunan büyüme faktörleri ve lökositlerden de salınan sitokinler açığa çıkarak fibrin matriks içinde hapsolmaktadır [180]. Elde edilen matriks trombositlerin, lökositlerin, büyüme faktörlerinin ve dolaşımında bulunan kök hücrelerin konsantre halde bulunduğu, kompleks, güçlü, üç boyutlu fibrin yapıdan oluşmaktadır [157]. TZF elde edilen kan örneğinin içeriğindeki trombositin % 90'ından ve lökositin % 50'sinden fazlasını fibrin yapı içinde korumaktadır [181].

Araştırmacılar TZF' nin özelliklerini geliştirmek amacıyla kan örneğin toplandığı tüpün özelliklerini, santrifüj hızını ve süresini değiştirerek; konsantre büyüme faktörü (CGF), ileri trombosit zengin fibrin (A-TZF/A-PRF), enjekte edilebilir trombosit zengin fibrin (i-TZF/i-PRF) ürünlerini tanımlamışlardır. Bu ürünler ikinci jenerasyon trombosit konsantrelerinin özelliklerine uygun olarak tamamen otolog ürünlerdir ve polimerizasyonları için dışarıdan herhangi bir ürüne ihtiyaç duymamaktadırlar [156, 181].

e. Konsantre Büyüme Faktörü (CGF)

Sacco ve ark. tarafından 2006 yılında geliştirilmiştir [182]. Alınan venöz kan örneğinin TZF' de olduğu gibi santrifüj edilmesiyle üretilmektedir ancak, santrifüj protokolüyle TZF' den ayrılmaktadır. TZF' den farklı olarak CGF' de polimerizasyon için 2400 ile 2700 rpm arasında değişen hızlar kullanılmaktadır [156]. Bu nedenle CGF kan örnekleri, özel bir santrifüj cihazında dönüşümlü ve kontrollü hızlarda (2700 rpm'de 2 dk, 2400 rpm'de 3 dk, 2700 rpm'de 4 dk, 2400 rpm'de 3 dk) santrifüj edilerek hazırlanmaktadır [183]. Santrifüjden sonra kan 4 tabakaya ayrılmaktadır; birinci tabaka trombosit zengin plazma, ikinci tabaka buffy coat, üçüncü tabaka asıl CGF' yi oluşturan büyüme faktörlerinin yer aldığı katman ve en altta kırmızı kan hücrelerinden zengin tabaka yer almaktadır [156].

CGF ve TZF neredeyse aynı bileşenleri içermektedir ve benzer fibrin yapıya sahiptir. Ancak CGF fibrin matriksinin sahip olduğu yüksek gerilme dayanıklılığı ve viskozite, büyüme faktörlerini daha uzun süre koruyarak salınım sürelerini uzatmaktadır [156]. Santrifüj hızındaki değişikliklerin, fibrin yapı içinde yer alan trombosit sayısını ve trombositlerden salınan büyüme faktörü miktarını arttırabildiği bildirilmiştir [180]. Belirtilen bu avantajlarının yanı sıra CGF ve TZF' nin kemik defektinin iyileşmesinde

kullanıldığı bir hayvan çalışmasında, osteojenik potansiyelleri arasından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmediği bildirilmiştir [156].

f. İleri Trombositten Zengin Fibrin (A-TZF)

2014 yılında Dr. Joseph Choukroun, doku rejenerasyonunu arttırmak amacıyla santrifüj protokollerini değiştirerek daha fazla sayıda lökosit içeren gelişmiş bir TZF formu tanımlamıştır. A-TZF, standart TZF protokolüne göre daha yavaş hızda (1500 rpm 14 dk, yaklaşık 198 g kuvvet) santrifüj ile elde edilmektedir [181, 184]. Düşük hız polimerizasyon için gerekli sürenin uzamasına neden olmaktadır. Bu hazırlama protokolü, A-TZF fibrin ağının L-TZF'den daha yumuşak, hafif ve daha hızlı rezorbe olmasıyla sonuçlanmaktadır [165]. Ehrenfest ve ark. A-TZF'nin, TZF'ye göre en az % 30 daha küçük hacimde oluştuğunu bildirilmişlerdir [179]. Biyomateryalin fibrin yapısının sahip olduğu bu zayıf fiziksel özellikler, fibrin ağın L-TZF'ye göre daha az büyüme faktörü içermesine ve büyüme faktörlerinin daha kısa süre salınımına neden olmaktadır [179].

g. Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin (i-TZF)

Dr. Joseph Choukroun tarafından geliştirilmiştir ve adını enjekte edilebilir olma özelliğinden almaktadır. i-TZF hazırlanırken kullanılan santrifüj protokolüyle (700-800 rpm 3-4 dk) ile diğer TZF türlerine göre fibrin yapıda daha yüksek konsantrasyonda büyüme faktörü ve rejeneratif hücre gözlenebilmektedir [158, 185]. i-TZF'nin akışkan fibrin yapısı, başka biyomateryallerle beraber kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Partiküler kemik greftiyle birleştirilerek (jelöz kemik grefti- sticky bone) veya diş eti, deri gibi dokuların içine enjekte edilerek kullanılabilir [185].

2.6.2. TZF'nin Hazırlanması

Hastadan elde edilen venöz kan, antikoagülan içermeyen 10 ml tüplere alınarak, 2700 rpm' de 12 dk santrifüj edilmektedir [157, 180]. Antikoagülsüz cam tüpte, trombosit aktivasyonu ve fibrin polimerizasyonu, kanın camdaki silika ile temasından hemen sonra meydana gelmektedir ve böylece koagülasyon süreci başlamaktadır [144]. Trombosit aktivasyonu, kanın tüple temastan hemen sonra başladığından santrifüj işlemi geciktirilmeden gerçekleştirilmelidir [157]. Elde edilen TZF, geleneksel fibrin

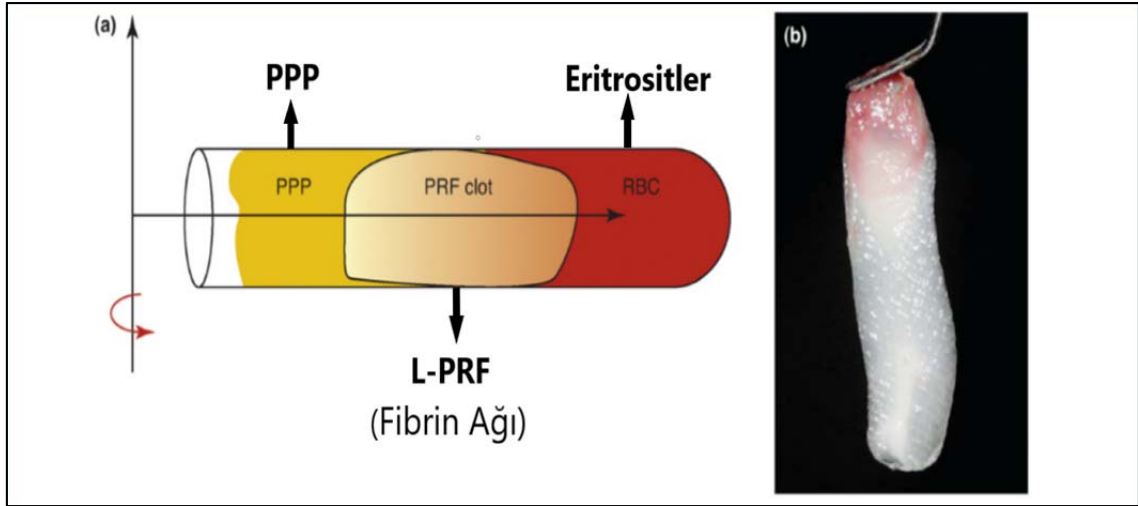
yapıştırıcıları gibi enjekte edilmez, meydana gelen güçlü fibrin yapıdan dolayı daha yoğun formdadır [27, 132].

İşlem sonunda tüpte 3 ayrı tabaka meydana gelmektedir [186]:

-en altta kırmızı renkli tabaka: eritrositlerden meydana gelmektedir.

-ortada fibrin pıhtıyı içeren tabaka: TZF pıhtı, elde edilen kandaki trombositlerin çoğunu, büyüme faktörlerini, sitokinleri ve lökositlerin yaklaşık yarısını içeren güçlü bir üç boyutlu fibrin ağıdır.

-en üstte açık sarı renkli tabaka: Aselüler (hüresiz) ve trombositten fakir plazma (PPP) den oluşmaktadır [186].



Şekil 3. TZF fibrin pıhtı. a) L-TZF elde edilirken santrifüj tüpünde oluşan katmanlar [144]. b) L-TZF fibrin ağı kullanıma hazır hali. Kompresyondan sonra kolaylıkla membran yerine kullanılabilir [157].

Dr. Joseph Choukrun tarafından 2007 yılında TZF pıhtı ve membranlarının hazırlanmasında, standardizasyonu sağlamak amacıyla kompresyonda kullanılacak metal bir kap (PRF-Kutu, PRF-Box, Process, Nice, France) üretilmiştir [172]. L-TZF steril bir penset yardımıyla tüpten çıkarılır, tabandaki kırmızı kan hücresi tabakasından ayrılarak steril TZF-Kutu'nun içine aktarılmaktadır [144, 172]. TZF'nin membran haline getirilmesinde, kompresyon tekniği yerine TZF-Kutu kullanıldığında; uygulandıktan 20 dk, 1 saat, 4 saat ve 168 saat sonra salınan büyüme faktörü miktarının daha yüksek olduğu bildirilmiştir [172].

Elde edilen TZF gövdesinin sarı bir fibrin pıhtı tabakasından oluştuğu görülmektedir [178]. Sarı fibrin pıhtı ile pıhtının uç kısmındaki kırmızı kan hücrelerinden oluşan kırmızı bölge arasında beyaz renkli bir tabaka bulunmaktadır. “buffy coat” olarak adlandırılan bu bölge yoğun ve geniş kümeler halinde bulunan fibrin ve trombositlerden oluşmaktadır [133].

TZF tekniğinin başarısı kanın toplanması ve santrifüj edilmesi arasında geçen sürenin kısa olmasına bağlıdır. Yavaş ve yetersiz kan alma işlemi, kanın cam tüple temasından sonra hemen pıhtılaşmaya başlamasına ve zayıf mekanik özelliklere sahip, stabil olmayan az miktarda TZF benzeri fibrin yapının oluşmasına neden olmaktadır [133].

2.6.3. TZF Pıhtıdaki Trombosit, Lökosit ile Fibrinin Yapısı ve Dokulardaki Etkileri

a. Trombositlerin Yapısı ve Biyolojik Etkileri

Santrifüjden sonra kan örneğinin içindeki trombositlerin en az % 90’ını fibrin ağ içinde yer almaktadır. Trombositlerin koagülasyon, inflamasyon, antimikrobiyal konak savunması, anjiyogenez ve yara iyileşmesinde önemli görevleri bulunmaktadır [187]. Trombositler kemik iliğindeki megakaryositlerden köken alırlar ve dolaşımında çekirdeksiz halde bulunmaktadır. Ortalama ömürleri yaklaşık 8-10 gündür [178]. Çekirdeksiz hücreler olmalarına rağmen, oldukça aktif hücreler olan trombositler alfa granüller, yoğun granüller ve lizozomal granüller olmak üzere üç farklı granül içermektedirler. Bunlar içinde en fazla bulunan salgı granülü, alfa granüllerdir [187]. Alfa granülleri, trombositte özgü β -tromboglobulin ve trombositlere özgü olmaya trombospondin, fibronektin, fibrinojen, diğer pıhtılaşma faktörleri, büyüme faktörleri, fibrinolizis inhibitörleri ve immunoglobulinler gibi birçok protein içermektedir [178]. Lizozomal granüller, bakterisidal etkiye sahiptir ve sindirim enzimlerini içermektedirler [188]. Yoğun granüller, en küçük trombosit granülleridir ve protein olmayan küçük molekülleri içerirler. Kalsiyum iyonları, ADP, ATP ve plazmaya göre yüz kat daha fazla serotonin içermektedirler [188].

Trombositler, yaralanmanın ilk aşamasında kemotaksisi uyararak doku hasarı olan bölgede pıhtılaşma mekanizmasını başlatmaktadır. Vasküler endotel hasara uğradıktan sonra açığa çıkan kolajenle temas eden trombositler, aktif hale geçerek tromboplastini

üretmektedir. Tromboplastin, protrombini trombine; trombin plazmadaki fibrinojeni fibrin ağına dönüştürerek bölgede ilk tıkaçı oluşturmaktadır [144, 189].

Trombositler pıhtı organizasyonun yanı sıra, yara iyileşmesini başlatan ve yöneten büyüme faktörleri ile sitokinleri içermektedir [174]. Büyüme faktörleri, hücrelerin doku tamiri ve rejenerasyonundaki kemotaksi, çoğalma, farklılaşma ve ekstraselüler matriks sentezi gibi anahtar hücrel olayları düzenleyen bir dizi biyolojik mediyatörlerdir [151]. Vasküler endotelin hasarı sonrası yara bölgesinde stabil trombosit tıkaçı (pıhtı) meydana gelmektedir. Pıhtı formasyonundan sonra trombositler degranüle olarak, tamir ve rejenerasyonu arttırmak için, yara bölgesine PDGF (trombosit kaynaklı büyüme faktörü), TGF- β (dönüştürücü büyüme faktörü- β), VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü), IGF (insülin büyüme faktörü-I ve insülin benzeri büyüme faktörü-II), ve FGF (fibroblast büyüme faktörü) gibi bir dizi büyüme faktörleri salgılamaktadırlar [166]. VEGF, PDGF ve IGF; kemik rejenerasyonu için en aktif büyüme faktörleridir [190].

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF kemik matriksi içinde doğal olarak var olan bir protein olarak tanımlanmaktadır. Osteoblastik hücrelerin bölgeye göçüne ve çoğalmasına, kolajenin ve kemik matriksinin sentezinin artmasına etki ederek, kemik formasyonunu arttırmaktadır [191, 192]. Ayrıca, mezenşimal kök hücre göçü, çoğalması ve devamlılığı için gerekli düzenleyicidir [193, 194].

Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (TGF- β)

Trombositler ve kemikte yüksek konsantrasyonda bulunmaktadır [195]. TGF- β 'lar anjiyogenetik etkiye sahiptir, osteoblast öncü hücrelerinin kemotaksisini ve mitogenezini artırırken, osteoklast formasyonunu ve kemik rezorpsiyonunu inhibe ederek kemik formasyonunu sağlamaktadırlar [178].

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

Anjiyogenez ile ilgili süreçleri başlatan anahtar mediyatördür [196, 197]. Endotel hücrelerinin proliferasyonunu ve farklılaşmasını düzenlemektedirler [198, 199].

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

Tümör hücreleri dahil birçok hücre tipi için çoğalma ve farklılaşmanın pozitif düzenleyicisidir [200]. IGF-I ve IGF-II kemik matriksinde depo edilmektedir ve kemik rezorpsiyonu meydana geldiğinde aktive olarak yeni kemik formasyonunu stimüle etmektedirler [167].

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Osteoblastlar üzerinde mitojenik etki göstererek; kemik dokusunun gelişiminde, büyümesinde, remodelinginde ve tamirinde rol oynamaktadır [187].

b. Lökositlerin Yapısı ve Biyolojik Etkileri

Santrifüj edilen kanın içindeki lökositlerin en az % 75' inin fibrin matriks içinde yer aldığını bildirilmiştir. Lökositler TZF matriksi içinde önemli role sahiptirler. Lökositler hücre çoğalması ve farklılaşmasını düzenlemektedir. Ayrıca yara iyileşmesi ve neoanjiyogenezde hücre sel cevabı oluşturan ilk hücrelerdir [147]. İyileşme bölgesinde anti-enfeksiyöz etkinlik [201] ve immün modölatör özellik [180] sergilemektedirler. Lökositler TZF oluşum süreci boyunca, hemostatik ve inflamatuvar olayların uyarılmasına karşılık olarak sitokin salgılamaktadırlar. Lökositlerden salınan sitokinler, santrifüj sonucunda oluşan üç boyutlu fibrin yapının polimerizasyonu sırasında fibrin ağ yapısı içerisinde hapsolmaktadır ve daha sonra trombositler gibi, yavaş salınımları gerçekleşmektedir [144].

Dohan ve ark. TZF, serum ve trombositten fakir plazma interlökin IL-1 β , IL-4, IL-6, tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) ve VEGF miktarlarını karşılaştırmışlardır [180]. Tüm parametrelerin TZF' de en yüksek düzeyde bulunduğunu ve sitokin seviyelerindeki bu artışın TZF' deki lökosit degranülasyonu tarafından sağlandığını bildirmişlerdir. Sitokin düzeylerindeki bu artışın, TZF' nin savunma kapasitesini arttırdığı ileri sürülmektedir [180]. Lökositler, sitokinlere ilave olarak trombositler gibi TGF- β 1, PDGF, VEGF, IGF ve FGF gibi yara iyileşmesinde önemli olan büyüme faktörleri salgılamaktadırlar [202, 203]. Ehrenfest ve ark. yaptıkları bir çalışmada, fibrin yapı içindeki lökositlerin TGF- β ve VEGF' nin yavaş salınımlarında önemli rolü olduğunu belirtmişlerdir [27].

TZF yapı içinde lökositlerden salgılanan inflamatuvar sitokinler:

İnflamasyonda rol alan çok sayıda sitokin bulunmaktadır. TZF' nin içeriğinde bulunan ve inflamasyonda en fazla etkiye sahip olan sitokinler IL-1 β , IL-6 ve TNF- α ' dır [178].

TZF yapı içinde lökositlerden salgılanan anti-inflamatuvar sitokinler:

Lökositlerin yapısından IL-4, IL-10 ve IL-13 gibi anti-inflamatuvar sitokinler salgılanmaktadır. Bu sitokinler içinde en önemli etkiye sahip olan IL-4' tür [178].

c. Fibrin Yapı

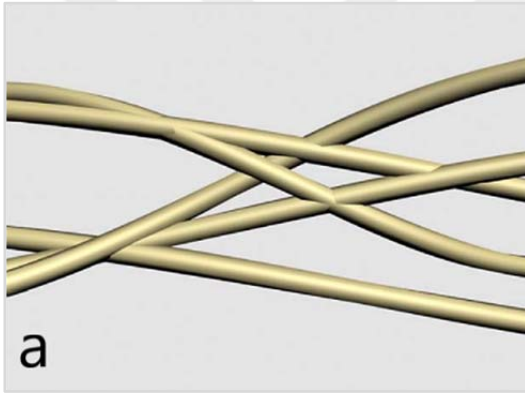
Bir plazma molekülü olan fibrinojenin trombositler tarafından aktive edilmesiyle ortaya çıkmaktadır [204]. Çözünebilir bir protein olan fibrinojen trombin aracılığıyla çözünemeyen bir protein olan fibrine dönüşmektedir. Hem plazmada hem de trombosit α -granüllerinde yaygın olarak bulunmaktadır. Pıhtılaşma sırasında ilk trombosit kümelenmesini birleştiren, böylece vasküler endotelin hasarlı bölgesi boyunca koruyucu bir duvar oluşturabilen biyolojik bir yapıştırıcı olarak görev almaktadır. Böylece fibrin jel yaralanan bölgenin ilk sikatrisyel maktriğini oluşturmaktadır [205-207].

Fibrin ağ, doğal mikro gözenekli bir yapı oluşturarak doğal çevreyi taklit ederek hücre yapışması, çoğalması ve göçü için elverişli bir ortam oluşturmaktadır [208]. Kolajen liflerin bir ağ oluşturmak için diğer proteinlere ihtiyacı olmasına rağmen, fibrin lifleri başka proteine ihtiyaç duymadan kendi lifleri sayesinde ağ oluşturabilmektedir [208-210]. Fibrin matriksin anjiyogenez özelliği, üç boyutlu yapısı ve matriks içinde yer alan büyüme faktörleri ile açıklanmaktadır [144, 186, 211].

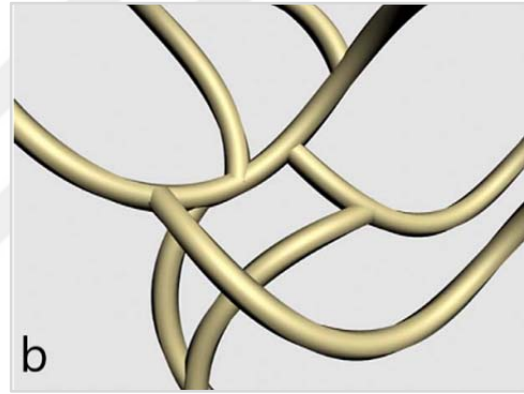
YDR ve YKR işlemlerinde, TZF ve diğer trombositten zengin kan ürünlerinin kullanılmasının amacı, rejenerasyon bölgesinde yaralanma sonucu trombosit tıkaçı içerisinde meydana gelen fibrin matriksi taklit eden, büyüme faktörleri içeren bir fibrin ağ oluşturmaktır [35]. Fibrin ağın üç boyutlu yapısı, fibrinojen konsantrasyonunu, fibrin sıklığını ve polimerizasyon derecesini, fibrin matriksin içeriğini, fonksiyonunu ve stabilizasyon süresini etkilemektedir. Bu nedenle elde edilen fibrin matriksin biyolojik ve fiziksel özellikleri uygulandığı dokunun rejenerasyon kapasitesini doğrudan değiştirmektedir [157]. Fibrinin biyolojik kapasitesi, iyileşme bölgesinde etrafını çevreleyen doku ile etkileşime girme kapasitesine dayanmaktadır. Böylece fibrin, yara

bölgesinde hücre bağlanması ve proliferasyonu için iletken bir iskele görevi görmektedir [208, 212, 213].

Polimerizasyon şekli fibrinin ağının biyolojik ve mekanik özelliklerinin belirlenmesinde önemlidir [208]. Fibrinin ağının jelleşmesi sırasında sıkışmış bilateral (tetramoleküler) (Şekil 4) ve equilateral (trimoleküler) (şekil 5) bağlar oluşabilmektedir [167]. Bilateral bağlarda yüksek trombosit konsantrasyonları nedeniyle kalın fibrin polimerler meydana gelir, bu durum hücrel migrasyonu ve sitokinlerin ağa tutunmasını olumsuz etkilemektedir. Equilateral bağlarda ise fizyolojik trombosit konsantrasyonlarında oluşan polimerler sayesinde esnek bir fibrin ağ meydana gelir, böylece hücrel migrasyonu ve sitokinlerin ağa tutunması desteklenmektedir [214, 215].

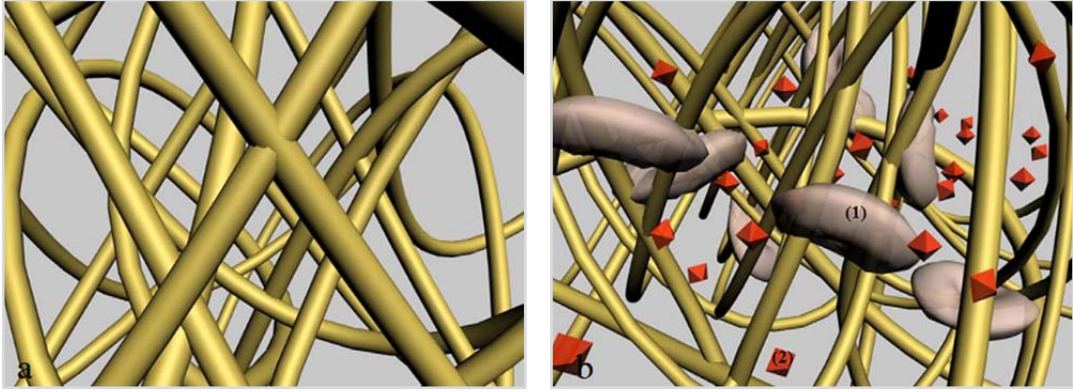


Şekil 4 (a) Bilateral bağların gösterimi [144].



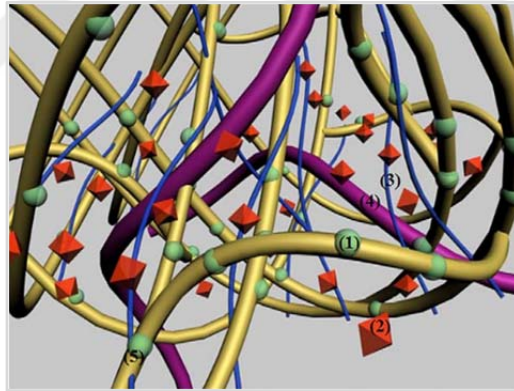
Şekil 5. (b) Equilateral bağların gösterimi [144].

Fibrin yapıştırıcılar, TZP ve TZF arasında temel farklardan biri jelleşme farklılıklarıdır. Fibrin yapıştırıcılar ile TZP'nin, koagülasyonu ve ani fibrin polimerizasyonu için sığır trombini ve kalsiyum klorür kullanılmaktadır. Bu tür bir polimerizasyon, final fibrin matriksin biyolojik ve mekanik özelliklerinin olumsuz etkilenmesiyle sonuçlanmaktadır. Bu polimerizasyon sonucunda, trombosit sitokinleri fibrin matrikse ekstrensek olarak yerleşir ve matriksten salınımları da hızlı olmaktadır (Şekil 6 a,b) [144].



Şekil 6. Fibrin yapıştırıcı ve TZP fibrin ağının görünümü a) Fibrin yapıştırıcıdaki fibrin ağı [178]. b) TZP polimerizasyonu sonucu oluşan fibrin ağı (1.trombositler, 2. ekstrasik sitokinler) [178].

TZF; TZP ile fibrin adezivin aksine fizyolojik polimerizasyonla meydana gelmektedir. Fizyolojik polimerizasyon, dolaşımdaki sitokinlerin fibrin matrikse intrinsek olarak yerleşmesi olarak tanımlanmaktadır (Şekil 7). Böyle bir konfigürasyon sitokinlerin fibrin ağ içinde depolanıp, ilk sikatriyel matriksin yeniden şekillenmesi sırasında aşamalı olarak salınmasını sağlamaktadır (uzun süreli etki) [178].



Şekil 7. TZF fibrin yapı (1.intrinsik sitokinler, 2.ekstrasik sitokinler, 3. Fibrinle ilişkili glikanik zincirler, 4. Fibronektin, 5. Fibrin fibrilleri) [178].

2.6.4. TZF' nin İyileşme Mekanizması Üzerine Biyolojik Etkileri

TZF, immünite ve iyileşme için gereken kanın tüm elemanlarını içeren ve tek bir fibrin yapıda toplayan matrikstir [133]. Fibrin ağ içindeki trombositler aktive haldedir ve polimerize fibrin ağını güçlü bir şekilde desteklemektedir [186, 216].

TZF hazırlama protokolü sonunda, esnek bir fibrin ağ meydana gelmektedir. Fibrin ağ doku rejenerasyonu için trombositler ve lökositlerle birlikte, büyüme faktörleri

ile sitokinleri barındıran bir matriks olarak görev yapmaktadır. Esnek fibrin ağı, içinde intrinsek yerleşimli büyüme faktörleri ve sitokinlerin, yara bölgesinde uzun süre kontrollü salınımını gerçekleştirmektedir [144]. Pıhtılaşma mekanizmaları ve fibrin ağın meydana gelme aşamaları, diğer trombosit kaynaklı ürünlere göre tamamen farklıdır [157]. TZF'nin pıhtılaşma ve fibrin polimerizasyonunda trombosit aktivasyonu sonucu açığa çıkan trombin önemli bir role sahiptir ancak, dışarıdan ilave edilmediği için TZF yavaş ve fizyolojik bir süreç ile polimerize olmaktadır. Bu polimerizasyon, üç boyutlu fibrin ağının stabilizasyonu için önemlidir [157].

Anjiyogenezis üzerine etkileri

Endotel hücrelerinin çoğalması, bölünmesi ve epitelyal hücrelerdeki fenotipik değişiklikler için ihtiyaç duyduğu matriksi sağlayarak anjiyogeneze rehberlik etmektedir [144]. Fibrin matriksin bu özelliği, esnek yapısı içinde barındırdığı VEGF, PDGF, FGF gibi büyüme faktörleri ve anjiopontin ile yönlendirilmektedir. Fibrin endotel hücrelerinin vitronektin ve fibronektine bağlanmasına aracılık eden $\alpha v\beta 3$ integrini uyarmaktadır. Bu durum anjiyogensizde önemli bir olaydır [167, 187].

İmmün sistem üzerine etkisi

Fibrin ağı içinde, büyük bir kısmını lenfositlerden oluşan lökositler bu matriks içinde hala canlı ve hareket etmeye hazır halde bulunmaktadır [186, 216]. TZF içindeki lökositlerin anahtar rolünün, immün yanıtı düzenleyici [180] ve iyileşme bölgesinde anti-infektif (önleyici etkinlik) [201] ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Yara iyileşmesi üzerine etkisi

Fibrin yara bölgesinde fibroblast ve epitel hücrelerinin metabolizmasını etkilemektedir. Büyüme faktörleri özellikle PDGF ve TGF- β , fibrin ve fibronektin fibroblastların çoğalmasını uyarmaktadır. TZF içerdiği yüksek oranda TGF- β ve PDGF salınımını anjiogenezin pik yaptığı, kemik yapımının başladığı 7-28 gün boyunca devam ettirmektedir. İyileşmenin ilerleyen safhalarında en önemli kritik aşama olarak düşünülen pıhtı stabilizasyonu, makrofaj aktivasyonu ile kemotaksisini sağlaması yara iyileşmesindeki önemini göstermektedir. Fibrin, kolajen sentezi ve biyomekanik yara direncinin sağlanmasında önemlidir [178, 180]. İyileşmenin erken döneminde yara

bölgesini koruyarak ve yumuşak dokunun primer kapanmasına yardımcı olmaktadır [28].

Osteojenik etki

TZF'nin osteojenik etkisi geçici bir ekstraselüler matriks (fibronektin ve trombospondin) gibi davranıp anjiyogenezi desteklemesiyle de açıklanabilmektedir. İçeriğinde yer alan PDGF, TGF- β , IGF ve FGF büyüme faktörleri osteoblastik aktiviteyi artırıcı etkiye sahiptir. Alkalen fosfataz ve OPG üretimini ve dolayısıyla osteoblast dönüşümünü arttırarak kemik yapım metabolizmasını desteklemektedir. Osteoklastlar üzerinde baskılayıcı etkisi bulunmaktadır [27, 133, 147, 216]. L-TZF'nin in-vitro ortamda fibroblast, keratinosit, kemik mezenşimal hücreleri, osteoblastlar gibi birçok hücrenin proliferasyonunda ve kemik formasyonunda rol oynadığı bildirilmektedir [27, 133, 147, 216].

Mezenşimal kök hücrelerin transplantasyonu üzerine etkisi

Mezenşimal kök hücreler yumuşak ve sert dokuların rejenerasyonuna katkıda bulunmaktadır. Bu hücreler kan aracılığıyla hasarlı dokuya ilerleyerek farklılaşmaktadır. Farklılaşma için fibrin ve fibronektinden oluşan fibrin matriks varlığı gereklidir. Bu santrifüj yöntemiyle elde edilen fibrinin yapısı, kök hücreler için kemotaktiktir ve yara bölgesine kök hücrelerin taşınmasına aracılık etmektedir [170].

2.6.5. TZF'nin Avantajları ve Dezavantajları

TZF düşük maliyetlidir ve hazırlama protokolünün sadeliği nedeniyle başarısızlığa uğrama ihtimali düşüktür [157]. Hastanın kendi kanından elde edildiği ve dışarıdan herhangi bir ürün ilave edilmediği için çapraz enfeksiyon veya alerjik reaksiyon riski söz konusu değildir [144].

Sınırlı miktarda elde edilebilmektedir ve uzun süre bekletilmesi yapısal özelliklerini bozulmasına neden olabilmektedir [144]. Santrifüj özellikleri ve protokolleri TZF'nin içindeki hücreleri, büyüme faktörlerini ve fibrin ağının mimarisinde önemli yere sahiptir. Bu nedenle bu aşamalar sırasında meydana gelebilecek bir hata TZF'nin özelliklerini olumsuz etkilemektedir [179].

2.6.6. TZF'nin Kullanım Alanları

TZF' nin son yıllarda tıp ve diş hekimliği uygulamalarında kullanımını artmaktadır. Diş hekimliğinde kullanım alanları yumuşak ve sert doku iyileşmesine sağladığı katkılardan dolayı dikkat çekmektedir [163, 177].

Klinik olarak çekim soketlerinde, kist enükleasyonu sonucu oluşan kavitelere, periodontal plastik cerrahilerde ve sinüs yükseltme işlemlerinde kullanılmaktadır [144, 178, 217]. Ayrıca yönlendirilmiş doku ve kemik rejenerasyonu işlemlerinde, greft materyali olarak veya greftlerle karıştırılarak, sinüs perforasyonlarını kapatmakta, periodontal kemik içi ve furkasyon defektlerin tedavisinde tercih edilmektedir [163, 177, 218].

Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, DDLT'nin hücre ve dokular üzerinde biyostimülatif etkisi göz önüne alınarak trombosit kaynaklı ürünlerin DDLT uygulamasıyla rejeneratif etkinliğindeki değişimin değerlendirilmesi araştırılmaktadır [33, 141].

2.7. Lazer ve Düşük Doz Lazer Tedavisi

Kısaca 'yoğunlaştırılmış doğrusal ışık' olarak tanımlanmaktadır. "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation' kelimelerinin baş harflerinden (LASER) oluşan lazerin temeli 1960' lı yıllara dayanmaktadır [219, 220].

Lazer ışığı normal ışıktan, tek renkten (monochromatic) oluşması ve yayılarak değil doğrusal (collimated) olarak ilerlemesiyle ayrılmaktadır [221].

Lazer tıp alanında tedavi amacı ilk kez 1962 yılında oftalmoloji ve dermatoloji alanında kullanılmıştır [222]. Diş hekimliğinde lazer kullanımıyla ilgili ilk araştırmalar Sognaes ve Stern'in yakut (ruby) lazerin mine ve dentin gibi sert diş dokuları üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarla başlamıştır [223]. Yakut lazerle yapılan başlayan araştırmalarından sonra Argon, Karbon Dioksit (CO₂), Erbium: Yttrium Aliminyum Garnet (Er: YAG) ve Neodmiyum-YAG (Nd: YAG) gibi farklı lazer sistemleri diş hekimliğinde kullanılmaya başlamıştır [224]. 1989'da yumuşak doku cerrahisinde Nd: YAG lazerin kullanılmasıyla, lazer periodontolojide kullanılmaya başlamıştır [225].

Mester ve ark. 1967'de Düşük doz lazer tedavisi prensibini tanımlamıştır. DDLT uygulandığı bölgede yara iyileşme sürecini hızlandırıcı terapötik bir tedavi yöntemi olarak sunulmuştur [226-228].

2.7.1. Lazerlerin Enerji Düzeylerine Göre Sınıflandırılması

a. Düşük Enerjili (Soft) Lazerler

Bu lazerler hedef dokudaki hücrel aktiviteyi uyuracak dalga boyunda, düşük güce sahiptirler. Genellikle terapötik amaçla kullanılmaktadırlar. Cerrahi lazerlerden ayırt etmek için '*soğuk lazer*', '*yumuşak (soft) lazer*' veya '*düşük enerjili lazer*' olarak adlandırılmaktadır. Termal etkileri bulunmamaktadır ve uygulandıkları dokuda yaklaşık 1°C civarında ısı artışına neden olmaktadır. Genellikle Diyot lazerler kullanılmaktadır.

b. Yüksek Enerjili (Hard) Lazerler:

Genellikle cerrahi amaçla kullanılırlar ve termal etkileri bulunmaktadır. Diş hekimliğinde bu amaçla en çok Argon, CO₂, Er: YAG ve Nd: YAG lazerler kullanılmaktadır [229].

2.7.2. Lazerin Dokudaki Biyolojik Etki Mekanizmaları

Lazer ışığı uygulandığı dokunun optik özelliklerine, ışığın dalga boyuna, uygulanma süresine ve enerji miktarına bağlı olarak canlı dokuda farklı mekanizmalar ile etki göstermektedir [230]. Bu etkiler;

a. Foto-termal etki

Lazer enerjisi uygulandığı doku tarafından absorbe edilerek dokuda etki göstermektedir. Bu etkiyle dokuda insizyon ve koagülasyon sağlanabilmektedir [231].

b. Foto-mekanik etki

Yüksek enerjiye sahip lazer ışığının, yüksek frekanstaki uygulamalarında hedef dokunun atomik ve moleküler bağlarını kırmasıyla sonuçlanan etkisidir. Fotoablasyon olarak da adlandırılan bu etkiyle diş sert dokularında ve kemikte işlemler gerçekleştirilebilmektedir [231].

c. Foto-kimyasal etki

Lazer ışığının uygulandığı dokuda herhangi bir termal etki oluşturmadan, emilimi ile atom ve moleküllerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmesiyle sonuçlanmaktadır. Dokularda meydana gelen ısı değişimi 1°C'den daha düşüktür. Dokuda herhangi bir ısı değişikliğine neden olmamalarıyla foto-termal etkiden ayrılmaktadır. Hedef dokuda foto-termal etki oluşturmadan, hücre fonksiyonlarının uyarılması ve dokuda biyolojik etkilerin oluşmasını sağlayan bu lazerlere yumuşak lazer veya düşük doz lazer adı verilmektedir [231].

2.7.3. Düşük Doz Lazer Tedavi (DDL T)

Düşük doz lazerler (DDL) biyolojik olayları, termal olmayan yollarla uyarıcı özel bir lazer türüdür [232]. DDL gibi terapötik lazerler, fotokimyasal etki teorisi ile dokuda atom ve molekül seviyesinde kimyasal değişikliklere neden olmaktadır [139]. Dokuda derin penetrasyon göstererek güçlü biyostimülatif etki yaratmaktadır. Temel etki prensipleri biyostimülasyon veya fotobiyostimülasyon olarak adlandırılan sisteme dayanmaktadır [31]. Bu teoriye göre dokulardaki fotoreseptörler lazer ışığını absorbe etmektedir. Işığı absorbe eden fotoreseptörler, hücrede mitokondriyal aktiviteyi artırarak ATP (adenozin-tri-fosfat) üretimini ve hücre zarının geçirgenliğini arttırmaktadır [31]. Hücrede oksijen, aminoasit, glikoz miktarı artar, hücre zarının aktif transport yapan enzim miktarı artar nükleik asit formasyonunda artış görülür ve sonuç olarak hücre metabolizması hızlanmaktadır. Hücre zarının geçirgenliğini artmasıyla görülen vazodilatasyon sonucu dokuda lokal kan akımı artar, normal hücre fonksiyonlarının stimülasyonu ve hücre mitozu uyarılmaktadır [31]. Sonuç olarak dokunun rejenerasyon kapasitesi artmaktadır [32, 139].

DDL T ile fotobiyostimülasyon doku rejenerasyonunu uyarmak, iltihabi durumu baskılamak ve ağrıyı hafifletmek için, lazer ışığının biyolojik bir sisteme uygulanmasıdır. Diğer tıbbi lazer türlerinden farklı olarak DDL ablasyon etkisi veya termal bir etkiye sahip değildir, aksine ışığın doku tarafından absorbe edildiği ve dokuda kimyasal değişikliklere neden olduğu fotokimyasal bir etkiye sahiptir [233]. Ablatif etkileri olmadığından dokuyu kesmez ve buharlaştırmazlar [31].

Düşük doz lazerlerin gücü, mW cinsinden ifade edilmektedir. Genellikle 1-1000 mw arasında değişen güçlere sahiptirler [234]. Günümüzde klinik uygulamalarda

fotobiyostimülasyon amacıyla, sıklıkla 660-810 nm dalga boyuna arasında diyot lazerler kullanılmaktadır [235].

2.7.4. Fotobiyostimülasyonun Hücre ve Doku Seviyesinde Etkileri

Fotobiyostimülasyon tedavisi (FBT) hücre ve doku onarımı ile rejenerasyonunu arttırmak için belirli aralığa sahip dalga boyunda lazer ışığının kullanılmasına dayanmaktadır [31]. Farklı hücre ve doku modellerinde araştırılmış olmasına rağmen FBT' nin biyokimyasal etki mekanizması henüz tam olarak anlaşılammıştır [236]. Çeşitli hayvan modelleri ve doku kültürleri üzerine yapılan laboratuvar çalışmaları 630-660 nm dalga boyunun biyostimülatif etkilerinin olası mekanizmalarını ve klinik yararlarını açıklamaktadır [237].

Hücresele seviyede düşük doz lazerin biyostimülasyon etkisi fibroblast çoğalması [238-240], neovaskülarizasyon [241], kolajen sentezi [239], mitokondriyal elektron taşıma sistemi [242], ekstraselüler matriks sentezi [243] üzerinde gösterilmiştir.

Büyüme faktörleri fibroblast farklılaşması ve çoğalmasında, yeni kılcal damarların oluşumunda, kolajen ve ekstraselüler matriks sentezinde kritik rol oynamaktadır [244, 245]. Periodontal fibroblastlar üzerine fotobiyostimülasyonun etkisini değerlendiren çalışmalarda, FBT' nin fibroblast çoğalmasını ve fibroblastlardan salınan büyüme faktörü (FGF, IGF-I ve IGF-I reseptörü) miktarını arttırdığı gösterilmiştir [142, 246]. Büyüme faktörlerinin üretimini arttırdığından dolayı, periodontal yara iyileşmesinde ve rejenerasyonda önemli rol oynamaktadır [142].

Büyüme faktörlerinin yara iyileşmesindeki öneminden yola çıkarak, fotobiyostimülasyonun lökositler ve trombositler üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Bu çalışmalarda, insan lökositlerinin hem kemotaktik hem de fagositik aktivitesini arttırdığı [247] ve trombosit degranülasyonu ile spesifik granüllerinde depolanan büyüme faktörlerinin salınımını uyardığı in-vitro olarak gösterilmiştir [248, 249].

Kronik periodontal inflamasyon sonucunda dokuda periodontal ligament ve alveol kemik kaybı gözlenmektedir [250]. Periodontal rejenerasyonu arttırmak için DDLT' nin biyostimülasyon etkisinin kullanımı, yara iyileşmesi [236] ve kemik rejenerasyonunu [251, 252] uyardığını gösteren çalışmalara dayanmaktadır.

Yapılan araştırmalar lazerin yumuşak dokuda artmış iyileşme sağladığı sinir rejenerasyonunu arttırdığı, büyüme faktörlerinin artmasıyla yeni kapiller oluşumunu

arttırdığı, hücre çekirdeğinde DNA ve RNA sentezini arttırdığı, fibroblastların miyofibroblastlara dönüştüğü ve kemik örtü hücrelerinin stimülasyonunu arttırdığını ortaya koymuştur [253].

İn-vivo çalışmalarda, detertraj ve subgingival küretaj işlemlerinden sonra DDLT uygulanmasının gingival inflamasyonu ve kolajen yıkımına yol açan matriks metalloproteinaz-8 (MMP8) enzimin azalttığı gösterilmiştir [254, 255]. İn-vitro çalışmalarda DDLT'nin periodontal ligament fibroblastlarının proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir [140, 142]. DDLT'nin periodontal dokularda en önemli büyüme faktörleri olan TGF- β ve PDGF' nin üretimini arttırdığı ve inflamatuvar sitokin olan IL-1 β üretimini azalttığı bildirilmiştir [143].

Son yıllarda kemiğe DDL ile biyostimulasyon uygulaması, kemik defektlerinde diğer rejeneratif metodlarla birlikte iyileşmeyi uyarmak amacıyla kullanılmaktadır [252, 256]. İn-vitro çalışmalarda, düşük enerjili lazerlerin, osteoblastların proliferasyonunu arttırdığı bildirilmiştir [257, 258]. Bazı yazarlar deneysel ve klinik çalışmalarında DDL uygulamasının kemik rejenerasyonuna pozitif etkisinden bahsetmişlerdir. Ancak, DDL'nin kemik üzerindeki etki mekanizması tam olarak açığa kavuşmamıştır [259]. Wlash ve ark. DDLT'nin diş çekiminden sonra alveol soketin tamirde önemli rol aldığı, osteoblast hücrelerinin, çoğalma, farklılaşma ve kalsifikasyon sürecini etkilediğini bildirmiştir [260].

DDLTL ile ilgili birçok in-vitro ve in-vivo çalışma yapılmış olmasına rağmen, henüz etkinliği kesin olarak kanıtlanmış DDLT parametreleri yoktur. Literatürde DDLT' nin membran haline getirilmiş L-TZF üzerine olan biyostimülatif etkilerini değerlendiren çalışmalara rastlanılmamıştır.

Bu çalışmanın amacı kritik boyuttaki kemik defektlerinin iyileşmesinde, TZF ile düşük doz lazer uygulanmış TZF'nin kollajen membran ve boş bırakılan defektlerle karşılaştırılarak bariyer membran olarak etkinliğinin değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan alınan 04/07/2018 tarih ve 3/04072018/6 sayılı onay ile Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi. Yapılan tüm işlemlerde deneklerle ilgili Yerel Etik Kurul Yönergesinde belirtilen şartların sağlanmasına özen gösterildi.

3.1. Deney Hayvanları

Bu çalışmada 5 adet, ortalama 40 kg ağırlığında, 18-24 aylık merinos tipi erişkin erkek koyun kullanıldı. Çalışmamızda kullanılan deney hayvanlarının cerrahi işlemleri, işlem sonrası bakımları ve sakrifikasyonları Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Merkezi'nde yapıldı.

3.2. Gruplar

Her bir deney hayvanının tek taraflı sağ iliak krestine, bir grup için 2 adet defekt oluşturacak şekilde toplam 8 adet kritik boyutta defekt (8 mm derinliğinde x 8mm çapında) oluşturuldu. Defektler arasında en az 5 mm mesafe bırakıldı. Defektler gruplar yan yana olacak şekilde sınıflandırıldı. Kemik yapısına bağlı heterojenitenin elimine edilmesi amacıyla, gruplar her hayvanda saat yönünde iki defekt ilerleyecek şekilde kaydırıldı.

Oluşturulan defektlerde standart olarak, sığır kaynaklı kemik minerali (DSKM) greft materyali olarak uygulandı (Şekil 11b).

1. Kontrol Grubu: Defekt bölgesi greftlendikten sonra üstü herhangi bir membran örtülmeden kapatıldı.
2. Kolajen Grubu: Defekt bölgesi greftlendikten sonra üstü doğal kolajen membran örtülerek kapatıldı.
3. Trombositten zengin fibrin (TZF) Grubu: Defekt bölgesi greftlendikten sonra üstü çift kat TZF membran örtülerek kapatıldı.
4. Düşük doz lazer uygulanmış TZF (DDL-TZF) Grubu: Defekt bölgesi greftlendikten sonra üstü DDL uygulanmış çift kat TZF membran örtülerek

kapatıldı. TZF'ye öncelikle steril bir kapta DDL uygulandı daha sonra membran haline getirildi.

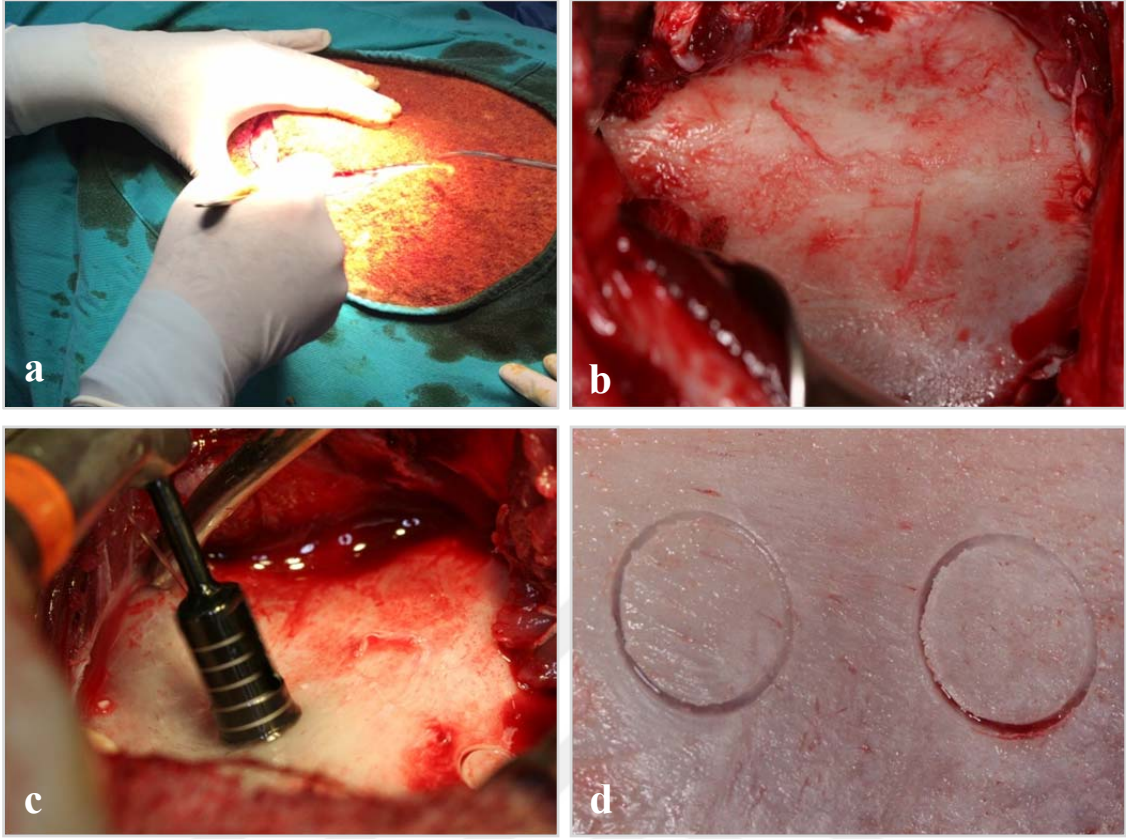
3.3. Kritik Boyutta Kemik Defekti

Kritik boyutta defekti (KBD), bir hayvan türünde ve o türün ilgili kemiğinde herhangi bir osteojenik materyal kullanılmadan, ömrünün sonuna kadar spontan iyileşme göstermeyen en küçük intraosseöz yara olarak tanımlanır. Bu tip defektler kemik dokusundan çok fibröz bağ doku ile iyileşme eğilimindedir [261, 262].

3.4. Cerrahi Girişim

Deneklere enfeksiyon ve ağrı önlemek amacıyla profilaktik perioperatif sefazolin sodyum 1 gr (Sefazol®, Mustafa Nevzat, İstanbul, Türkiye) ve diklofenak sodyum 75 mg (Voltaren®, Novartis) I.M. (intra muskuler) yoldan verildi. Cerrahi işlemler genel anestezi altında gerçekleştirildi. Öncelikle denekler sırasıyla I.M. yoldan uygulanan 20 mg/ kg ketamin HCl (Alfamine®, Egevet, İzmir, Türkiye), 2 mg/ kg ksilazin HCl (Alfazyme®, Egevet, İzmir, Türkiye) ve 0,5 mg atropin sülfat ile premedike edildi. Sedasyondan sonra genel anestezi için 15 mg/ kg tiyopental sodyum (Pental Sodyum®, İbrahim Etem, İstanbul, Türkiye) intravenöz (I.V.) yoldan verildi ve kontrollü infüzyon ile idamesi sağlandı. Cerrahi bölgeye 4 cc bupivakain HCl lokal anestezi (Marcaine®, AstraZeneca) enjeksiyonu yapıldı. Genel anesteziyi takiben sağ iliak krest operasyon sahası tıraşlandı ve % 10' luk povidon-iyodin (Biokadin®, Biokan, İstanbul, Türkiye) solüsyonu merkezden perifere doğru silindi.

Cerrahi işlemler asepsi kurallarına bağlı kalınarak gerçekleştirildi. Sağ iliak krestin lateralinde insizyon yapıldı (şekil 8a), tam kalınlık diseksiyon ile iliak krestin lateral duvarına ulaşım sağlandı (şekil 8b). İliak krestin lateral duvarında her bir grup için 2 adet olmak üzere toplam 8 adet standart boyutlarda yapay kritik kemik defekti oluşturuldu. Defektler serum irrigasyonu altında 8mm derinliğinde x 8mm çapında trefan frez ile oluşturuldu (Şekil 8c, d) . Defekt sınırları arasında en az 5 mm mesafe bırakıldı (Şekil 12b).



Şekil 8. İliak kreste ulaşım ve bölgenin işaretlenmesi. a) Bölgenin traşlandıktan sonra insizyonu. b) Flep elevasyonundan sonra iliak krestin görünümü. c) Trefan frez ile defekt oluşturulması. d) Defekt alanın işaretlenmesi.

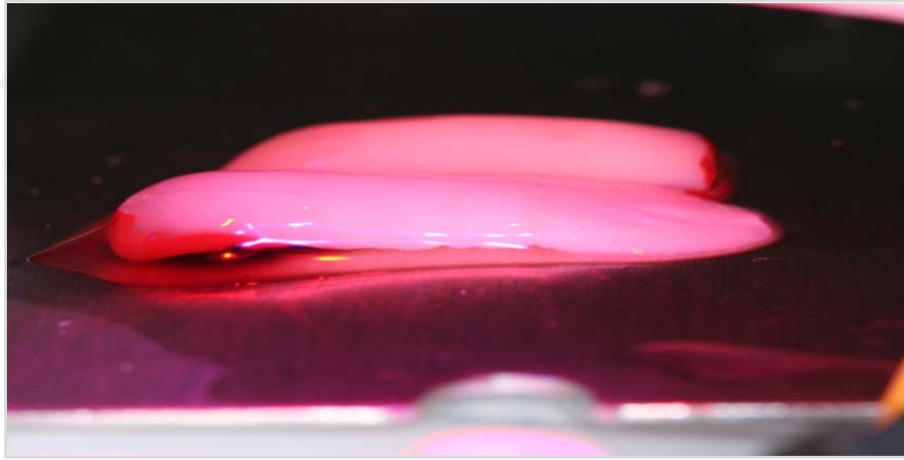
L-TZF elde etmek amacıyla her bir koyundan, 4 tüp 10 cc venöz kan alındı. Antikoagülan içermeyen boş tüpler kullanıldı. Tüpler dengenin sağlanabilmesi için santrifüj cihazında (EBA-20, Hettich, Germany) karşılıklı olarak yerleştirildi. Alınan kan 2700 rpm’de 12 dk santrifüj edildi. Santrifüjden sonra tüpte 3 tabaka; en üstte trombositten fakir plazma (TFP), ortada TZF en altta ise kırmızı kan hücrelerinden zengin tabaka meydana geldi.

L-TZF steril bir penset yardımıyla tüpten çıkarıldı ve kırmızı kan hücre tabakası uzaklaştırıldı (Şekil 9). Her bir grupta 2 adet TZF’ye steril bir metal kaptaki DDLT protokolü uygulandı. Bu çalışmada biyostimülasyon amacıyla 810 nm dalga boyunda, 129 mW gücünde ve 3,87 j/cm² enerji yoğunluğunda galyum-aliminyum-arsenid (GaAlAs) diode lazer (AMD, Picasso, USA) kullanıldı [263]. Lazer non-kontakt modda 5 dakika uygulandı (Şekil10) [263].

Daha sonra DDL uygulanmış ve uygulanmamış TZF'ler membran haline getirmek amacıyla bu işlem için özel olarak hazırlanmış TZF-kutu içine yerleştirildi. L-TZF, kutunun ızgaralarına yerleştirildikten sonra üzeri kapatılıp membran haline getirilmesi sağlandı.



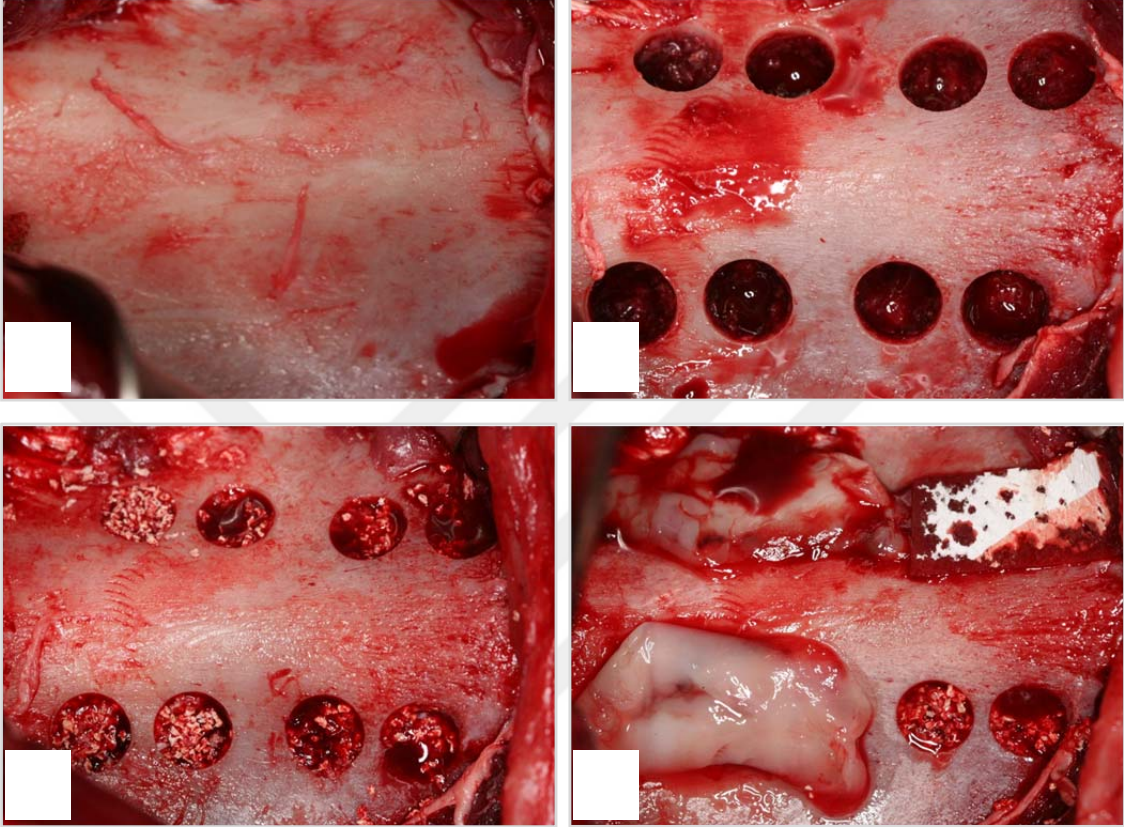
Şekil 9. TZF'nin tüpten çıkarılıp TZF-kutu içine yerleştirilmesi



Şekil 10. Diyot lazer ile TZF'ye DDLT uygulaması

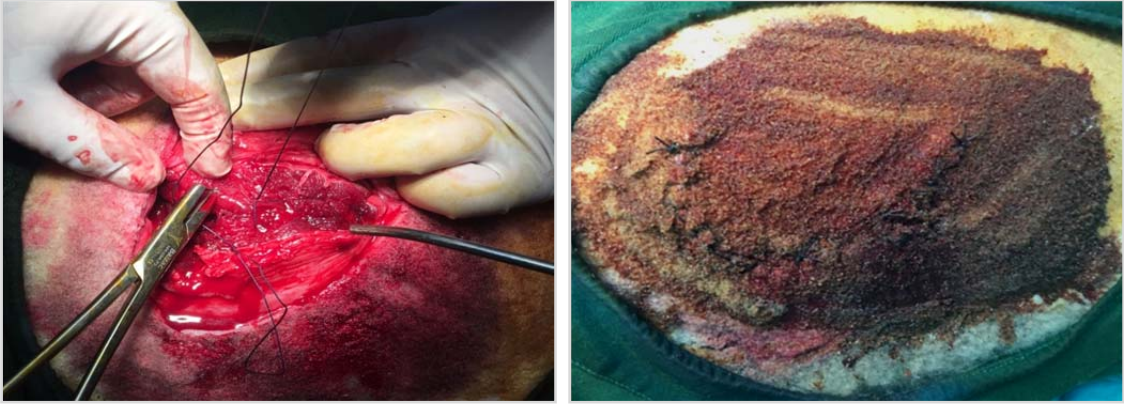
Defektler sığır kaynaklı ksenogreft (Botiss, Cerabone®, Switzerland) ile dolduruldu (Şekil 11c). DSKM ile doldurulan defektler, daha önce belirtilen gruplamalara uygun olacak şekilde; Kontrol: herhangi bir bariyer membran kullanılmadan, Kolajen Grubu: defektin üzeri kolajen membranla (Botiss, Collprotect®, Switzerland) örtülerek, TZF Grubu: defektin üzeri TZF membranla örtülerek, DDL-TZF Grubu: defektin üzeri DDL uygulanmış TZF membranla örtülerek kapatıldı (Şekil 11d).

Kullanılan greft materyali cerabone® (Botiss, Switzerland) sığır kemiği kaynaklıdır (DSKM) ve partikül büyüklüğü 0.5-1 mm arasındadır. Collprotect® kolajen membran ise 15 mm x 20 mm boyutlarındadır.



Şekil 11. Defekt oluşturulması, greftlenmesi ve gruplara uygun biçimde membran yerleştirilmesi. a) İliak krestin görünümü. b) İliak krestte oluşturulan 8 adet KBD' nin görünümü. c) Defektlerin deproteinize sığır kaynaklı kemik mineraliyle greftlenmesi. d) DSKM ile greftlenen defektlere gruplandırmaya uygun şekilde bariyer membran yerleştirilmesi.

Greft ve membranların yerleştirilmesinden sonra kemik yüzeyinden diseke edilen kaslar 4/0 rezorbe olabilen poliglikolikasit suture (Doğsan®, Trabzon, Türkiye), cilt ise 3/0 ipek (Doğsan®, Trabzon, Türkiye) suture kullanılarak primer olarak kapatıldı (Şekil 12-13).



Şekil 12. Cilt altı kas dokusunun suture edilmesi. Şekil 13. Cilt dokusunun primer kapatılması.

3.5. Postoperatif Bakım

Ameliyat sonrası enfeksiyon ve ağrı kontrolü için tüm deneklere 5 gün süreyle günde 2 defa sefazolin sodyum 1 gr (Sefazol®, Mustafa Nevzat, İstanbul, Türkiye) ve diklofenak sodyum 75 mg (Voltaren®, Novartis, İsviçre) I.M. yoldan verildi. Denekler 12 hafta boyunca etik kurallara bağlı olarak 21-22 °C oda sıcaklığında ve % 40-50 nem ortamına sahip ayrı barınaklara yerleştirildi. Gün içinde yapılan kontrollerde hayvanların barınak temizliği, yem/su alım miktarları ve genel güçsüzlük durumları takip edildi. 12 hafta sonunda sorunsuz iyileşme tamamlandı.

3.6. Denek Hayvanlarından Kemik Örneklerinin Elde Edilmesi

Hayvanlar operasyondan sonraki 12. haftada yüksek doz I.V. tiyopental-sodyum ile (Pental Sodyum®, İbrahim Etem, İstanbul, Türkiye) sakrifiye edildi. Her bir hayvanın işlem gören sağ iliak kemik bölgesi kesilerek çıkarıldı ve histolojik kesit elde etmek amacıyla % 10'luk formalin (Merck®, Darmstadt, Almanya) içerisinde uygun koşullarda muhafaza edildi.

3.7. Kesit Hazırlama Yöntemi

Doku parçaları % 10'luk tamponlu nötral formaline alınarak bir hafta süreyle tespit edildi. Bir haftanın sonunda akan suda 8 saat boyunca yıkandı. Daha sonra dokular dekalsifikasyon işlemi için % 25'lik formik asit içerisinde alındı. Dekalsifikasyon solüsyonu günlük olarak değiştirildi. Dekalsifikasyon işlemi sonunda, formik asitin giderilmesi amacıyla dokular 8 saat süreyle akarsuda yıkandı. Ardından dokular 0,35 M sodyum sülfat içerisinde alınarak 3 gün süreyle bekletildi. 3 günün

sonunda dokular akarsuda 8 saat boyunca yıkandı. Daha sonra dokulardaki suyu uzaklaştırmak amacıyla derecesi giderek artan etil alkol serilerinden geçirilerek dehidrate edildi. Dekalsifikasyon işleminin ardından dokulara Leica TP 1020 (Germany) Ototeknikon Cihazı ile çizelge 1'de belirtilen takip yöntemi uygulandı.

Çizelge 1. Histomorfometrik değerlendirme için doku takip işlemi

Oda sıcaklığında	%90'lik etil alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat
Oda sıcaklığında	Saf alkol	1 saat 30 dakika
Oda sıcaklığında	Saf alkol+ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat
Oda sıcaklığında	Ksilol	1 saat 30 dakika
60°C'de	Parafin	1 saat
60°C'de	Parafin	1 saat 30 dakika

Blok haline getirilen dokulardan mikrotomla (Thermo Scientific Shandon Finesse 325) 5 mikron kalınlığında kesitler alındı, deparafinize edildi, hematoksilen–eozin ile boyandı ve kapatıldı. Hazırlanan preparatlar ışık mikroskopunda (Olimpus BX53) incelendi ve 2X büyütmede fotoğrafları alındı.

3.8. Histomorfometrik Analiz

BIOQUANT OSTEO 2018 (Bioquant image analysis corporation, NASHVILLE, USA) yazılım programı kullanılarak ise histomorfometrik analiz yapıldı. Yapılan histomorfometrik ölçümlerle aşağıdaki parametreler incelenmiştir.

- 1) Toplam Doku Hacmi (TV) (mm^2): İlgili alandaki toplam doku hacminin mm^2 cinsinden ifadesidir.
- 2) Toplam Kemik Hacmi (BV) (mm^2): İlgili alandaki hem mineralize hem de doku içindeki osteoid alanı içeren, kemik dokunun alan cinsinden ifadesidir.

- 3) Kemik Hacmi/Doku Hacmi (BV/TV) (%): Kemik hacmi doku hacmine oranlanmıştır. Bu oranın yüksek olması kansellöz kemik miktarının yüksekliğini ifade etmektedir.
- 4) Toplam Kemik Yüzeyi (BS) (mm): Doku hacmi içindeki kemiğin toplam çevresini uzunluk birimi olarak ifade etmektedir.
- 5) Trabekül Çapı (Tb.Dm) mikrometre cinsinden incelenmiştir.
- 6) Trabekül Sayısı (Tb.N) : mikrometre cinsinden incelenmiştir.
- 7) Trabekül Arası Boşluklar (Tb.Sp.) mikrometre cinsinden incelenmiştir.

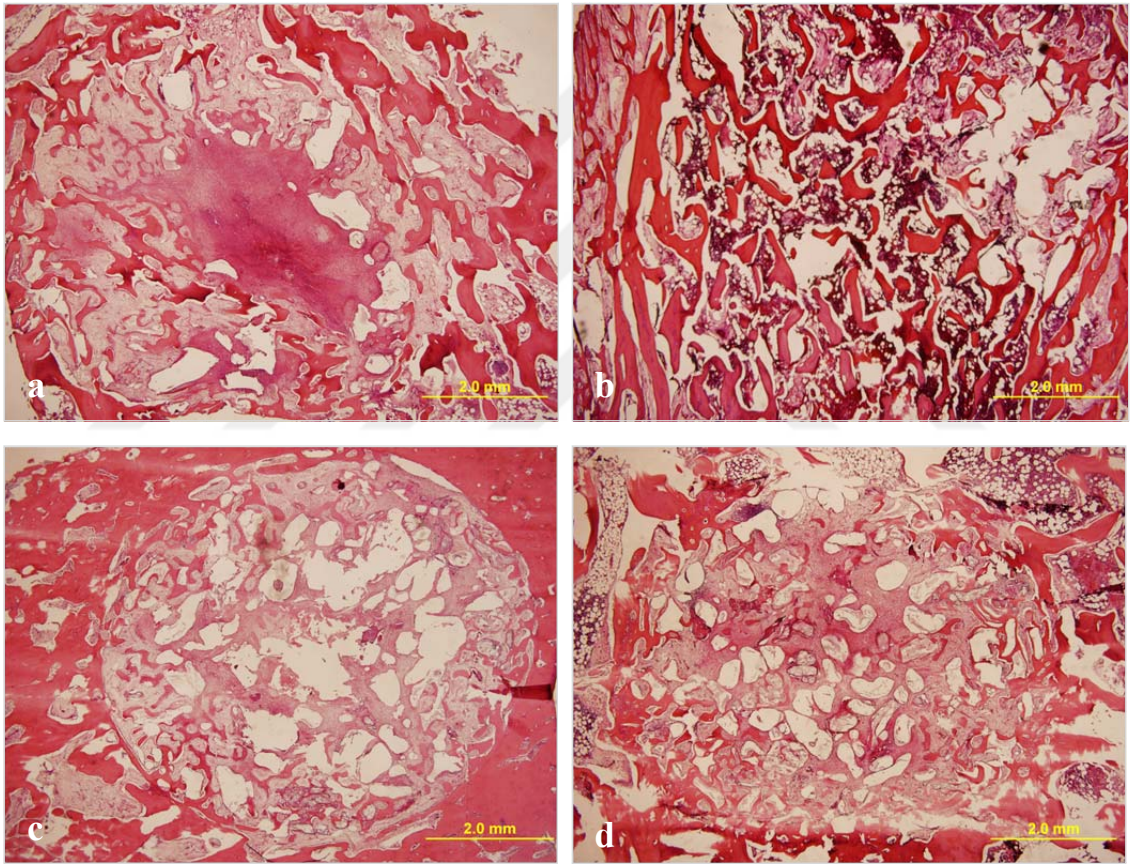
3.9. İstatiksel Analiz

Çalışma elde edilen veriler ortalama ve standart sapma olarak özetlendi. Gruplar arasında sayısal ölçümlerinin genel karşılaştırılmasında varsayımların sağlanıp sağlanmamasına göre Tek Yönlü Varyans Analizi veya Kruskal Wallis testi kullanıldı. Grupların ikili karşılaştırılmalarında varsayımların sağlanması halinde Tukey testi, sağlanmaması halinde ise Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney testi kullanıldı. Verilerin istatistiksel analizinde IBM SPSS Statistics Versiyon 20.0 paket programı kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi (p) 0,05 olarak alındı. (SPSS referansı : IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp)

4. BULGULAR

Çalışmada kullanılan hayvanlar, operasyon sonrasında sorunsuz iyileşme dönemi geçirmişlerdir. 12 haftalık iyileşme dönemi sonrasında hayvanların sakrifikasyonu gerçekleştirildi.

Sakrifikasyon sonrasında cerrahi alandan alınan örnekler uygun laboratuvar işlemlerinden geçirildikten sonra histomorfometrik ölçümler yapılarak istatistiksel analiz yapıldı (Şekil 14 a, b, c, d)



Şekil 14. Gruplardan elde edilen kesitlerin ait 2X büyütme altındaki histolojik görüntüsü. a) Kontrol grubunun 2X büyütme ile görüntüsü. b) Kolajen grubunun 2X büyütme ile görüntüsü. c) TZF grubunun 2X büyütme ile görüntüsü d) DDL-TZF grubunun 2X büyütme ile görüntüsü.

Histomorfometrik analiz sonucunda kemik hacmi (BV), kemik hacmi/ doku hacmi(BV/TV), kemik yüzeyi (BS), kemik yüzeyi/ kemik hacmi (BS/BV), trabekül çapı (Tb.Dm), trabekül Sayısı (Tb.N) ve trabekül boşlukları (Tb.S) ortalama, standart sapma ve p değerleri hesaplandı (Çizelge 2).

Çizelge 2. Histomorfometrik analiz sonucu grupların BV, BV/TV, BS, Tb.Dm, Tb.N, Tb.S ortalama, standart sapma değerleri.

	Kontrol grubu	Kolajen	TZF	DDL-TZF
BV(mm²)	9,07 (±1,71)	15,05 (±3,52)	9,91 (±2,74)	10,51 (±3,09)
BV/TV%	0,20 (±0,03)	0,33 (±0,08)	0,22 (±0,07)	0,23 (±0,07)
BS(mm)	184,42 (±37,87)	256,89 (±35,24)	226,98 (±35,53)	239,38 (±75,1)
Tb.Dm (Rod)	0,18 (±0,06)	0,24 (±0,04)	0,22 (±0,02)	0,18 (±0,02)
Tb.N(Rod)	3,15 (±1,01)	2,84 (±0,33)	2,47 (±0,21)	3,11 (±0,55)
Tb.S(Rod)	0,19 (±0,1)	0,13 (±0,03)	0,20 (±0,04)	0,16 (±0,04)

Histolojik analiz sonucunda yeni kemik oluşumu yüzdesi değerlendirildi (Çizelge 3).

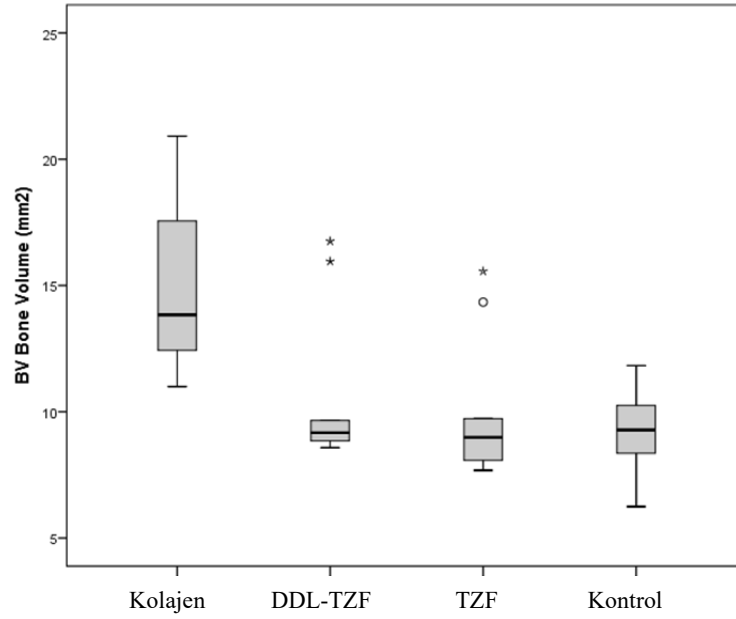
Çizelge 3. Gruplarda gözlenen yeni kemik formasyonu

Gruplar	Yeni Kemik Oluşumu
Kontrol grubu	%20,46
Kolajen	%33,68
TZF	%22,79
DDL-TZF	%23,68

Kolajen grubunun BV değeri diğer gruplara göre daha fazla bulunmuştur ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$) (Çizelge 4). DDL-TZF grubu; TZF ve kontrol grubuna göre; TZF grubunun kontrol grubuna göre BV değeri daha fazla iken bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p>0,05$) (Şekil 15).

Çizelge 4. Gruplar arasında BV parametresinin p değerleri *($p<0,05$)

	Grup	Grup	p
BV(mm2)	Kontrol	Kolajen	0,001*
BV(mm2)	Kontrol	DDL-TZF	0,676
BV(mm2)	Kontrol	TZF	0,912
BV(mm2)	Kolajen	DDL-TZF	0,006*
BV(mm2)	Kolajen	TZF	0,002*
BV(mm2)	TZF	DDL-TZF	0,966

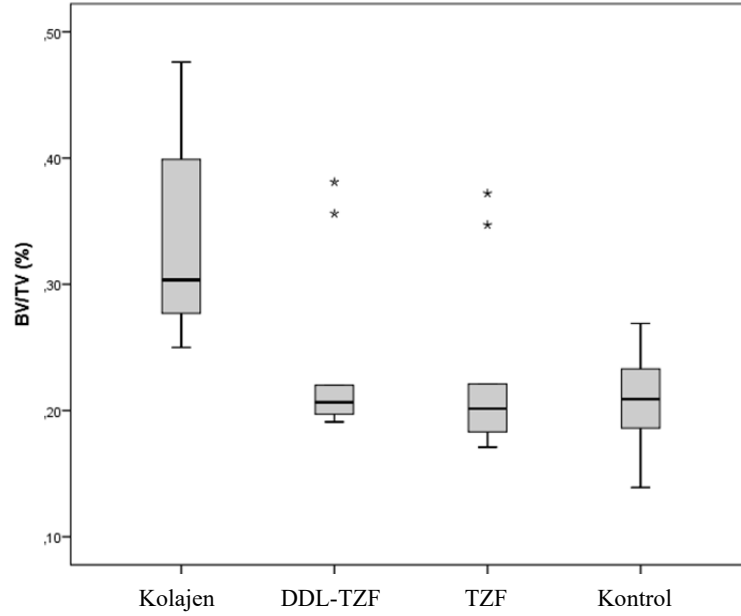


Şekil 15. Gruplar arasında BV değerinin karşılaştırılması

Yeni kemik oluşumunun ifadesi olan BV/TV değeri karşılaştırıldığında, kolajen grubunun BV/TV değeri diğer gruplara göre daha fazla bulundu ve bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) (Çizelge 5). DDL-TZF grubu, TZF ve kontrol grubuna göre; TZF grubu ise kontrol grubuna göre BV/TV değeri daha fazla iken bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0,05$) (Şekil 16).

Çizelge 5. Gruplar arasında BV/TV' nin p değerleri, *($p < 0,05$)

	Grup	Grup	P
BV/TV%	Kontrol	Kolajen	0,001*
BV/TV%	Kontrol	DDL-TZF	0,710
BV/TV%	Kontrol	TZF	0,866
BV/TV%	Kolajen	DDL-TZF	0,011*
BV/TV%	Kolajen	TZF	0,005*
BV/TV%	TZF	DDL-TZF	0,991

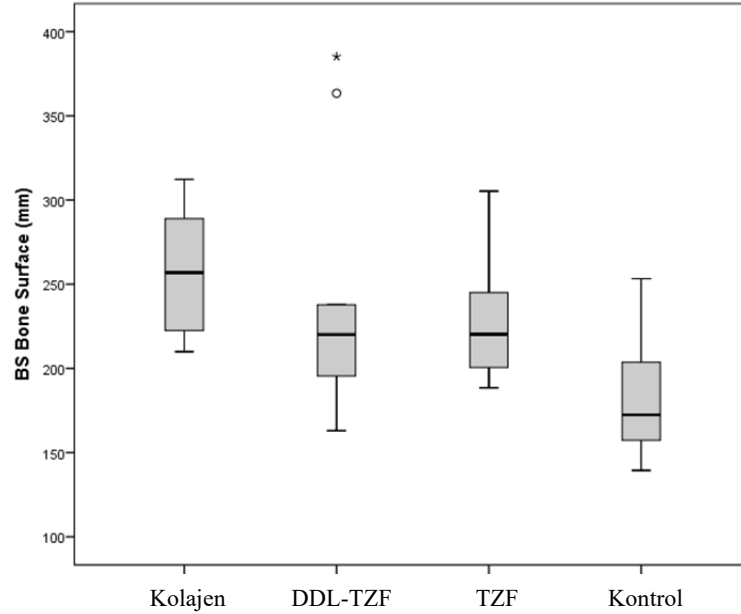


Şekil 16. Gruplar arasında BV/TV değerinin karşılaştırılması

BS değerleri karşılaştırıldığında kolajen grubu en yüksek değerde bulundu. Bu fark kontrol grubuna göre anlamlı iken ($p < 0,05$), TZF ve DDL-TZF gruplarına göre anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Çizelge 7). DDL-TZF grubu, kontrol ve TZF gruplarına göre; TZF grubu ise kontrol grubuna göre daha yüksek bulundu ancak bu farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 17).

Çizelge 6. Gruplar arasında BS' nin p değerleri, *($p < 0,05$)

	Grup	Grup	P
BS(mm)	Kontrol	Kolajen	0,011*
BS(mm)	Kontrol	DDL-TZF	0,075
BS(mm)	Kontrol	TZF	0,228
BS(mm)	Kolajen	DDL-TZF	0,854
BS(mm)	Kolajen	TZF	0,528
BS(mm)	TZF	DDL-TZF	0,941

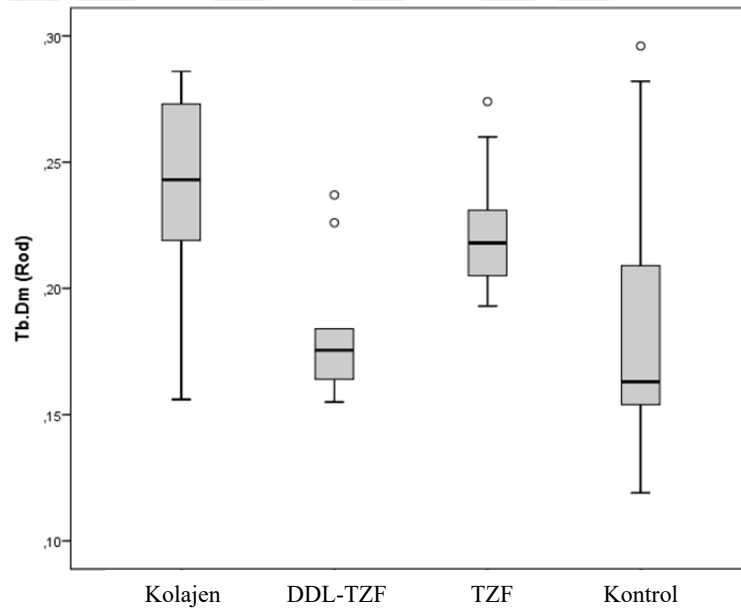


Şekil 17. Gruplar arasında BS değerinin karşılaştırılması

Tb.Dm değerleri arasındaki farklar incelendiğinde en yüksek değer kolajen grubundan elde edildi, kolajen grubunun kontrol ve DDL-TZF grubuna göre farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,05$) (Çizelge 7). TZF grubu ve diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 18).

Çizelge 7. Gruplar arasında Tb.Dm(Rod)' nin p değerleri, *($p < 0,05$)

	Grup	Grup	P
Tb.Dm(Rod)	Kontrol	Kolajen	0,019*
Tb.Dm(Rod)	Kontrol	DDL-TZF	1,000
Tb.Dm(Rod)	Kontrol	TZF	0,157
Tb.Dm(Rod)	Kolajen	DDL-TZF	0,019*
Tb.Dm(Rod)	Kolajen	TZF	0,782
Tb.Dm(Rod)	TZF	DDL-TZF	0,157

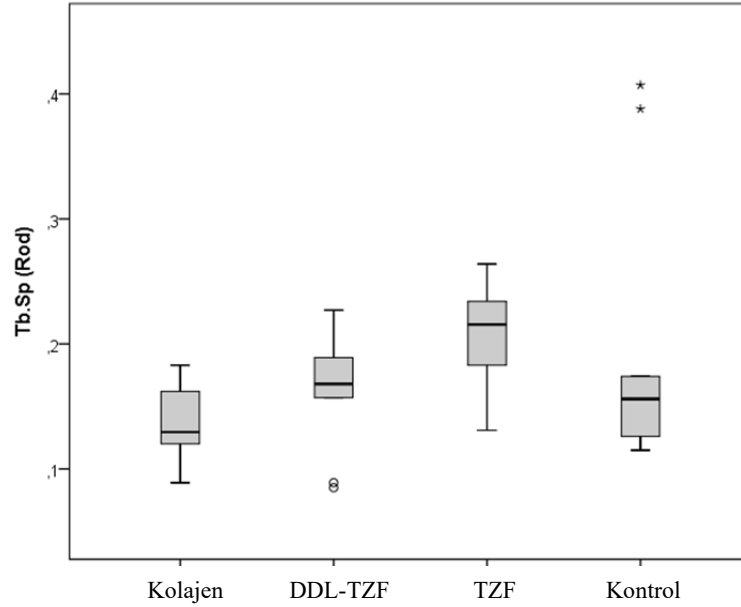


Şekil 18. Gruplar arasında Tb.Dm(Rod) değerlerinin karşılaştırılması

Gruplar arasındaki Tb.Sp değerleri karşılaştırıldığında kolajen ve TZF grubu arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı iken ($p < 0,05$) (Çizelge 8) diğer gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 19).

Çizelge 8. Gruplar arasında Tb.Sp. (Rod)' nin p değerleri, *($p < 0,05$)

	Grup	Grup	p
Tb.Sp. (Rod)	Kontrol	Kolajen	0,941
Tb.Sp. (Rod)	Kontrol	DDL-TZF	1,000
Tb.Sp. (Rod)	Kontrol	TZF	0,406
Tb.Sp. (Rod)	Kolajen	DDL-TZF	0,636
Tb.Sp. (Rod)	Kolajen	TZF	0,007*
Tb.Sp. (Rod)	TZF	DDL-TZF	0,624

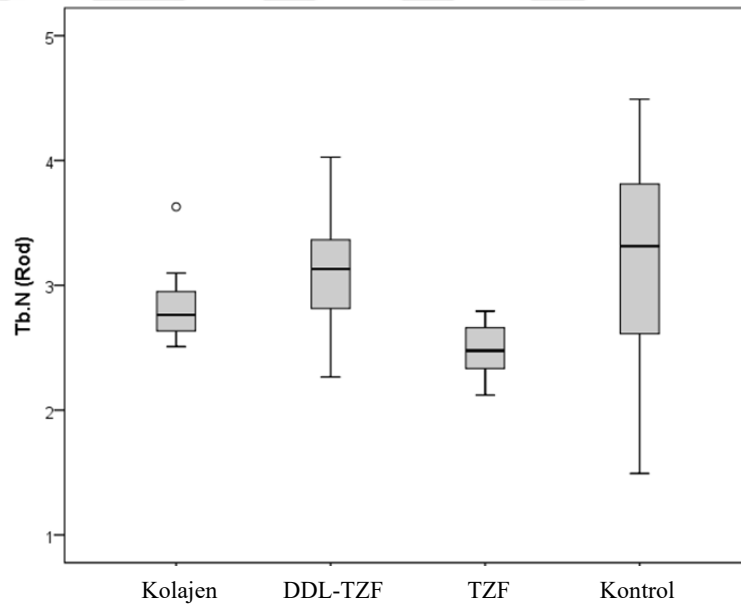


Şekil 19. Gruplar arasında Tb.Sp(Rod) değerlerinin karşılaştırılması.

Tb.N değerinde kontrol ve TZF ile TZF ve DDL-TZF grubundaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p < 0,05$) (Çizelge 9), diğer gruplar arasında anlamlı fark bulunmadı ($p > 0,05$) (Şekil 20).

Çizelge 9. Gruplar Tb.N (Rod)' nin p değerleri, *($p < 0,05$)

	Grup	Grup	p
Tb.N(Rod)	Kontrol	Kolajen	1,000
Tb.N(Rod)	Kontrol	DDL-TZF	1,000
Tb.N(Rod)	Kontrol	TZF	0,028*
Tb.N(Rod)	Kolajen	DDL-TZF	1,000
Tb.N(Rod)	Kolajen	TZF	0,452
Tb.N(Rod)	TZF	DDL-TZF	0,037*



Şekil 20. Gruplar arasında Tb.N(Rod) değerlerinin karşılaştırılması.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada deproteinize sığır kaynaklı greft materyali yerleştirilen, kritik boyutlu kemik defektlerinin iyileşmesinde, Trombositten Zengin Fibrinin (TZF) bariyer membran olarak etkinliğinin, kolajen membranla karşılaştırarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın sonucunda en başarılı iyileşmeyi sırasıyla kolajen membran, düşük doz lazer uygulanan TZF (DDL-TZF), TZF ve boş defekt grupları göstermiştir.

Hayvan çalışmaları; biyomateryalleri, kemik rejenerasyon tekniklerinin etkinliğini, osteojenik potansiyellerini, biyoyumluluklarını, mekanik özelliklerini, konak dokularla etkileşimini histolojik ve histomorfometrik açıdan değerlendirilmesi için gerçekleştirilmektedir [120]. Literatür incelemesi yapıldığında, kemik rejenerasyonunu incelemek amacıyla farklı hayvan modelleri kullanıldığı görülmektedir. Bu deney hayvanlarından sıçan ve farelerin, havers sistemine sahip olmamaları, boyutsal olarak küçük olmaları ve tespit güçlüğü gibi dezavantajları bulunmaktadır. Hayvan türleri filojenik açıdan üst sınıflara yükseldikçe (tavşan, domuz, köpek ve koyun türleri gibi) havers sistemi oluşmaktadır. Bu nedenle kıkırdak ve kemik dokunun değerlendirildiği hayvan çalışmalarında bu türler tercih edilmektedir [264]. Domuz ve köpek türleri genellikle intra-oral olarak planlanan deneysel çalışmalarda kullanılmaktadır [265]. Ancak bu türlerde cerrahi sonrası görülen oral hijyen yetersizliği, iyileşme sürecinde enfeksiyona zemin hazırlamaktadır [266].

Rejeneratif tekniklerin değerlendirilmesi için farklı lokasyonlar arayışına giren araştırmacılar, koyun iliak kemiğinin yapısının Lekhorm ve Zarb indeksinde açıklandığı gibi insan mandibulasına benzer olduğunu açıklamıştır [266]. Koyunun insanlara benzer kemik yapısına, fizyolojisine ve remodeling kapasitesine sahip olduğu için kemik rejenerasyonu çalışmalarına uygun bir hayvan türü olduğu düşünülmektedir [267]. Ravaglioli ve ark. insan ve koyun kemiği arasında mineral bileşimi açısından önemli bir farklılık olmadığını ve benzer metabolik aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir [120, 268], Anderson ve Newman koyun kemiğinin insan kemiğiyle yakın yenilenme ve yeniden şekillenme aktivitesi olduğunu [269, 270] bildirmiştir. Eitel ve ark. koyun kemiğinin insan kemiği ile karşılaştırılabilir kan akım desteği ve rejenerasyon potansiyeli olduğunu göstermiştir [271]. Pabloth yetişkin hayvanlar arasında, koyun

kemiğinin insan kemiğine en yakın fizyoloji ve anatomiye sahip olduğunu bildirmiştir [272]. Ayrıca kemik metabolizmasının düzenlenmesinde cinsiyet hormonlarından östrojenin önemli etkisi olduğu ve östrojen hormonu düzensizliklerinde kemik iyileşmesinin olumsuz etkilendiği bilinmektedir [273]. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda, deneysel olarak oluşturulan defektlerin rejenerasyonunda kullanılan bariyer membranların etkinliğinin değerlendirilmesinde deney hayvanı olarak yetişkin merinos tipi erkek koyun seçilmiştir.

Çeşitli hayvan türlerinde kritik boyutlu kemik defektlerinin boyutlarıyla ilgili çalışmalarda tavşan kalvaryasında 6 mm çapında [274, 275], rat kalvaryasında 8 mm çapında [276, 277], köpek mandibulasında 15 mm çapında [278] olması gerektiği açıklanmıştır. Koyunların iliak krestinde gerçekleştirilen çalışmalarda, kritik boyutlu defekti Scano ve ark. 4 mm derinliğinde 7 mm genişliğinde [120], Murata ve ark. 9 mm genişliğinde ve 10 mm derinliğinde [41] olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda koyun kemiğinin filogenetik yapı olarak insan kemiğine benzemesinden dolayı, insanda çekim soketi boyutlarına benzer büyüklükte, 8 mm çapında 8 mm derinliğinde dairesel kritik boyutlu kemik defektleri oluşturuldu.

Periodontal kemik defektlerinin iyileşmesinde, tedavinin ve biyomateryallerin etkinliğini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen çalışmalarda iki tip defekt tanımlanmaktadır. Kronik defekt, periodontal hastalığın doğası gereği inflamasyon sonucunda aşamalı olarak meydana gelen yumuşak ve kemik doku kaybını ifade etmektedir. Akut defekt ise iyileşmeyi gözlemlemek amacıyla cerrahi olarak oluşturulmaktadır. Cerrahi olarak oluşturulan defektlerin, kronik defektlerin aksine bakterisiz ortamda iyileşmesi gözlenmektedir [279]. Akut defektler biyomateryallerin etkinliğini araştırmak amacıyla gerçekleştirilen hayvan çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır [280].

Hayvan modellerinde kritik boyutlu kemik defekti, hayvanın yaşamı boyunca kendi kendine iyileşme gösteremeyen en küçük intraosseöz yara olarak tanımlanmaktadır [41, 156, 261, 262, 269, 281-283]. Araştırmacılar kritik boyuttaki kemik defektlerinin biyomateryaller kullanılmadan spontan iyileşme gösteremediğini bildirmişlerdir [41, 156, 269, 281-284].

Koyunların sağ iliak krestinde trefan frez ile 8 adet olmak üzere (her bir defekt arasında en az 5 mm mesafe olacak şekilde), toplam 40 adet akut, kritik boyutlu standart

defektler oluşturulmuştur. Bir iliak krestte oluşturulan 8 defekt, bir gruptan (Kontrol, kollajen, TZF, DDL-TZF) iki adet oluşturulacak şekilde sınıflandırılmıştır. Böylece her bir koyunda, bir gruptan iki defekt elde edilmiştir. İliak krestte oluşturulan defektlerin sınıflandırılması yapılırken, her koyunda defektler ikişerli gruplar halinde saat yönünde ilerletilmiştir. Böylece bariyer membranın etkinliğinin değerlendirilmesinde, kemiğin yapısına bağlı oluşabilecek heterojenitenin önüne geçilmiştir. Koyun kemiğinin insan kemiğine yakın olan iyileşmesi ve kolajen membranların ortalama rezorbsiyon süresi göz önüne alınarak 12 hafta sonunda hayvanlar sakrifiye edilmiştir [34, 285-287].

Kemik rejenerasyonu ile ilgili çalışmalarda, iyileşmeyi değerlendirmek amacıyla kullanılan en yaygın yöntemler histolojik ve histomorfometrik analizlerdir [288]. Histomorfometrik analizde kemik kütlesi ve yapısı hakkında parametreler elde edilebilmektedir [288, 289]. Bu parametreler kemiğin üç boyutlu geometrisi ile ilgilidir ve toplam kemik alanı ile toplam kemik çevresinin ölçümlerinden hesaplanmaktadır [289]. Çalışmamızda yeni kemik oluşumunu analiz etmek amacıyla güvenilirliği literatürdeki çalışmalarda rapor edilen histolojik ve histomorfometrik değerlendirme yöntemleri kullanılmıştır [34, 102, 113, 151, 288].

Yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda kritik boyutlu kemik defektlerinin iyileşmesinde kolajen membranın etkisinin değerlendirildiği birçok hayvan çalışması bulunmaktadır [119, 283, 290, 291]. Bu çalışmalarda kolajen membran kullanımının erken dönemde (30. gün) defektin osteoblastik aktiviteye sahip lameller kemikle dolduğunu [284], membran kullanılan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla kemik rejenerasyonu gözlemlendiğini ortaya koymuştur [281, 283, 284, 292, 293]. Ayrıca periodontal kemik içi defektlerin tedavisinde kolajen membran kullanılan hayvan ve insan çalışmalarında, kolajen membranın sondlama derinliğini azalttığı, klinik ataçman kazancı sağladığı ve defekt içinde kemik formasyonunu arttırdığı gözlenmiştir [18, 294-297].

Literatürde kolajen membranın etkinliğinin değerlendirildiği benzer çalışmalar incelenmiştir. Domuz, tavşan, köpek olmak üzere farklı hayvan modellerinde, 1 aydan 6 aya kadar değişen farklı takip sürelerinde ve farklı boyutlardaki kritik defektlerde kontrol gruplarında % 26 ile % 48 arasında kemik dolumu tespit edilmiştir. Bu değer çalışmamızda % 20 olarak gözlenmiştir. Bu çalışmalarda kolajen membran uygulanan gruplarda % 35-60 arasında kemik dolumu gösterilmişken bu değer çalışmamızda

% 33 olarak bulunmuştur. Çalışmalar arası bu farklılıkların deneylerin metodolojisi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Çalışmamız ve kolajen membranın etkinliğinin değerlendirildiği ilgili çalışmalar çizelge 10'da gösterilmiştir.

Bununla birlikte kolajen membranlar, öngörülemeyen rezorbsiyon süresine sahiptir. Buna bağlı olarak kemik oluşum miktarı önemli ölçüde değişebilmektedir [105, 298]. Bariyer membranın hızlı rezorbsiyonu sonucunda, rejenerasyon beklenen alanda rijidite kaybı ve yetersiz sert doku formasyonu meydana gelebilmektedir [299, 300]. Yetersiz mekanik direncinden dolayı, geniş defektlerde partikül greflerle birlikte kullanımı zor olabilmektedir [301]. Kemik defekti fiziksel bir bariyerle desteklenmezse, kemik rejenerasyonu başarısızlıkla sonuçlanmaktadır [105]. Membranla ilgili dokuda inflamatuvar reaksiyon meydana geldiğinde ve/veya ekspozite olduğunda, nötrofillerin ve makrofajların enzimatik aktivitesiyle membran hızlı bir şekilde rezorbe olmaktadır. Böylece membranın yapısal bütünlüğü etkilenerek bariyer fonksiyonu azalmaktadır ve YKR prosedürü daha az kemik rejenerasyonu ile sonuçlanmaktadır [302].

TZF, TZP dahil olmak üzere trombosit konsantreleri yumuşak ve sert dokuların rejenerasyon kapasitesini arttırmak amacıyla diş hekimliği, plastik cerrahi, dermatoloji gibi alanlarda kullanılmaktadır [303]. Bu biyomateryaller dokulardaki büyüme faktörü miktarını arttırarak çeşitli hücre tiplerinin çoğalması ve farklılaşmasını düzenlemektedir [176, 304-306].

TZF periodontolojide mukogingival cerrahide, kret korumada, flep operasyonlarında, furkasyon defektlerinde, periodontal kemik içi defektlerin tedavisinde yönlendirilmiş doku ve kemik rejenerasyonu prosedürlerinde kullanılmaktadır [21, 35, 177].

Çizelge 10. Çalışmamız ve kolajen membranın etkinliğinin değerlendirildiği ilgili çalışmalar

Yazarlar	Deney defekt sayısı(n)	Defekt türü	Takip süresi	Analiz türü	Tedavi türü	Sonuç
de Lima Taga ve ark. [281] (2008)	Domuz n:42	KBD (9x9mm)	3 ay	Histomorfometrik ve radyografik	Kontrol : Boş Test: Kolajen membran	Test grubunda %60, kontrol grubunda %39 yeni kemik formasyonu. Farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu bildirilmiştir.
Colangelo ve ark. [284](1993)	Tavşan n: 30	KBD (9x3mm)	1 ay	Histomorfometrik	Kontrol : Boş Test: Kolajen membran	Kontrol grubunda neredeyse tamamen fibröz doku, test grubunda osteoblastik aktiviteye sahip lameller kemik formasyonu gözlenmiştir.
Bornstein ve ark. [307] (2009)	Domuz n:34	KBD (6x6X6mm)	4 ay	Histomorfometrik	Kontrol : DSKM Test: DSKM+ Kolajen membran	4. Ayın sonunda kontrol grubunda %26,21 test grubunda ise %35,9 oranında yeni kemik formasyonu gözlenmiştir. Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı.
Cirelli ve ark. [308] (1997)	Köpek n: 4	Periodontal defekt	3 ay	Histomorfometrik	Kontrol: Flep cerrahisi Test: Flep cerrahisi + Kolajen membran	Yeni kemik formasyonu test grubunda ortalama %56,3±11,4 iken, kontrol grubunda ortalama %48,6±26,9 bulunmuştur. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır.
Sanz ve ark. [283] (2017)	Köpek n:18	KBD (10x10x5mm)	1,3,6 ay	Histomorfometrik	Kontrol : DSKM Test: DSKM+Kolajen membran	1 ve 3. ayların sonunda test grubunda daha fazla mineralize doku formasyonu gözlenirken 6. ayda kontrol grubunda daha fazla gözlenmiştir. Ancak tüm zamanlarda farklar istatistiksel olarak anlamlı değildi.
Çalışmamız	Koyun N:40 (kolajen:10, test: 10)	KBD (8x8mm)	12 hafta	Histomorfometrik	Kontrol : DSKM Kolajen : DSKM + Kolajen membran	Histomorfometrik analiz sonucunda Kolajen grubunda yeni kemik formasyonu % 33,68 iken kontrol grubunda % 20,46 olarak belirlenmiştir. Fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Diş eti çekilmelerinin tedavisinde koronale kaydırılan fleple birlikte kök yüzeyi üzerine uygulandığında, TZF kullanıldığı durumlarda diş eti kalınlığının arttığı bildirilmiştir [309-311]. Koronale kaydırılan fleple birlikte bağ doku ve TZF kullanımının karşılaştırıldığı çalışmalarda, iki grup arasında kök kapama yüzdesi bakımından fark olmadığı açıklanmıştır [243, 312-315]. TZF kullanılan bölgelerde daha az post operatif ağrı olduğu [315], daha fazla diş eti kalınlığı [310, 316] ve daha iyi yara iyileşmesi görüldüğü [316], bağ doku grubunda ise daha fazla keratinize diş eti genişliği meydana geldiği gözlenmiştir [316]. Sınıf II furkasyon problemlerinin tedavisinde TZF'nin sert dokunun iyileşme potansiyeli üzerine etkisi araştırılmış ve flep operasyonu ile beraber TZF uygulaması yapılmıştır. 9 aylık klinik ve radyografik ölçümlerde test grubunda başlangıca göre tüm parametrelerde kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı kazanç elde edilmiştir. Bu sonuçlarla TZF'nin furkasyon defektlerinin rejeneratif tedavisinde etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini bildirilmiştir [317].

Diş çekimi sonrası krette meydana gelen horizontal ve vertikal kayıpları azaltmak ve kreti korumak amacıyla TZF'nin greft olarak kullanıldığı randomize kontrollü çalışmalarda, TZF kullanımının lingual [318] ve bukkal kemik rezorpsiyonunu azalttığı [318, 319], daha az krestal kemik kaybı gözlendiği [320] ve daha iyi soket koruma sağlandığı [318-320] bildirilmiştir. Ayrıca TZF kullanılan gruplarda daha iyi yumuşak doku iyileşmesi gözlenmiştir [321].

TZF'nin periodontal veya kemik defektlerinin tedavisinde kullanımı, doğal doku rejenerasyonu ve YKR'ye benzer kemik rejenerasyonu ile sonuçlanmaktadır [322]. Periodontal kemik içi defektlerin rejeneratif tedavi prosedürlerinde TZF kullanımı ile ilgili sistematik değerlendirme ve meta analizlerde, TZF kullanıldığında sondlanan cep derinliğinde azalma, klinik ataçman seviyesi kazancı ve kemik defekti dolumu görüldüğü rapor edilmiştir [317, 322-330].

Farklı trombosit konsantrasyonlarının kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada kritik boyuttaki defektlerde TZP, TZF, CGF'nin greft materyali olarak kullanımının iyileşmenin erken döneminde yeni kemik formasyonunu arttırdığı bildirilmiştir [156]. TZF'nin kemik rejenerasyonuna etkisini boş defektle (kontrol grubu) karşılaştırarak değerlendirilmiştir. 1 ve 3 aylık dönemlerde TZF grubunda kontrol grubuna göre daha fazla kemik rejenerasyonu gözlenmiştir [331].

Kemik içi defekterin tedavisinde tek başına TZF'nin greft materyali olarak kullanımını değerlendiren bir çalışmada 7, 14 ve 28 günün sonunda TZF' nin tamir edilen kemiğin mikro yapısını etkilemediği ve kemik rejenerasyonunu arttırmadığı gözlenmiştir [332].

Kritik boyutlu kemik defektlerinin rejenerasyonunda TZF kullanımının anjiyogenezis ve osteogenenezise etkileri karşılaştırıldığında, 1, 5 ve 12. Haftanın sonunda tüm zamanlarda VEGF miktarı TZF grubunda anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur. Ancak TZF grubunda kemik formasyonu açısından anlamlı bir fark gözlenmediği açıklanmıştır [333].

Literatür incelemesi yapıldığında TZF' nin bariyer membran olarak kullanıldığı herhangi bir çalışma yoktur. TZF' nin greft materyali olarak veya greft materyalleriyle karıştırılarak kullanıldığı 1 hafta ile 12 hafta arasında değişen takip süreli çalışmalara ulaşılabilmektedir. TZF Bu amaçla kullanıldığında % 21 ile % 60 arasında değişen kemik formasyonu oranına sahiptir. Bizim çalışmamızda bu oran % 20,46 olarak bulunmuştur ve TZF grubu kontrol grubuna göre daha başarılı bulunmuştur ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Ayrıca TZF grubunun kolajen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşük olduğu gözlenmiştir. Çalışmamız ve trombositten zengin fibrinin etkinliğinin değerlendirildiği ilgili çalışmalar çizelge 11' de gösterilmiştir.

Gassling ve ark. gerçekleştirdikleri in-vitro çalışmalarında, TZF ve kolajen membranın periost hücrelerinin çoğalabilmesinde etkinliğini ilk defa karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada; TZF' nin insan periost hücrelerinin çoğalmasında kolajen membrana göre daha üstün bir çatı görevi görebileceği belirtilmiştir. TZF kolajen membrana göre daha pürüzsüz yüzeye sahiptir, bu yüzey hücre proliferasyonuna daha iyi öncülük etmektedir ve büyüme faktörleri bakımından zengin içeriğe sahiptir. TZF' nin pürüzsüz yüzeyinin ve büyüme faktöründen zengin içeriğinin periosteal hücre proliferasyonunda daha başarılı olmasında etkili olduğu düşünülmektedir [161]. Ayrıca TZF' nin biyouyumlu bir materyal olmasının yanı sıra düşük maliyetli olması rejeneratif tedavilerde kullanılabilirliğini arttırmaktadır [334].

Çizelge 11. Çalışmamız ve trombositten zengin fibrinin etkinliğinin değerlendirildiği ilgili çalışmalar

Yazarlar	Deney Hayvanı, Defekt sayısı (n)	Defekt türü	Takip süresi	Analiz türü	Tedavi türü	Sonuç
Knapen ve ark. [335] (2015)	Tavşan n: 72	KBD (8x8mm)	5 hafta 12 hafta	Histomorfometrik	Kontrol: greft materyali Test: greft materyali+TZF	Yeni kemik formasyonu 5. haftada kontrol grubunda %6,87; test grubunda %7,20. 12. haftada kontrol grubunda %21,15; test grubunda %21,42 olarak bulunmuştur. farklar istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
Pripatnanont ve ark. [336] (2013)	Tavşan n: 10	KBD (6x6 mm)	8 hafta	Histomorfometrik	Kontrol: boş Test: TZF	8. Haftanın sonunda kontrol grubunda %6,24; test grubunda ise %18,81 kemik formasyonu gözlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlıdır.
Suruagy ve ark. [337] (2018)	Sıçan n: 36	KBD (2x2mm)	5 gün 15 gün 30 gün	Histomorfometrik	Kontrol: Boş Test: TZF	TZF grubunda kontrol grubuna göre, 5. günde daha az inflamatuvar reaksiyon, 15 ve 30. Günlerde istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha fazla kemik formasyonu gözlenmiştir.
Faot ve ark. [332] (2017)	Tavşan n: 96	KBD (3x6mm)	1,2,4 hafta	Micro-CT	Kontrol: Boş Test: TZF	4. Haftanın sonunda kontrol grubunda %58,33; test grubunda %60,47 oranında yeni kemik formasyonu gözlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
Çalışmamız	Koyun n:40 (kontrol:10, kollajen: 10, TZF:10)	KBD (8x8mm)	12 hafta	Histomorfometrik	Kontrol Grubu: Boş Kolajen Grubu: DSKM+Kolajen TZF Grubu: DSKM+TZF	Kolajen Grubu'nun kemik formasyonu, diğer gruplardan istatistiksel olarak anlamlı olacak biçimde yüksek bulunmuştur. TZF Grubu' nin kemik formasyonu %22,79; kontrol grubunun %20, 46 olarak bulundu, ancak bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

TZF ve kolajen membranın; doku mühendisliğinde osteoblast hücrelerinin göçü, farklılaşması ve çoğalması üzerine etkileri Gassling ve ark. tarafından in-vitro bir çalışmada karşılaştırılmıştır. Osteoblast farklılaşması ve biyouyumluluğun değerlendirildiği test değerleri, TZF’de kolajene göre daha yüksek bulunmuştur. Elektron mikroskopu incelemede, iki grupta da osteoblast çoğalması gözlemlendiği, ancak TZF’de yüksek olduğu bildirilmiştir [338].

Kolajen membranların ortalama rezorpsiyon süresi 8 haftadır. Bu durum, defekt bölgesinin en az 8 hafta stabilizasyonunun sağlanması demektir. Bu sürenin sonunda defekt bölgesinde sadece küçük parçacıklar halinde bulunmaktadır [339]. TZF’nin 7-14 gün boyunca stabil kalabildiği Ehrenfest ve ark. tarafından in-vitro bir çalışmada gösterilmiştir [179]. 7. günden sonra membran yapısı çözülmeye başlamakta ve büyüme faktörü salınım miktarı azalmaktadır [179]. Çalışmamızda kolajen grubunun TZF grubuna göre daha başarılı bulunmasının nedenlerinden birinin, TZF’nin hızlı rezorpsiyonu sonucu bariyer görevini erken dönemde kaybetmesi olabileceği düşünülmektedir.

TZF fabrikasyon üretilen ve durağan olan kolajen membranın aksine yaşayan canlı bir materyal olarak tanımlanmaktadır. Periodontal tedavi, YDR, ve YKR gibi her bir detayın önemli olduğu kritik durumlarda, kullanılan TZF’ nin sınırlı hacminin (tek kat TZF membran) klinik bir problem haline geldiği bildirilmiştir [311, 323]. TZF’ nin ince fibrin matriksinin vaskülarizasyonun fazla olduğu durumlarda erken çözünebileceği, istenilen dokuda daha uzun süre stabilitenin sağlanabilmesi için kalın ve güçlü olması gerektiği bildirilmektedir [28, 340]. Bu nedenle Ehrenfest ve arkadaşları, TZF’ nin rezorpsiyon süresini ve mekanik stabilitesini arttırmak amacıyla en az iki kat, mümkünse üç kat kullanılması gerektiğini önermektedir [323]. Çalışmamızda TZF’ nin stabilitesini arttırmak ve rezorpsiyon süresini uzatmak amacıyla iki kat TZF membran kullanılmıştır, ancak bu özellikleri geliştirmek amacıyla daha sonraki çalışmalarda üç, dört kat veya daha fazla kat şeklinde uygulanması test edilebilir.

TZF kolajen membran maliyeti açısından karşılaştırıldığında, TZF daha düşük maliyetlidir [132]. Bu nedenle bariyer membran olarak etkinliği daha ileri çalışmalarla kanıtlanırsa yönlendirilmiş doku ve kemik rejenerasyonunda kolajen membrana göre daha yaygın kullanılabilir.

TZF'nin iyileşmeye olan etkisinde büyüme faktörlerinin rolü bilinmektedir [341]. Bu nedenle bariyer membran olarak kullanımında büyüme faktörlerinin etkinliğini ve sayısını arttırmak amacıyla, düşük doz lazerin büyüme faktörleri üzerindeki biyostimülasyon etkisinden yararlanılabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla çalışmamızda TZF'ye 810 nm dalga boyunda DDL uygulanmıştır [263].

Çalışmamızda DDL-TZF grubunun yeni kemik formasyonu %23,68 olarak bulunmuştur. Bu değer kontrol ve TZF grupları ile karşılaştırıldığında yüksek olmasına rağmen aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Buna karşılık aradaki fark kolajen grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür.

Literatürde lazerlerin biyostimülasyon etkisinde dalga boyunun önemli olduğu, yüksek dalga boyundaki enerjinin dokunun yüzey tabakaları tarafından absorbe edilerek derin tabakaları uyaramayacağı belirtilmiştir [236]. Lazerin biyostimülasyon etkisi için en uygun dalga boyu 660-810 nm aralığıdır [233, 236]. DDLT'nin araştırılması ve farklı dokulardaki kullanımının evrenselleştirilmesine yönelik standart protokoller henüz oluşturulmamıştır. Bu nedenle DDL ile fotobiyostimülasyon araştırmalarının başka çalışmalarla tekrarlanabilirliği ve karşılaştırılabilirliği yetersizdir [253, 342].

Literatürde DDLT uygulamasıyla kemik rejenerasyonu arasındaki pozitif ilişki yaygın olarak tanımlanmıştır [342-344]. Hayvan çalışmalarında oluşturulan kritik boyutlu defektlerin rejenerasyonunda fotobiyostimülasyonun etkinliği değerlendirildiğinde DDLT uygulamasının kemik dokunun iyileşmesini uyardığı [342] ve kemik tamirini hızlandırdığı [251] gösterilmiştir.

Nagata ve ark. ratların mandibulasında periodontal fenestrasyon defektlerinde oluşturmuşlardır. İyileşmeyi değerlendirmek için 4 farklı; 1) boş bırakılan kontrol grubu (C), 2)TZP ile kapatılan grup (TZP), 3) DDLT uygulanan grup (630nm) (DDL) ve 4) DDL/ TZP grupları oluşturulmuştur. DDL/TZP grubunda defekte önce DDL uygulanmış, sonra TZP yerleştirilmiş ardından tekrar DDL uygulanmıştır. 10. günün sonunda kontrol grubunda defektin merkezinde olgunlaşmamış kemik trabekülleri gözlenmiştir. TZP, DDL ve DDL/TZP gruplarında defekt sınırları boyunca örgü kemik oluşumu gözlenmiştir. 30. günün sonunda C grubu dışındaki tüm gruplarda; inflamatuvar yanıt gözlenmeksizin tüm defekt boyunca kalın kemik trabekülleri ve yenilenmiş periost gözlenmiştir. DDL grubunda kemik oluşumu açısından anlamlı bir fark gözlenmemiştir [33].

Bahnasy Sleem ve ark. DDLT'nin, implantın bukkal kemiğine yerleştirilen TZF'ye biyostimülasyon etkisini klinik ve radyografik olarak değerlendirmişlerdir. Bilateral birer tane molar dişi eksik olan hastalara standart implantlar yerleştirilmiştir. Her iki tarafta implantların bukkal yüzeyine TZF yerleştirilmiştir. Bir taraftaki TZF'ye 1 ay boyunca haftada iki defa 830 nm dalga boyunda DDLT uygulanmış, diğer tarafa uygulanmamıştır. 9 aylık takip sonunda iki grup arasında kemik dansitesi ve implant stabilitesi açısından farklılık bulunmamıştır [141].

Ancak DDLT'nin kemik tamiri ve rejenerasyonu üzerinde görülen etkisinin, doğrudan kemik hücreleri üzerindeki etkisiyle veya büyüme faktörleri ve mezenşimal kök hücrelerin farklılaşmasını tetiklemesi üzerine olan etkisiyle olduğu konusu hala tartışmalıdır. Bu konudaki kilit moleküllerin, FGF ve TGF- β konsantrasyonları olduğu düşünülmektedir. FGF'nin artmış konsantrasyonu, farklılaşmış hücrelerin olgunlaşmasını yönlendirmektedir [345]. TGF- β 'nin konsantrasyonun, lazerin dozuna bağlı olarak insan kemiğinde arttığı ve bu artışın hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasını yönlendirdiği bildirilmiştir [346]. İnsan diş eti fibroblastlarından (HGF) salınan FGF, IGF-I büyüme faktörleri ve IGF-I reseptör konsantrasyonlarının biyostimülasyon sonrası değişimini değerlendirildiği bir çalışmada, DDLT uygulamasının periodontal yara iyileşmesinde önemli yere sahip HGF'den salınan büyüme faktörlerinin miktarını arttırdığı gösterilmiştir [142].

Literatür incelemesi yapıldığında TZF'nin diş hekimliğinde sert doku greft materyali olarak veya periodontal plastik cerrahilerde yumuşak doku grefti olarak kullanıldığı çalışmalar yer almaktadır. Ancak TZF'nin yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda bariyer membran olarak kullanıldığı kontrollü çalışmalara çalışmalara rastlanmamıştır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Gruplar arasında yeni kemik oluşumu (BV/TV), kemik hacmi (BV), kemik yüzeyi (BS) değerlendirildiğinde sırasıyla kolajen membran, DDL-TZF, TZF ve kontrol grubu başarılı bulunmuştur. İstatistiksel olarak sadece kolajen grubu ile diğer gruplar arasındaki fark anlamlıdır.
2. Hastanın kendi kanından elde edilen otolog bir ürün olan ve büyüme faktörleri içeren TZF bariyer membran olarak etkinlik göstermiştir, ancak TZF' nin hızlı rezorbsiyon süresi kolajen membrana göre en önemli dezavantajıdır.
3. DDL uygulanmış TZF, TZF'ye göre daha başarılı sonuçlar vermiştir. Bu durumun, DDL uygulamasının TZF içerisindeki büyüme faktörlerinin uyarılması sonucunda etkinliğinin artmasıyla ilgili olabileceği düşünülmektedir.
4. Çeşitli yöntemler ile TZF'nin rezorbsiyon süresinin uzatılması, mekanik stabilitesinin arttırılması ve büyüme faktörlerinin salınımının stimüle edilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

1. **Hämmerle, C.H.** and R.E. Jung, *Bone augmentation by means of barrier membranes*. Periodontology 2000, **2003**. 33(1): p. 36-53.
2. **Wang, K.H.**, J.C. Inman, and R.E. Hayden, *Modern concepts in mandibular reconstruction in oral and oropharyngeal cancer*. Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery, **2011**. 19(2): p. 119-124.
3. **Miron, R.J.**, et al., *Guided Bone Regeneration with Platelet Rich Fibrin*. Platelet Rich Fibrin in Regenerative Dentistry: Biological Background and Clinical Indications, **2017**.
4. **Gottlow, J.**, et al., *New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration*. Journal of clinical periodontology, **1984**. 11(8): p. 494-503.
5. **Nyman, S.**, et al., *New attachment following surgical treatment of human periodontal disease*. Journal of clinical periodontology, **1982**. 9(4): p. 290-296.
6. **Gottlow, J.**, et al., *New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration Case reports*. Journal of clinical periodontology, **1986**. 13(6): p. 604-616.
7. **Caffesse, R.G.**, et al., *Guided tissue regeneration: Comparison of bioabsorbable and non-bioabsorbable membranes. Histologic and histometric study in dogs*. Journal of periodontology, **1994**. 65(6): p. 583-591.
8. **KARRING, T.**, et al., *Development of the biological concept of guided tissue regeneration—animal and human studies*. Periodontology 2000, **1993**. 1(1): p. 26-35.
9. **Dahlin, C.**, et al., *Healing of bone defects by guided tissue regeneration*. Plastic and reconstructive surgery, **1988**. 81(5): p. 672-676.
10. **Hämmerle, C.H.**, et al., *Temporal dynamics of healing in rabbit cranial defects using guided bone regeneration*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, **1995**. 53(2): p. 167-174.
11. **Gottlow, J.**, *Guided tissue regeneration using bioresorbable and non-resorbable devices: initial healing and long-term results*. Journal of periodontology, **1993**. 64: p. 1157-1165.
12. **Grinnell, F.**, *Cellular adhesiveness and extracellular substrata*, in *International review of cytology*. **1978**, Elsevier. p. 65-144.
13. **Kim, B.-S.** and D.J. Mooney, *Development of biocompatible synthetic extracellular matrices for tissue engineering*. Trends in biotechnology, **1998**. 16(5): p. 224-230.
14. **Minuth, W.W.**, M. Sittinger, and S. Kloth, *Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications*. Cell and tissue research, **1997**. 291(1): p. 1-11.
15. **Machtei, E.E.**, et al., *Clinical, microbiological, and histological factors which influence the success of regenerative periodontal therapy*. Journal of periodontology, **1994**. 65(2): p. 154-161.
16. **Hämmerle, C.H.**, et al., *Successful bone formation at immediate transmucosal implants: a clinical report*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **1998**. 13(4).
17. **Urban, I.A.**, S.A. Jovanovic, and J.L. Lozada, *Vertical ridge augmentation using guided bone regeneration (GBR) in three clinical scenarios prior to implant placement: a retrospective study of 35 patients 12 to 72 months after loading*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **2009**. 24(3).

18. **Bunyaratavej, P.** and H.L. Wang, *Collagen membranes: a review*. Journal of periodontology, **2001**. 72(2): p. 215-229.
19. **Rothamel, D.**, et al., *Biocompatibility of various collagen membranes in cultures of human PDL fibroblasts and human osteoblast-like cells*. Clinical Oral Implants Research, **2004**. 15(4): p. 443-449.
20. **Siar, C.H.**, et al., *Subcutaneous reactions and degradation characteristics of collagenous and noncollagenous membranes in a macaque model*. Clinical oral implants research, **2011**. 22(1): p. 113-120.
21. **Miron, R.J.**, et al., *Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: a systematic review*. Clinical oral investigations, **2017**. 21(6): p. 1913-1927.
22. **Marler, J.J.**, et al., *Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration*. Advanced drug delivery reviews, **1998**. 33(1-2): p. 165-182.
23. **Burnouf, T.**, et al., *Blood-derived biomaterials: fibrin sealant, platelet gel and platelet fibrin glue*. ISBT Science Series, **2009**. 4(1): p. 136-142.
24. **Sammartino, G.**, et al., *Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, **2005**. 63(6): p. 766-770.
25. **Kang, Y.-H.**, et al., *Platelet-rich fibrin is a Bioscaffold and reservoir of growth factors for tissue regeneration*. Tissue Engineering Part A, **2010**. 17(3-4): p. 349-359.
26. **M Dohan Ehrenfest, D.**, et al., *In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes*. Current Pharmaceutical Biotechnology, **2012**. 13(7): p. 1131-1137.
27. **Dohan Ehrenfest, D.M.**, et al., *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, **2009**. 27(1): p. 63-69.
28. **Simonpieri, A.**, et al., *The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part I: a new grafting protocol*. Implant dentistry, **2009**. 18(2): p. 102-111.
29. **Tanaka, H.**, et al., *Additional effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in sinus augmentation with deproteinized bovine bone mineral: preliminary results*. Implant dentistry, **2015**. 24(6): p. 669-674.
30. **Dragonas, P.**, et al., *Effects of leukocyte-platelet-rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review*. International journal of oral and maxillofacial surgery, **2018**.
31. **Onur U Türer, B.A.**, *Periodontolojide Lazer Uygulamaları*, in *Periodontoloji ve İmplantoloji*, G. Çağlayan, Editor. **2018**, quintessence publishing: Turkey. p. 939.
32. He, W., et al., *A systematic review and meta-analysis on the efficacy of low-level laser therapy in the management of complication after mandibular third molar surgery*. Lasers in medical science, **2015**. 30(6): p. 1779-1788.
33. **Nagata, M.J.**, et al., *Platelet-Rich Plasma, Low-Level Laser Therapy, or Their Combination Promotes Periodontal Regeneration in Fenestration Defects: A Preliminary In Vivo Study*. Journal of periodontology, **2014**. 85(6): p. 770-778.

34. **Jakse, N.**, et al., *Influence of low-level laser treatment on bone regeneration and osseointegration of dental implants following sinus augmentation: An experimental study on sheep*. *Clinical oral implants research*, **2007**. 18(4): p. 517-524.
35. **Castro, A.B.**, et al., *Regenerative potential of leucocyte-and platelet-rich fibrin. Part B: sinus floor elevation, alveolar ridge preservation and implant therapy. A systematic review*. *Journal of clinical periodontology*, **2017**. 44(2): p. 225-234.
36. **Downey, P.A.** and M.I. Siegel, *Bone biology and the clinical implications for osteoporosis*. *Physical therapy*, **2006**. 86(1): p. 77-91.
37. **Garant, P.R.** and P. Garant, *Oral cells and tissues*. **2003**.
38. **Kalfas, I.H.**, *Principles of bone healing*. *Neurosurgical focus*, **2001**. 10(4): p. 1-4.
39. **Sodek, J.** and M.D. Mckee, *Molecular and cellular biology of alveolar bone*. *Periodontology 2000*, **2000**. 24(1): p. 99-126.
40. **Prolo, D.J.**, P.W. Pedrotti, and D.H. White, *Ethylene oxide sterilization of bone, dura mater, and fascia lata for human transplantation*. *Neurosurgery*, **1980**. 6(5): p. 529-539.
41. **Kabir, M.A.**, et al., *Evaluation of perforated demineralized dentin scaffold on bone regeneration in critical-size sheep iliac defects*. *Clinical oral implants research*, **2017**. 28(11): p. e227-e235.
42. **Marotti, G.**, et al., *Structure-function relationships in the osteocyte*. *Italian Journal of Mineral & Electrolyte Metabolism*, **1990**. 4: p. 93-106.
43. **Palumbo, C.**, S. Palazzini, and G. Marotti, *Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation*. *Bone*, **1990**. 11(6): p. 401-406.
44. **Palumbo, C.**, *A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos*. *Cell and tissue research*, **1986**. 246(1): p. 125-131.
45. **Parfitt, A.**, *Bone-forming cells in clinical conditions. The osteoblast and osteocyte*, **1990**.
46. **Luk, S.**, C. Nopajaroonsri, and G. Simon, *The ultrastructure of endosteum: A topographic study in young adult rabbits*. *Journal of ultrastructure research*, **1974**. 46(2): p. 165-183.
47. **Miller, S.C.**, et al., *Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles*. *The Anatomical Record*, **1980**. 198(2): p. 163-173.
48. **Väänänen, H.K.** and T. Laitala-Leinonen, *Osteoclast lineage and function*. *Archives of biochemistry and biophysics*, **2008**. 473(2): p. 132-138.
49. **Buckwalter, J.**, et al., *Bone biology. Part I: structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization*. *JBJS*, 1995. 77(8): p. 1256-1275.
50. **Rahime Nohutçu, G.K.**, *Kemik Dokusu*, in *Periodontoloji ve İmplantoloji*, G. Çağlayan, Editor. **2018**, quintessence publishing: Turkey. p. 93.
51. **Weigle, J.** and T.A. Franz-Odenaal, *Functional bone histology of zebrafish reveals two types of endochondral ossification, different types of osteoblast clusters and a new bone type*. *Journal of anatomy*, **2016**. 229(1): p. 92-103.
52. **Hall, B.K.** and T. Miyake, *All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development*. *Bioessays*, **2000**. 22(2): p. 138-147.

53. **Ferretti, M.**, et al., *Static and dynamic osteogenesis: two different types of bone formation*. *Anatomy and Embryology*, **2002**. 206(1-2): p. 21-29.
54. **Buckwalter, J.**, *Healing of the musculoskeletal tissues*. Rockwood and Green's fractures in adults, **1991**.
55. **Sommerfeldt, D.** and C. Rubin, *Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton*. *European Spine Journal*, **2001**. 10(2): p. S86-S95.
56. **Cohen, J.** and W.H. Harris, *The three-dimensional anatomy of Haversian systems*. *JBJS*, **1958**. 40(2): p. 419-434.
57. **Buckwalter, J.**, et al., *Bone biology. I: Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization*. *Instructional course lectures*, **1996**. 45: p. 371.
58. **Araújo, M.G.**, et al., *Alveolar socket healing: what can we learn?* *Periodontology 2000*, **2015**. 68(1): p. 122-134.
59. **Araújo, M.G.** and J. Lindhe, *Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog*. *Journal of clinical periodontology*, **2005**. 32(2): p. 212-218.
60. **Vaz, M.F.**, H. Canhão, and J.E. Fonseca, *Bone: a composite natural material*, in *Advances in Composite Materials-Analysis of Natural and Man-Made Materials*. **2011**, IntechOpen.
61. **McCauley, L.K.** and R.M. Nohutcu, *Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy*. *Journal of periodontology*, **2002**. 73(11): p. 1377-1391.
62. **Boyle, W.J.**, W.S. Simonet, and D.L. Lacey, *Osteoclast differentiation and activation*. *Nature*, **2003**. 423(6937): p. 337.
63. **Hienz, S.A.**, S. Paliwal, and S. Ivanovski, *Mechanisms of bone resorption in periodontitis*. *Journal of immunology research*, **2015**. 2015.
64. **Lerner, U.**, *Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis*. *Journal of dental research*, **2006**. 85(7): p. 596-607.
65. **Falgarone, G.**, O. Jaen, and M.-C. Boissier, *Role for innate immunity in rheumatoid arthritis*. *Joint Bone Spine*, **2005**. 72(1): p. 17-25.
66. **Tanaka, Y.**, S. Nakayamada, and Y. Okada, *Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation*. *Current Drug Targets-Inflammation & Allergy*, **2005**. 4(3): p. 325-328.
67. **Blair, J.**, Y. Zheng, and C. Dunstan, *RANK ligand*. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **2007**. 39(6): p. 1077-1081.
68. **Lacey, D.**, et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. *cell*, **1998**. 93(2): p. 165-176.
69. **Theoleyre, S.**, et al., *The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling*. *Cytokine & growth factor reviews*, **2004**. 15(6): p. 457-475.
70. **Tsuda, E.**, et al., *Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis*. *Biochemical and biophysical research communications*, **1997**. 234(1): p. 137-142.

71. **Babür, C.** and G. Özcan, *OPG/RANK/RANKL'in periodontolojideki yeri.* Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, 27(2): p. 137-144.
72. **Liu, D.,** et al., *Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction.* International journal of molecular medicine, **2003**. 11(1): p. 17-21.
73. **Nagasawa, T.,** et al., *Roles of receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin in periodontal health and disease.* Periodontology 2000, **2007**. 43(1): p. 65-84.
74. **Chambers, T.,** *The pathobiology of the osteoclast.* Journal of clinical pathology, **1985**. 38(3): p. 241-252.
75. **Nakashima, T.,** et al., *Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF- κ B ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines.* Biochemical and biophysical research communications, 2000. 275(3): p. 768-775.
76. **Baron, R.,** *Molecular mechanisms of bone resorption by the osteoclast.* The Anatomical Record, **1989**. 224(2): p. 317-324.
77. **Yasuda, H.,** et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL.* Proceedings of the National Academy of Sciences, **1998**. 95(7): p. 3597-3602.
78. **Udagawa, N.,** et al., *Osteoblasts/stromal cells stimulate osteoclast activation through expression of osteoclast differentiation factor/RANKL but not macrophage colony-stimulating factor.* Bone, **1999**. 25(5): p. 517-523.
79. **Parfitt, A.,** *The coupling of bone formation to bone resorption: a critical analysis of the concept and of its relevance to the pathogenesis of osteoporosis.* **1982**, Elsevier.
80. **Hofbauer, L.C.,** et al., *The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.* Journal of Bone and Mineral Research, **2000**. 15(1): p. 2-12.
81. **Jin, Q.,** et al., *RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis.* Journal of periodontology, **2007**. 78(7): p. 1300-1308.
82. **Nyman, S.,** et al., *The regenerative potential of the periodontal ligament: an experimental study in the monkey.* Journal of clinical periodontology, **1982**. 9(3): p. 257-265.
83. **Caton, J.** and H.A. Zander, *Osseous repair of an infrabony pocket without new attachment of connective tissue.* Journal of Clinical Periodontology, **1976**. 3(1): p. 54-58.
84. **Buser, D.,** et al., *Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration.* Clinical oral implants research, **1990**. 1(1): p. 22-32.
85. **Melcher, A.,** *On the repair potential of periodontal tissues.* Journal of periodontology, **1976**. 47(5): p. 256-260.
86. **Hürzeler, M.B.,** et al., *Guided periodontal tissue regeneration in interproximal intrabony defects following treatment with a synthetic bioabsorbable barrier.* Journal of periodontology, 1997. 68(5): p. 489-497.
87. **Buser, D.,** C. Dahlin, and R. Schenk, *Guided bone regeneration.* Chicago Quintessence, **1994**.
88. **Schenk, R.K.,** et al., *Healing pattern of bone regeneration in membrane-protected defects: a histologic study in the canine mandible.* International journal of oral & maxillofacial implants, **1994**. 9(1).

89. **Maréchal, M.**, et al., *Bone augmentation with autologous periosteal cells and two different calcium phosphate scaffolds under an occlusive titanium barrier: an experimental study in rabbits*. Journal of periodontology, **2008**. 79(5): p. 896-904.
90. **Elgali, I.**, et al., *Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited*. European journal of oral sciences, **2017**. 125(5): p. 315-337.
91. **Benic, G.I.** and C.H. Hämmerle, *Horizontal bone augmentation by means of guided bone regeneration*. Periodontology 2000, **2014**. 66(1): p. 13-40.
92. **Bauer, T.W.** and G.F. Muschler, *Bone graft materials: an overview of the basic science*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, **2000**. 371: p. 10-27.
93. **Thorkild Karring, J.L.**, *Tissue Regeneration*, in *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, J.L. Niklaus P. Lang, Editor. **2015**. p. 540.
94. **Hwang, D.** and M. Sonick, *Guided bone regeneration: concepts and materials*. Implant Site Development, **2015**: p. 153-178.
95. **McAllister, B.S.** and K. Haghghat, *Bone augmentation techniques*. Journal of periodontology, **2007**. 78(3): p. 377-396.
96. **Friedlaender, G.E.** and M.C. Horowitz, *Immune responses to osteochondral allografts: nature and significance*. Orthopedics, **1992**. 15(10): p. 1171-1175.
97. **Athanasίου, V.T.**, et al., *Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits*. Medical Science Monitor, **2009**. 16(1): p. BR24-BR31.
98. **Araújo, M., E.** Linder, and J. Lindhe, *Effect of a xenograft on early bone formation in extraction sockets: an experimental study in dog*. Clinical Oral Implants Research, **2009**. 20(1): p. 1-6.
99. **Barone, A.**, et al., *Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study*. Journal of periodontology, **2008**. 79(8): p. 1370-1377.
100. **Jensen, S.S.** and H. Terheyden, *Bone augmentation procedures in localized defects in the alveolar ridge: clinical results with different bone grafts and bone-substitute materials*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **2009**. 24.
101. **Misch, C.E.** and F. Dietsch, *Bone-grafting materials in implant dentistry*. Implant dentistry, **1993**. 2(3): p. 158-167.
102. **Liu, J.** and D.G. Kerns, *Suppl 1: mechanisms of guided bone regeneration: a review*. The open dentistry journal, **2014**. 8: p. 56.
103. **Hector F. Rios, F.V.**, William V. Giannobile, Mariano Sanz *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, ed. J.L. Niklaus P. Lang. **2015**.
104. **Takata, T.**, M. Miyauchi, and H.L. Wang, *Migration of osteoblastic cells on various guided bone regeneration membranes*. Clinical oral implants research, **2001**. 12(4): p. 332-338.
105. **Rakhmatia, Y.D.**, et al., *Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications*. Journal of prosthodontic research, **2013**. 57(1): p. 3-14.

106. **Buser, D.**, et al., *Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: a clinical study with 40 partially edentulous patients*. Journal of oral and maxillofacial surgery, **1996**. 54(4): p. 420-432.
107. **Wang, H.**, *Principles in guided bone regeneration*. Dental implantology update, **1998**. 9(5): p. 33.
108. **Salzmann, D.L.**, et al., *The effects of porosity on endothelialization of ePTFE implanted in subcutaneous and adipose tissue*. Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials, **1997**. 34(4): p. 463-476.
109. **Heinze, J.** *A space-maintaining resorbable membrane for guided tissue regeneration*. in *Annual conference of the International Association of Dental Research; Honolulu, USA*. **2004**.
110. **Kostopoulos, L.** and T. Karring, *Augmentation of the rat mandible using guided tissue regeneration*. Clinical oral implants research, **1994**. 5(2): p. 75-82.
111. **Jovanovic, S.A.** and M. Nevins, *Bone formation utilizing titanium-reinforced barrier membranes*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, **1995**. 15(1).
112. **Strietzel, F.P.**, et al., *Healing pattern of bone defects covered by different membrane types—a histologic study in the porcine mandible*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, **2006**. 78(1): p. 35-46.
113. **Stavropoulos, F.**, et al., *A comparative study of barrier membranes as graft protectors in the treatment of localized bone defects: An experimental study in a canine model*. Clinical oral implants research, **2004**. 15(4): p. 435-442.
114. **Duskova, M.**, et al., *Guided tissue regeneration, barrier membranes and reconstruction of the cleft maxillary alveolus*. Journal of Craniofacial Surgery, **2006**. 17(6): p. 1153-1160.
115. **Hockers, T.**, et al., *The combined use of bioresorbable membranes and xenografts or autografts in the treatment of bone defects around implants. A study in beagle dogs*. Clinical oral implants research, **1999**. 10(6): p. 487-498.
116. **Pitaru, S.**, et al., *Collagen membranes prevent apical migration of epithelium and support new connective tissue attachment during periodontal wound healing in dogs*. Journal of periodontal research, **1989**. 24(4): p. 247-253.
117. **Sheikh, Z.**, et al., *Biodegradable materials for bone repair and tissue engineering applications*. Materials, **2015**. 8(9): p. 5744-5794.
118. **Owens, K.W. and R.A. Yukna**, *Collagen membrane resorption in dogs: a comparative study*. Implant dentistry, **2001**. 10(1): p. 49-58.
119. **Rothamel, D.**, et al., *Biodegradation of differently cross-linked collagen membranes: an experimental study in the rat*. Clinical oral implants research, **2005**. 16(3): p. 369-378.
120. **Scarano, A.**, et al., *Bone regeneration in iliac crestal defects: an experimental study on sheep*. BioMed research international, **2016**. 2016.
121. **Behring, J.**, et al., *Toward guided tissue and bone regeneration: morphology, attachment, proliferation, and migration of cells cultured on collagen barrier membranes. A systematic review*. Odontology, **2008**. 96(1): p. 1-11.

122. **Locci, P.**, et al., *Phenotype expression of gingival fibroblasts cultured on membranes used in guided tissue regeneration*. Journal of periodontology, **1997**. 68(9): p. 857-863.
123. **Hürzeler, M.B.**, et al., *Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads: An experimental study in the monkey*. International journal of oral and maxillofacial surgery, **1998**. 27(4): p. 315-320.
124. **Miller, N.**, et al., *Resorption rates of 2 commercially available bioresorbable membranes: a histomorphometric study in a rabbit model*. Journal of clinical periodontology, **1996**. 23(12): p. 1051-1059.
125. **Oh, T.J.**, et al., *Comparative analysis of collagen membranes for the treatment of implant dehiscence defects*. Clinical oral implants research, **2003**. 14(1): p. 80-90.
126. **Hämmerle, C.H.** and N.P. Lang, *Single stage surgery combining transmucosal implant placement with guided bone regeneration and bioresorbable materials*. Clinical Oral Implants Research, **2001**. 12(1): p. 9-18.
127. **Jung, R.E.**, et al., *A randomized, controlled clinical trial to evaluate a new membrane for guided bone regeneration around dental implants*. Clinical oral implants research, **2009**. 20(2): p. 162-168.
128. **Wang, H.**, et al., *Periodontal regeneration*. Journal of periodontology, **2005**. 76(9): p. 1601-1622.
129. **Miron, R.J.**, et al., *Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGF β 1*. Clinical oral investigations, **2013**. 17(3): p. 981-988.
130. **Sculean, A.**, et al., *Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative combined with a bovine-derived xenograft*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, **2003**. 23(1).
131. **Hollander, A.**, et al., *The first stem cell-based tissue-engineered organ replacement: implications for regenerative medicine and society*. **2009**.
132. **Ehrenfest, D.M.D.**, et al., *Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives*. Muscles, ligaments and tendons journal, **2014**. 4(1): p. 3.
133. **Zumstein, M.A.**, T. Bielecki, and D.M.D. Ehrenfest, *The future of platelet concentrates in sports medicine: platelet-rich plasma, platelet-rich fibrin, and the impact of scaffolds and cells on the long-term delivery of growth factors*. Operative Techniques in Sports Medicine, **2011**. 19(3): p. 190-197.
134. **Ivanovic, A.**, et al., *Which biomaterials may promote periodontal regeneration in intrabony periodontal defects? A systematic review of preclinical studies*. Quintessence international, **2014**. 45(5).
135. **KASNAK, G.**, M. TUNALI, and H.E. FIRATLI, *Geçmişten Günümüze Kan Kaynaklı Ürünler ve Trombositten Zengin Fibrinler*. Türkiye Klinikleri J Periodontol-Special Topics, **2017**. 3(3): p. 109-12.
136. **Martin, P.**, *Wound healing--aiming for perfect skin regeneration*. Science, **1997**. 276(5309): p. 75-81.

137. **ERDEMİR, E.O.** and G. YÜCESOY, *Kemik içi Ceplerin Tedavisi Amacıyla Flep Operasyonları ile Birlikte Trombositten Zengin Fibrin Uygulamaları*. *Turkiye Klinikleri Journal of Periodontology-Special Topics*, **2017**. 3(3): p. 142-147.
138. **AYDOĞDU, A.**, U. SAKALLIOĞLU, and E.E. SAKALLIOĞLU, *Periodontal Tedavilerde Lazer Biyostimülasyonu: Düşük Seviyeli Lazer Terapisi/Fotobiyomodülasyon*. *Turkiye Klinikleri Journal of Periodontology-Special Topics*, **2016**. 2(2): p. 41-47.
139. **Karu, T.I.**, *Cellular and molecular mechanisms of photobiomodulation (low-power laser therapy)*. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*, **2013**. 20(2): p. 143-148.
140. **Kreisler, M.**, et al., *Effect of low-level GaAlAs laser irradiation on the proliferation rate of human periodontal ligament fibroblasts: an in vitro study*. *Journal of clinical periodontology*, **2003**. 30(4): p. 353-358.
141. **Sleem, S.S.M.E.B.**, et al., *Evaluation of The Bio-Stimulatory Effect of Platelet Rich Fibrin Augmented by Diode LASER Compared to Platelet Rich Fibrin Alone on Dental Implant Replacing Posterior Mandibular Teeth. Randomised Clinical Trial: Split Mouth Study*. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*, 2019. 7(5): p. 869.
142. **Saygun, I.**, et al., *Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts*. *Lasers in Medical Science*, **2008**. 23(2): p. 211-215.
143. **Safavi, S.M.**, et al., *Effects of low-level He-Ne laser irradiation on the gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β , bFGF, and PDGF in rat's gingiva*. *Lasers in medical science*, **2008**. 23(3): p. 331-335.
144. **Dohan, D.M.**, et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **2006**. 101(3): p. e37-e44.
145. **Matras, H.**, *Die Wirkungen vershiedener fibrinpreparate auf kontinuierat-strennungen der rattenhaut*. *Osterr Z Stomatol*, **1970**. 67(9): p. 338-59.
146. **Gibble, J.** and P. Ness, *Fibrin glue: the perfect operative sealant?* *Transfusion*, **1990**. 30(8): p. 741-747.
147. **M Dohan Ehrenfest, D.**, et al., *Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF)*. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2012**. 13(7): p. 1145-1152.
148. **Kumar, R.V.** and N. Shubhashini, *Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration*. *Cell and tissue banking*, **2013**. 14(3): p. 453-463.
149. **Knighton, D.R.**, et al., *Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF)*. *Annals of surgery*, **1986**. 204(3): p. 322.
150. **Whitman, D.H.**, R.L. Berry, and D.M. Green, *Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery*. *Journal of oral and maxillofacial surgery*, **1997**. 55(11): p. 1294-1299.
151. **Marx, R.E.**, et al., *Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **1998**. 85(6): p. 638-646.

152. **Malhotra, A.**, et al., *Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes.* Archives of orthopaedic and trauma surgery, **2013**. 133(2): p. 153-165.
153. **Choukroun, J.**, et al., *Une opportunité en paro-implantologie: le PRF.* Implantodontie, **2001**. 42(55): p. e62.
154. **Chhabra, P.**, et al., *Platelet Rich Fibrin-Evolution, Preparation and its Clinical Implications.* Journal of Advanced Medical and Dental Sciences Research, **2018**. 6(11): p. 102.
155. **Sacco, L.**, *Lecture, International academy of implant prosthesis and osteoconnection.* Lecture, **2006**. 12: p. 4.
156. **Kim, T.-H.**, et al., *Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing.* Archives of oral biology, **2014**. 59(5): p. 550-558.
157. **Ehrenfest, D.M.D.**, L. Rasmusson, and T. Albrektsson, *Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF).* Trends in biotechnology, **2009**. 27(3): p. 158-167.
158. **Choukroun, J.**, *Advanced PRF, & i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates.* J Periodontal Med Clin Pract, **2014**. 1(1): p. 3.
159. **Miron, R.J.**, et al., *Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry?* Clinical oral investigations, **2017**. 21(8): p. 2619-2627.
160. **Carlson, N.E.** and R.B. Roach Jr, *Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry.* The Journal of the American Dental Association, **2002**. 133(10): p. 1383-1386.
161. **Gruber, R.**, et al., *Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes.* Clinical oral implants research, **2002**. 13(5): p. 529-535.
162. **Sánchez, A.R.**, P.J. Sheridan, and L.I. Kupp, *Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review.* International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **2003**. 18(1).
163. **Mihaylova, Z.**, et al., *Use of platelet concentrates in oral and maxillofacial surgery: an overview.* Acta Odontologica Scandinavica, **2017**. 75(1): p. 1-11.
164. **Ehrenfest, D.M.D.**, et al., *Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane.* Journal of periodontology, **2010**. 81(4): p. 546-555.
165. **Kobayashi, E.**, et al., *Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF.* Clinical oral investigations, 2016. 20(9): p. 2353-2360.
166. **Anitua, E.**, et al., *The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields.* Biomaterials, 2007. 28(31): p. 4551-4560.
167. **Anitua, E.**, M.H. Alkhraisat, and G. Orive, *Perspectives and challenges in regenerative medicine using plasma rich in growth factors.* Journal of Controlled Release, **2012**. 157(1): p. 29-38.
168. **Anitua, E.**, et al., *Platelet-rich plasma: preparation and formulation.* Operative techniques in orthopaedics, **2012**. 22(1): p. 25-32.

169. **Anitua, E.**, et al., *Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors*. Cell proliferation, **2009**. 42(2): p. 162-170.
170. **Giannini, S.**, et al., *Comparison between PRP, PRGF and PRF: lights and shadows in three similar but different protocols*. Eur Rev Med Pharmacol Sci, **2015**. 19(6): p. 927-30.
171. **Scott, A.**, et al., *What do we mean by the term “inflammation”? A contemporary basic science update for sports medicine*. British journal of sports medicine, **2004**. 38(3): p. 372-380.
172. **Su, C.-Y.**, *How to optimize the preparation of leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF, Choukroun technique) clots and membranes: Introducing the PRF Box*. Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics, **2010**. 110(3): p. 278-280.
173. **Toffler, M.**, et al., *Introducing Choukroun’s platelet rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu*. J Implant Adv Clin Dent, **2009**. 1(6): p. 21-30.
174. **Anitua, E.**, et al., *Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration*. Thrombosis and haemostasis, **2004**. 91(01): p. 4-15.
175. **Dimova, C., B.** Evrosimovska, and M. Popovska. *The Use of Graft Materials and Platelet Rich Plasma in Oral Surgery*. in *Defect and Diffusion Forum*. **2017**. Trans Tech Publ.
176. **Choi, B.-H.**, et al., *Effect of platelet-rich plasma (PRP) concentration on the viability and proliferation of alveolar bone cells: an in vitro study*. International journal of oral and maxillofacial surgery, **2005**. 34(4): p. 420-424.
177. **Del Corso, M.**, et al., *Current knowledge and perspectives for the use of platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) in oral and maxillofacial surgery part 1: Periodontal and dentoalveolar surgery*. Current pharmaceutical biotechnology, **2012**. 13(7): p. 1207-1230.
178. **Dohan, D.M.**, et al., *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, **2006**. 101(3): p. e45-e50.
179. **Dohan Ehrenfest, D.M.**, et al., *The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane*. Platelets, **2018**. 29(2): p. 171-184.
180. **Dohan, D.M.**, et al., *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, **2006**. 101(3): p. e51-e55.
181. **Ghanaati, S.**, et al., *Advanced platelet-rich fibrin: a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells*. Journal of Oral Implantology, **2014**. 40(6): p. 679-689.
182. **Sohn, D.-S.**, et al., *Bone regeneration in the maxillary sinus using an autologous fibrin-rich block with concentrated growth factors alone*. Implant dentistry, **2011**. 20(5): p. 389-395.
183. **Yu, B.** and Z. Wang, *Effect of concentrated growth factors on beagle periodontal ligament stem cells in vitro*. Molecular medicine reports, **2014**. 9(1): p. 235-242.
184. **Masuki, H.**, et al., *Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF)*. International journal of implant dentistry, **2016**. 2(1): p. 19.

185. **Fujioka-Kobayashi, M.**, et al., *Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response*. Journal of periodontology, **2017**. 88(1): p. 112-121.
186. **Dohan Ehrenfest, D.M.**, et al., *Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane*. Journal of periodontology, **2010**. 81(4): p. 546-555.
187. **Blair, P.** and R. Flaumenhaft, *Platelet α -granules: basic biology and clinical correlates*. Blood reviews, **2009**. 23(4): p. 177-189.
188. **Rendu, F.** and B. Brohard-Bohn, *The platelet release reaction: granules' constituents, secretion and functions*. Platelets, **2001**. 12(5): p. 261-273.
189. **Nurden, A.T.**, *Platelets, inflammation and tissue regeneration*. Thrombosis and haemostasis, **2011**. 105(S 06): p. S13-S33.
190. **Sam, G.** and B.R.M. Pillai, *Evolution of barrier membranes in periodontal regeneration-“are the third generation membranes really here?”* Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, **2014**. 8(12): p. ZE14.
191. **Hoch, R.V.** and P. Soriano, *Roles of PDGF in animal development*. Development, **2003**. 130(20): p. 4769-4784.
192. **Ray, A.K.**, et al., *Platelet-derived growth factor-BB stimulated cell migration mediated through p38 signal transduction pathway in periodontal cells*. Journal of periodontology, **2003**. **74(9): p. 1320-1328.**
193. **Rosenkranz, S.** and A. Kazlauskas, *Evidence for distinct signaling properties and biological responses induced by the PDGF receptor α and β subtypes*. Growth Factors, **1999**. 16(3): p. 201-216.
194. **Lucarelli, E.**, et al., *Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells*. Biomaterials, **2003**. 24(18): p. 3095-3100.
195. **Schliephake, H.**, *Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction*. International journal of oral and maxillofacial surgery, **2002**. 31(5): p. 469-484.
196. **Zachary, I.**, *VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology*. **2003**, Portland Press Limited.
197. **Hilfiker-Kleiner, D.**, U. Landmesser, and H. Drexler, *Molecular mechanisms in heart failure: focus on cardiac hypertrophy, inflammation, angiogenesis, and apoptosis*. Journal of the American College of Cardiology, **2006**. 48(9 Supplement): p. A56-A66.
198. **Harry, L.E.** and E.M. Paleolog, *From the cradle to the clinic: VEGF in developmental, physiological, and pathological angiogenesis*. Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews, **2003**. 69(4): p. 363-374.
199. **Ruhrberg, C.**, *Growing and shaping the vascular tree: multiple roles for VEGF*. Bioessays, **2003**. 25(11): p. 1052-1060.
200. **Winkler, R.**, et al., *The IGF system: summary and recent data*. Revue medicale de Liege, **2000**. 55(7): p. 725-739.
201. **Cieslik-Bielecka, A.**, et al., *Why the platelet-rich gel has antimicrobial activity?* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, **2007**. 3(103): p. 303-305.

202. **Tsirogianni, A.K.**, N.M. Moutsopoulos, and H.M. Moutsopoulos, *Wound healing: immunological aspects*. *Injury*, **2006**. 37(1): p. S5-S12.
203. **Barrientos, S.**, et al., *Growth factors and cytokines in wound healing*. *Wound repair and regeneration*, **2008**. 16(5): p. 585-601.
204. **Mosesson, M.W.**, K.R. Siebenlist, and D.A. Meh, *The structure and biological features of fibrinogen and fibrin*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2001**. 936(1): p. 11-30.
205. **Clark, R.A.**, *Fibrin glue for wound repair: facts and fancy*. *Thrombosis and haemostasis*, **2003**. 90(12): p. 1003-1006.
206. **Collen, A.**, et al., *Influence of fibrin structure on the formation and maintenance of capillary-like tubules by human microvascular endothelial cells*. *Angiogenesis*, **1998**. 2(2): p. 153-166.
207. **Van Hinsbergh, V.W.**, A. Collen, and P. Koolwijk, *Role of fibrin matrix in angiogenesis*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2001**. 936(1): p. 426-437.
208. **Blombäck, B.**, et al., *A two-step fibrinogen–fibrin transition in blood coagulation*. *Nature*, **1978**. 275(5680): p. 501.
209. **Mosesson, M.**, *Fibrinogen and fibrin structure and functions*. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **2005**. 3(8): p. 1894-1904.
210. **Doolittle, R.F.**, *Structural basis of the fibrinogen–fibrin transformation: contributions from X-ray crystallography*. *Blood reviews*, **2003**. 17(1): p. 33-41.
211. **Dvorak, H.F.**, et al., *Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing*. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **1987**. 57(6): p. 673-686.
212. **Odrlijin, T.M.**, et al., *Thrombin cleavage enhances exposure of a heparin binding domain in the N-terminus of the fibrin beta chain*. *Blood*, **1996**. 88(6): p. 2050-2061.
213. **Tamaki, T.** and N. Aoki, *Cross-linking of α 2-plasmin inhibitor and fibronectin to fibrin by fibrin-stabilizing factor*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, **1981**. 661(2): p. 280-286.
214. **Blombäck, B.**, et al., *Fibrin in human plasma: gel architectures governed by rate and nature of fibrinogen activation*. *Thrombosis research*, **1994**. 75(5): p. 521-538.
215. **Weisel, J.W.**, *The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians*. *Biophysical chemistry*, **2004**. 112(2-3): p. 267-276.
216. **Ehrenfest, D.M.D.**, et al., *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*, **2009**. 108(3): p. 341-352.
217. **Qiao, J.**, et al., *The effect of concentrated growth factors in the treatment of periodontal intrabony defects*. *Future science OA*, **2016**. 2(4).
218. **Choukroun, J.**, et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part IV: clinical effects on tissue healing*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, **2006**. 101(3): p. e56-e60.
219. **Aoki, A.**, et al., *Lasers in nonsurgical periodontal therapy*. *Periodontology 2000*, **2004**. 36(1): p. 59-97.

220. **Ishikawa, I., A. Aoki, and A.A. Takasaki**, *Potential applications of Erbium: YAG laser in periodontics*. Journal of periodontal research, **2004**. 39(4): p. 275-285.
221. **Coluzzi, D.J.**, *Fundamentals of dental lasers: science and instruments*. Dental Clinics of North America, **2004**. 48(4): p. 751-70, v.
222. **Wolbarsht, M.L.**, *Laser applications in medicine and biology*. **1971**.
223. **Stern, R.** and R. Sognaes, *LASER EFFECT ON DENTAL HARD TISSUES. A PRELIMINARY REPORT*. Journal-Southern California State Dental Association, **1965**. 33(1): p. 17.
224. **Arsu, H.D.**, *Restoratif diş hekimliği ve endodontide lazer kullanımı*. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, **2009**. 26(2): p. 125-132.
225. **White, J.M.**, H.E. Goodis, and C.L. Rose, *Use of the pulsed Nd: YAG laser for intraoral soft tissue surgery*. Lasers in surgery and medicine, **1991**. 11(5): p. 455-461.
226. **Mester, E.**, et al., *The effect of laser irradiation on the regeneration of muscle fibers (preliminary report)*. Zeitschrift für experimentelle Chirurgie, **1975**. 8(4): p. 258-262.
227. **Mester, E.**, A.F. Mester, and A. Mester, *The biomedical effects of laser application*. Lasers in surgery and medicine, **1985**. 5(1): p. 31-39.
228. **Mester, E.**, et al., *Effect of laser rays on wound healing*. The American Journal of Surgery, **1971**. 122(4): p. 532-535.
229. **Miserendino, L.J.** *The history and development of laser dentistry*. in *Lasers in dentistry*. **1995**. Quintessence Pub.
230. **Karu, T.**, T. Ryabykh, and V. Letokhov, *Different Sensitivity of Cells from Tumor-Bearing Organisms to Continuous-Wave and Pulsed Laser Radiation ($\lambda = 632.8 \text{ nm}$) Evaluated by Chemiluminescence Test: III. Effect of Dark Period **Between Pulses***. **Lasers in the Life Sciences**, **1997**. 7(3): p. 141-156.
231. **Marti, O.**, et al., *Mechanical and thermal effects of laser irradiation on force microscope cantilevers*. Ultramicroscopy, **1992**. 42: p. 345-350.
232. **Lin, F.**, et al., *Lasers, stem cells, and COPD*. Journal of translational medicine, **2010**. 8(1): p. 16.
233. **Huang, Y.-Y.**, et al., *Biphasic dose response in low level light therapy*. Dose-response, **2009**. 7(4): p. dose-response. 09-027. Hamblin.
234. **Perry R. Klokkevold, B.B.**, Kao Richard T., *Lasers in Periodontal and Peri-implant Therapy*, in *Clinical Periodontology*, H.H.T. Micheal G. Newmann, Perry R. Klokkevold, Fermin A. Carranza, Editor. **2019**, Elsevier: Philadelphia, USA. p. 693.
235. **Basford, J.R.**, *Low intensity laser therapy: still not an established clinical tool*. Lasers in surgery and medicine, **1995**. 16(4): p. 331-342.
236. **Prabhu, V.**, et al., *Spectroscopic and histological evaluation of wound healing progression following Low Level Laser Therapy (LLLT)*. Journal of biophotonics, **2012**. 5(2): p. 168-184.
237. **Stadler, I.**, et al., *In vitro effects of low-level laser irradiation at 660 nm on peripheral blood lymphocytes*. Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery, **2000**. 27(3): p. 255-261.

238. **Atabey, A.**, et al., *The effects of the helium neon laser on wound healing in rabbits and on human skin fibroblasts in vitro*. European Journal of Plastic Surgery, **1995**. 18(2-3): p. 99-102.
239. **Conlan, M.J.**, J.W. Rapley, and C.M. Cobb, *Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation A review*. Journal of clinical periodontology, **1996**. 23(5): p. 492-496.
240. **Webb, C.**, M. Dyson, and W. Lewis, *Stimulatory effect of 660 nm low level laser energy on hypertrophic scar-derived fibroblasts: possible mechanisms for increase in cell counts*. Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery, **1998**. 22(5): p. 294-301.
241. **Takahashi, Y.**, et al., *Neovascularization effect with He-Ne laser in the rat trachea*. The Thoracic and cardiovascular surgeon, **1992**. 40(05): p. 288-291.
242. **Yu, W.**, et al., *Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria*. Photochemistry and photobiology, **1997**. 66(6): p. 866-871.
243. **Abergel, R.P.**, et al., *Control of connective tissue metabolism by lasers: recent developments and future prospects*. Journal of the American Academy of Dermatology, **1984**. 11(6): p. 1142-1150.
244. **Terranova, V.P.** and U.M. Wikesjö, *Extracellular matrices and polypeptide growth factors as mediators of functions of cells of the periodontium*. Journal of periodontology, **1987**. 58(6): p. 371-380.
245. **Wahl, S.** and C. Gately, *Modulation of fibroblast growth by a lymphokine of human T cell continuous T cell line origin*. The Journal of Immunology, **1983**. 130(3): p. 1226-1230.
246. **Shields, T.**, et al., *The effect of laser irradiation upon human mononuclear leukocytes in vitro*. Laser Surg Med, **1992**. 4(11).
247. **Tadakuma, T.**, *Possible application of the laser in immunobiology*. The Keio journal of medicine, **1993**. 42(4): p. 180-182.
248. **OLBAN, M.**, et al., *The biostimulatory effect of red laser irradiation on pig blood platelet function*. Cell biology international, **1998**. 22(3): p. 245-248.
249. **Grešner, P.**, C. Watała, and L. Šikurová, *The effect of green laser light irradiation on whole blood platelets*. Journal of photochemistry and photobiology B: biology, **2005**. 79(1): p. 43-50.
250. **Choi, B.K.**, et al., *Prostaglandin E2 is a main mediator in receptor activator of nuclear factor- κ B ligand-dependent osteoclastogenesis induced by Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Treponema socranskii*. Journal of periodontology, **2005**. 76(5): p. 813-820.
251. **Merli, L.A.D.S.**, et al., *Effect of low-intensity laser irradiation on the process of bone repair*. Photomedicine and Laser Therapy, **2005**. 23(2): p. 212-215.
252. **Fávaro-Pípi, E.**, et al., *Low-level laser therapy induces differential expression of osteogenic genes during bone repair in rats*. Photomedicine and laser surgery, **2011**. 29(5): p. 311-317.
253. **Nissan, J.**, et al., *Effect of low intensity laser irradiation on surgically created bony defects in rats*. Journal of oral rehabilitation, **2006**. 33(8): p. 619-924.
254. **García, V.G.**, et al., *Comparison between laser therapy and non-surgical therapy for periodontitis in rats treated with dexamethasone*. Lasers in medical science, **2010**. 25(2): p. 197-206.

255. **Aykol, G.**, et al., *The effect of low-level laser therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment*. Journal of periodontology, **2011**. 82(3): p. 481-488.
256. **AboElsaad, N.S.**, et al., *Effect of soft laser and bioactive glass on bone regeneration in the treatment of infra-bony defects (a clinical study)*. Lasers in medical science, **2009**. 24(3): p. 387-395.
257. **Stein, E.**, et al., *Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells*. Wiener klinische Wochenschrift, **2008**. 120(3-4): p. 112-117.
258. **Grassi, F.**, et al., *Effect of low-level laser irradiation on osteoblast proliferation and bone formation*. Journal of biological regulators and homeostatic agents, **2011**. 25(4): p. 603-614.
259. **Ozcelik, O.**, M. Cenk Haytac, and G. Seydaoglu, *Enamel matrix derivative and low-level laser therapy in the treatment of intra-bony defects: A randomized placebo-controlled clinical trial*. Journal of clinical periodontology, **2008**. 35(2): p. 147-156.
260. **Walsh, L.**, *The current status of low level laser therapy in dentistry, Part 1. Soft tissue applications*. Australian dental journal, **1997**. 42(4): p. 247-254.
261. **Frame, J.**, *A convenient animal model for testing bone substitute materials*. Journal of oral surgery (American Dental Association: 1965), **1980**. 38(3): p. 176-180.
262. **Develioğlu, H.**, *Kritik boyutlu ve kritik boyutlu olmayan defektler*. Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hek. Fak. Derg, **2003**. 6(1): p. 60-63.
263. **Metin, R.**, U. Tatlı, and B. Evlice, *Effects of low-level laser therapy on soft and hard tissue healing after endodontic surgery*. Lasers in medical science, **2018**. 33(8): p. 1699-1706.
264. **Ortopedi, Ö.V.**, *travmatolojide kullanılan deneysel hayvan modelleri (Temel ilkeler, etik unsurlar ve modeller)*. Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi, **2007**. 6(1-2): p. 47-55.
265. **Abrahamsson, I.**, et al., *Bone and soft tissue integration to titanium implants with different surface topography: an experimental study in the dog*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **2001**. 16(3).
266. **Langhoff, J.**, et al., *Comparison of chemically and pharmaceutically modified titanium and zirconia implant surfaces in dentistry: a study in sheep*. International journal of oral and maxillofacial surgery, **2008**. 37(12): p. 1125-1132.
267. **Auer, J.A.**, et al., *Refining animal models in fracture research: seeking consensus in optimising both animal welfare and scientific validity for appropriate biomedical use*. BMC musculoskeletal disorders, **2007**. 8(1): p. 72.
268. **Ravaglioli, A.**, et al., *Mineral evolution of bone*. Biomaterials, **1996**. 17(6): p. 617-622.
269. **Anderson, M.L.**, et al., *Critical size defect in the goat's os ilium: a model to evaluate bone grafts and substitutes*. Clinical Orthopaedics and Related Research®, **1999**. 364: p. 231-239.
270. **Newman, E.**, A. Turner, and J. Wark, *The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models*. Bone, **1995**. 16(4): p. S277-S284.
271. **Eitel, F.**, et al., *Bone regeneration in animals and in man*. Archives of orthopaedic and traumatic surgery, **1981**. 99(1): p. 59-64.
272. **Pobloth, A.-M.**, et al., *Establishment of a preclinical ovine screening model for the investigation of bone tissue engineering strategies in cancellous and cortical bone defects*. BMC musculoskeletal disorders, **2016**. 17(1): p. 111.

273. **Kagel, E.M.**, R.J. Majeska, and T.A. Einhorn, *Effects of diabetes and steroids on fracture healing*. Current opinion in orthopaedics, **1995**. 6(5): p. 7-13.
274. **Geiger, F.**, et al., *Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects*. Journal of Bone and Mineral Research, **2005**. 20(11): p. 2028-2035.
275. **Giannoudis, P.V.**, H. Dinopoulos, and E. Tsiridis, *Bone substitutes: an update*. Injury, **2005**. 36(3): p. S20-S27.
276. **Schmitz, J.P.** and J.O. Hollinger, *The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions*. Clinical orthopaedics and related research, 1986(205): p. 299-308.
277. **Urist, M.R.**, *Bone: formation by autoinduction*. Science, **1965**. 150(3698): p. 893-899.
278. **Huh, J.-Y.**, et al., *Critical size defect in the canine mandible*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, **2005**. 100(3): p. 296-301.
279. **BALOŞ, K.**, et al., *DeneySEL Furkasyon Defektleri ve Furkasyon Patolojisinin Araştırılması*. Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi. 2(1): p. 53-67.
280. **Wikesjö, U.M.**, et al., *Periodontal repair in dogs: healing in experimentally created chronic periodontal defects*. Journal of periodontology, **1991**. 62(4): p. 258-263.
281. **de Lima Taga, M.L.**, et al., *Healing of critical-size cranial defects in guinea pigs using a bovine bone-derived resorbable membrane*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **2008**. 23(3).
282. **Gosain, A.K.**, et al., *Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of TGF- β isoforms*. Plastic and reconstructive surgery, **2000**. 106(2): p. 360-371.
283. **Sanz, M.**, et al., *Guided bone regeneration of non-contained mandibular buccal bone defects using deproteinized bovine bone mineral and a collagen membrane: an experimental in vivo investigation*. Clinical oral implants research, **2017**. 28(11): p. 1466-1476.
284. **Colangelo, P.**, et al., *Bone regeneration guided by resorbable collagen membranes in rabbits: a pilot study*. Implant dentistry, **1993**. 2(2): p. 101-105.
285. **Mayr, H.O.**, et al., *β -Tricalcium phosphate for bone replacement: stability and integration in sheep*. Journal of biomechanics, **2015**. 48(6): p. 1023-1031.
286. **Pobloth, A.M.**, et al., *High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model*. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, **2017**. 11(5): p. 1514-1523.
287. **Kayacan, M.C.**, et al., *Monitoring the osseointegration process in porous Ti6Al4V implants produced by additive manufacturing: an experimental study in sheep*. Journal of applied biomaterials & functional materials, **2018**. 16(2): p. 68-75.
288. **Kulak, C.A.M.** and D.W. Dempster, *Bone histomorphometry: a concise review for endocrinologists and clinicians*. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, **2010**. 54(2): p. 87-98.

289. **Dempster, D.**, et al., *Relationships between bone structure in the iliac crest and bone structure and strength in the lumbar spine*. Osteoporosis International, **1993**. 3(2): p. 90-96.
290. **Dupoirieux, L.**, et al., *Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects*. International journal of oral and maxillofacial surgery, **2001**. 30(1): p. 58-62.
291. **Kämmerer, P.**, et al., *Influence of a collagen membrane and recombinant platelet-derived growth factor on vertical bone augmentation in implant-fixed deproteinized bovine bone–animal pilot study*. Clinical oral implants research, **2013**. 24(11): p. 1222-1230.
292. **Parodi, R.**, et al., *Implant placement in large edentulous ridges expanded by GBR using a bioresorbable collagen membrane*. International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry, 1998. 18(3).
293. **Araújo, M.G.** and J. Lindhe, *Ridge preservation with the use of Bio-Oss® collagen: A 6-month study in the dog*. Clinical oral implants research, **2009**. **20(5): p. 433-440.**
294. **Quteish, D.** and A. Dolby, *The use of irradiated-crosslinked human collagen membrane in guided tissue regeneration*. Journal of clinical periodontology, **1992**. 19(7): p. 476-484.
295. **Chung, K.M.**, et al., *Clinical evaluation of a biodegradable collagen membrane in guided tissue regeneration*. Journal of periodontology, **1990**. 61(12): p. 732-736.
296. **Al-Arrayed, F.**, et al., *Clinical trial of cross-linked human type I collagen as a barrier material in surgical periodontal treatment*. Journal of Clinical Periodontology, **1995**. 22(5): p. 371-379.
297. **Mattson, J.S.**, L.L. McLey, and M.H. Jabro, *Treatment of intrabony defects with collagen membrane barriers. Case reports*. Journal of periodontology, **1995**. 66(7): p. 635-645.
298. **McGinnis, M.**, et al., *Comparison of resorbable and nonresorbable guided bone regeneration materials: a preliminary study*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **1998**. 13(1).
299. **Gutta, R.**, et al., *Barrier membranes used for ridge augmentation: is there an optimal pore size?* Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, **2009**. 67(6): p. 1218-1225.
300. **Wang, R.R.** and A. Fenton, *Titanium for prosthodontic applications: a review of the literature*. Quintessence international, **1996**. 27(6).
301. **von Arx, T.**, N. Hardt, and B. Wallkamm, *The TIME technique: a new method for localized alveolar ridge augmentation prior to placement of dental implants*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **1996**. 11(3).
302. **Monteiro, A.**, et al., *Polyurethane and PTFE membranes for guided bone regeneration: histopathological and ultrastructural evaluation*. Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal, 2010. 15(2): p. e401-6.
303. **Miron, R.J.**, et al., *Platelet-rich fibrin and soft tissue wound healing: a systematic review*. Tissue Engineering Part B: Reviews, **2017**. 23(1): p. 83-99.
304. **Sclafani, A.P.**, et al., *Modulation of wound response and soft tissue ingrowth in synthetic and allogeneic implants with platelet concentrate*. Archives of facial plastic surgery, **2005**. 7(3): p. 163-169.
305. **He, L.**, et al., *A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, **2009**. 108(5): p. 707-713.

306. **Sporn, L.A.**, L.A. Bunce, and C.W. Francis, *Cell proliferation on fibrin: modulation by fibrinopeptide cleavage*. *Blood*, **1995**. 86(5): p. 1802-1810.
307. **Bornstein, M.M.**, et al., *Effect of two bioabsorbable barrier membranes on bone regeneration of standardized defects in calvarial bone: a comparative histomorphometric study in pigs*. *Journal of periodontology*, **2009**. 80(8): p. 1289-1299.
308. **Cirelli, J.A.**, et al., *Evaluation of anionic collagen membranes in the treatment of class II furcation lesions: an histometric analysis in dogs*. *Biomaterials*, **1997**. 18(18): p. 1227-1234.
309. **Thamaraiselvan, M.**, et al., *Comparative clinical evaluation of coronally advanced flap with or without platelet rich fibrin membrane in the treatment of isolated gingival recession*. *Journal of Indian Society of Periodontology*, **2015**. 19(1): p. 66.
310. **Gupta, S.**, et al., *Clinical evaluation and comparison of the efficacy of coronally advanced flap alone and in combination with platelet rich fibrin membrane in the treatment of Miller Class I and II gingival recessions*. *Contemporary clinical dentistry*, **2015**. 6(2): p. 153.
311. **Aroca, S.**, et al., *Clinical evaluation of a modified coronally advanced flap alone or in combination with a platelet-rich fibrin membrane for the treatment of adjacent multiple gingival recessions: A 6-month study*. *Journal of periodontology*, **2009**. 80(2): p. 244-252.
312. **Tunali, M.**, et al., *Clinical evaluation of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of multiple adjacent gingival recession defects: a 12-month study*. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, **2015**. 35(1).
313. **Keceli, H.G.**, et al., *The adjunctive effect of Platelet-Rich Fibrin to Connective Tissue Graft in the treatment of buccal recession defects: results of a randomized, parallel-group controlled trial*. *Journal of periodontology*, **2015**. 86(11): p. 1221-1230.
314. **Eren, G.** and G. Atilla, *Platelet-rich fibrin in the treatment of localized gingival recessions: a split-mouth randomized clinical trial*. *Clinical oral investigations*, **2014**. 18(8): p. 1941-1948.
315. **Jankovic, S.**, et al., *The coronally advanced flap in combination with platelet-rich fibrin (PRF) and enamel matrix derivative in the treatment of gingival recession: a comparative study*. *Eur J Esthet Dent*, **2010**. 5(3).
316. **Jankovic, S.**, et al., *Use of platelet-rich fibrin membrane following treatment of gingival recession: a randomized clinical trial*. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, **2012**. 32(2): p. 165.
317. **Sharma, A.** and A. Pradeep, *Autologous platelet-rich fibrin in the treatment of mandibular degree II furcation defects: A randomized clinical trial*. *Journal of periodontology*, **2011**. 82(10): p. 1396-1403.
318. **Suttapreyasri, S.** and N. Leepong, *Influence of platelet-rich fibrin on alveolar ridge preservation*. *Journal of Craniofacial Surgery*, **2013**. 24(4): p. 1088-1094.
319. **Temmerman, A.**, et al., *The use of leucocyte and platelet-rich fibrin in socket management and ridge preservation: a split-mouth, randomized, controlled clinical trial*. *Journal of clinical periodontology*, **2016**. 43(11): p. 990-999.
320. **Hauser, F.**, et al., *Clinical and histological evaluation of postextraction platelet-rich fibrin socket filling: a prospective randomized controlled study*. *Implant dentistry*, **2013**. 22(3): p. 295-303.

321. **Yelamali, T.** and D. Saikrishna, *Role of platelet rich fibrin and platelet rich plasma in wound healing of extracted third molar sockets: a comparative study.* Journal of maxillofacial and oral surgery, **2015.** 14(2): p. 410-416.
322. **Nelson R. Pinto,** A.T., Ana B. Castro, Simone Cortellini, Wim Teugels, Marc Quirynen, *Leukocyte and Platelet Rich Fibrin: Biologic Properties and Applications,* in *Clinical Periodontology,* H.H.T. Micheal G. Newmann, Perry R. Klokkevold, Fermin A. Carranza, Editor. **2019,** Elsevier: US. p. 669.
323. **Thorat, M., A. Pradeep,** and B. Pallavi, *Clinical effect of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: a controlled clinical trial.* Journal of clinical periodontology, **2011.** 38(10): p. 925-932.
324. **Sharma, A.** and A. Pradeep, *Treatment of 3-wall intrabony defects in patients with chronic periodontitis with autologous platelet-rich fibrin: A randomized controlled clinical trial.* Journal of periodontology, **2011.** 82(12): p. 1705-1712.
325. **Ajwani, H.,** et al., *Comparative evaluation of platelet-rich fibrin biomaterial and open flap debridement in the treatment of two and three wall intrabony defects.* Journal of international oral health: JIOH, **2015.** 7(4): p. 32.
326. **Rosamma Joseph, V.,** G. Sam, and N.V. Amol, *Clinical evaluation of autologous platelet rich fibrin in horizontal alveolar bony defects.* Journal of clinical and diagnostic research: JCDR, **2014.** 8(11): p. ZC43.
327. **Bansal, C.** and V. Bharti, *Evaluation of efficacy of autologous platelet-rich fibrin with demineralized-freeze dried bone allograft in the treatment of periodontal intrabony defects.* Journal of Indian society of periodontology, **2013.** 17(3): p. 361.
328. **Shah, M.,** et al., *Effectiveness of autologous platelet-rich fibrin in the treatment of intra-bony defects: A systematic review and meta-analysis.* Journal of Indian Society of Periodontology, **2014.** 18(6): p. 698.
329. **Mathur, A.,** et al., *Evaluation of intrabony defects treated with platelet-rich fibrin or autogenous bone graft: A comparative analysis.* European journal of dentistry, **2015.** 9(1): p. 100.
330. **Pradeep, A.,** et al., *Comparative evaluation of autologous platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in the treatment of 3-wall intrabony defects in chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial.* Journal of periodontology, **2012.** 83(12): p. 1499-1507.
331. **Ozdemir, H.,** et al., *Effects of platelet rich fibrin alone used with rigid titanium barrier.* Archives of oral biology, **2013.** 58(5): p. 537-544.
332. **Faot, F.,** et al., *The effect of L-PRF membranes on bone healing in rabbit tibiae bone defects: micro-CT and biomarker results.* Scientific reports, **2017.** 7: p. 46452.
333. **Yoon, J.-S.,** S.-H. Lee, and H.-J. Yoon, *The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects.* Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, **2014.** 42(7): p. 1071-1077.
334. **Gassling, V.,** et al., *Platelet-rich fibrin membranes as scaffolds for periosteal tissue engineering.* Clinical oral implants research, **2010.** 21(5): p. 543-549.
335. **Knapen, M.,** et al., *Effect of leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) on bone regeneration: a study in rabbits.* Clinical implant dentistry and related research, **2015.** 17: p. e143-e152.

336. **Pripatnanont, P.**, et al., *The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, **2013**. 41(8): p. e191-e200.
337. **Motta Padilha, W.S.**, et al., *Histologic Evaluation of Leucocyte-and Platelet-Rich Fibrin in the Inflammatory Process and Repair of Noncritical Bone Defects in the Calvaria of Rats*. International Journal of Oral & Maxillofacial Implants, **2018**. 33(6).
338. **Gassling, V.**, et al., *Comparison of platelet rich fibrin and collagen as osteoblast-seeded scaffolds for bone tissue engineering applications*. Clinical oral implants research, **2013**. 24(3): p. 320-328.
339. **Blumenthal, N.M.**, *The use of collagen membranes to guide regeneration of new connective tissue attachment in dogs*. Journal of periodontology, **1988**. 59(12): p. 830-836.
340. **Braccini, F.**, L. Tardivet, and D.E. Dohan, *The relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin (PRF) during middle ear surgery: preliminary results*. Revue de laryngologie-otologie-rhinologie, 2009. 130(3): p. 175-180.
341. **Farivar, S.**, T. Malekshahabi, and R. Shiari, *Biological effects of low level laser therapy*. Journal of lasers in medical sciences, 2014. 5(2): p. 58.
342. **de Oliveira, A.M.**, et al., *Effectiveness and acceleration of bone repair in critical-sized rat calvarial defects using low-level laser therapy*. Lasers in Surgery and Medicine, **2014**. 46(1): p. 61-67.
343. **Kawasaki, K.** and N. Shimizu, *Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats*. Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery, **2000**. 26(3): p. 282-291.
344. **Liu, X.**, et al., *Effect of lower-level laser therapy on rabbit tibial fracture*. Photomedicine and laser surgery, **2007**. 25(6): p. 487-494.
345. **Khadra, M.**, et al., *Effect of laser therapy on attachment, proliferation and differentiation of human osteoblast-like cells cultured on titanium implant material*. Biomaterials, **2005**. 26(17): p. 3503-3509.
346. **KANTARCI, A.**, *Periodontal ve İmplant Çevresi Rejeneratif Tedavilerde Lazer Uygulamaları*. Türkiye Klinikleri Journal of Periodontology-Special Topics, **2016**. 2(2): p. 22-28.

ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında Hatay’da doğdu. İlköğrenimini İnönü İlköğretim Okulu’nda, lise öğrenimini 2008 yılında Osman Ötken Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2013 yılında Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nden mezun oldu. 2016 Şubat ayında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Periodontoloji Anabilim Dalı’nda diş hekimliği uzmanlık öğrenimine başladı. Uzmanlık eğitimi süresince Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde klinik ve akademik faaliyetlerde bulundu.

