



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

**BÜYÜME FAKTÖRLERİNDEN ZENGİN PLAZMA
(PRGF)'NİN, KEMİK REJENERASYONUNDA
KULLANILAN FARKLI GREFT MATERYALLERİNİN
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Metehan KESKİN

Samsun

Kasım-2019



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

**BÜYÜME FAKTÖRLERİNDEN ZENGİN PLAZMA
(PRGF)'NİN, KEMİK REJENERASYONUNDA
KULLANILAN FARKLI GREFT MATERYALLERİNİN
İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK
İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Metehan KESKİN

**Danışman
Doç. Dr. Mehmet Cihan BEREKET**

**Samsun
Kasım-2019**

T.C
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

Dt. Metehan KESKİN tarafından Doç. Dr. Mehmet Cihan BERKET danışmanlığında hazırlanan “Büyüme Faktörlerinden Zengin Plazma (PRGF)’nın, Kemik Rejenerasyonunda Kullanılan Greft Materyallerinin İyileşmesi Üzerine Etkisinin Deneysel olarak İncelenmesi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 07/01/2020 tarihinde yapılan sınav ile Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalında Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Mehtap MUĞLALI
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Nilüfer ÖZKAN
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Mehmet Cihan BERKET
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Nihat AKBULUT
Gaziosmanpaşa Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi



Bu tez, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalınca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

...../...../2019

Prof. Dr. Selim ARICI
Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca teorik bilgi birikimini ve klinik tecrübelerini benimle paylaştan; eğitimim süresince karşılaştığım zorlukları aşmamda, bana yol gösteren; tez yazım sürecinde sabrını ve hoşgörüsünü hiç eksik etmeyen; çok kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Cihan BEREKET'e,

Asistanlığım boyunca desteğini her zaman arkamda hissettiğim, kendisinden teorik, pratik ve akademik anlamda çok şey öğrenme fırsatı bulduğum Sayın Prof. Dr. Nilüfer ÖZKAN'a, klinikte ve ameliyathanede, tecrübelerinden çokça yararlandığım Sayın Prof. Dr. Mehtap MUĞLALI'ya, Sayın Prof. Dr. Emel BULUT'a,

Eğitimim süresince her anlamda bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, bana karşı her zaman anlayışlı ve yardımsever olan Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki hocalarımın hepsine ayrı ayrı,

Tezimin histolojik aşamalarında değerli bilgi ve tecrübelerini aktararak katkı ve yardımlarını eksik etmeyen Doç. Dr. Mehmet Emin ÖNGER'e, çalışmamızın radyolojik kısımlarındaki yardımlarından dolayı Doç. Dr. Ahmet Veysel POLAT'a,

Teorik ve pratik anlamda yorucu olan bu süreci katlanılabilir hale getiren, kıdemli asistandan çok bir abla olarak gördüğüm Dr. Dt. Damla TORUL ve değerli kardeşim Dr. Dt. Hasan Can AKGÜN başta olmak üzere asistan arkadaşlarım Dr. Dt. Eren YILMAZ, Dr. Dt. Cihan BAYLAN, Dt. Fuat ALTUNCU ve Dr. Dt. Anar ABİLOV'a,

Yoğun geçen uzmanlık eğitimim boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, her daim arkamda duran, hayattaki en büyük şansım, eşim Uzm. Dt. Safiye SEYHAN KESKİN'e,

Emeklerinin karşılığını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim; en büyük destekçim annem Fatma KESKİN'e ve ilk öğretmenim, rehberim, babam Metin KESKİN'e,

Sevgili kardeşim Aslıhan KESKİN'e,

Sevgi ve saygı çerçevesinde bir aile olduğumuz Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'nın çalışanlarının her birine, Sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışması; Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından PYO.DIS.1904.18.017 proje numarası ile desteklenmiştir.

ÖZET

BÜYÜME FAKTÖRLERİNDEN ZENGİN PLAZMA (PRGF)'NİN, KEMİK REJENERASYONUNDA KULLANILAN FARKLI GREFT MATERYALLERİNİN İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİNİN DENEYSEL OLARAK İNCELENMESİ

Amaç: Bu tez çalışmasının amacı, greftlerin (otogreft, allogreft, ksenogreft) PRGF ile kombine edilmesinin erken dönemde (4 hafta) kemik iyileşmesi üzerine etkisinin histolojik ve radyolojik olarak araştırılmasıdır.

Materyal ve Metot: Bu çalışmaya 6 aylık 12 adet erkek Yeni Zelanda Tavşanı dahil edildi. Tavşanlar rastgele 2 ana gruba ayrıldı. Kontrol gruplarında farklı defektlere otogreft (KO grubu), allogreft (KA grubu) ve ksenogreft (KK grubu) uygulandı. PRGF gruplarında ise farklı defektlere otogreft + PRGF (PO grubu), allogreft + PRGF (PA grubu) ve ksenogreft + PRGF (PK grubu) uygulandı. Denekler cerrahi operasyondan 28 gün sonra sakrifiye edildi. Defektlerde ki kemik dokusu, bağ dokusu ve yeni damar dokusu miktarları stereolojik olarak, kemik yoğunluğu ise radyolojik olarak değerlendirildi.

Bulgular: Stereolojik incelemeler sonucunda, PRGF kullanılan bütün gruplarda ki kemik miktarı kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulundu ($p=0,00$). PRGF kullanılan gruplarda kontrol gruplarına göre bağ dokusu miktarının daha az, yeni damar dokusu hacminin ise daha fazla olduğu görüldü ($p=0,00$). Radyolojik incelemeler kemik yoğunluğunun yalnızca PA ile KA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğunu ($p<0,05$) diğer gruplar arasında ki farkın ise anlamsız olduğunu ortaya koydu ($p>0,05$).

Sonuçlar: Otogreftlerin, allogreftlerin veya ksenogreftlerin tek başlarına kullanımları ve PRGF ile karıştırılarak kullanımları karşılaştırıldı. Sonuç olarak bu greftlerin PRGF ile karıştırılarak kullanılmasının erken dönemde kemik iyileşmesini artırdığı bulundu.

Anahtar Kelimeler: PRGF; otogreft; allogreft; ksenogreft, tavşan kalvaryası; kritik boyutlu kemik defekti

ABSTRACT

EXPERIMENTAL INVESTIGATION OF THE EFFECT OF PLASMA RICH IN GROWTH FACTORS (PRGF) ON THE HEALING OF DIFFERENT GRAFT MATERIALS USED IN BONE REGENERATION

Aim: The aim of this thesis is to investigate histologically and radiologically the effect of Plasma Rich in Growth Factor (PRGF) mixed with grafts (autograft, allograft and xenograft) on the ossification of critical size defects in rabbit calvaria in the early period (4 weeks).

Materials and Methods: Twelve New Zealand male rabbits (6 months old) were included in this study. Subjects were randomly divided into two groups. Autograft (KO group), allograft (KA group) and xenograft (KK group) were applied to different defects in the control groups. In the PRGF groups, autograft + PRGF (PO group), allograft + PRGF (PA group) and xenograft + PRGF (PK group) were applied to different defects. All subjects were sacrificed 28 days after surgery. The amounts of bone, connective tissue and neoangiogenesis in the defects were evaluated stereologically, and bone density in the defects were evaluated radiologically.

Results: As a result of the stereological examinations of our study, in all groups using PRGF, the amount of bone in the defects was higher than the control groups and the differences between these groups were statistically significant. ($p=0,00$). The amount of connective tissue was lower in PRGF groups than control groups ($p = 0.00$) and the amount of neoangiogenesis was higher in PRGF groups than control groups ($p = 0.00$).

As a result of radiological examinations, bone density was higher in the PRGF group than in the control group. However, this difference was statistically significant only between PA and KA groups ($p < 0.05$). When the other groups were compared, the difference was statistically insignificant ($p > 0.05$).

Conclusions: The use of autografts, allografts or xenografts alone and their use with PRGF were compared. As a result, it was found that mixing these grafts with PRGF increased bone healing.

Keywords: PRGF; autograft; allograft; xenograft; rabbit calvaria; critical size defect

SİMGELER VE KISALTMALAR

%: Yüzde

α : Alfa

β : Beta

γ : Gama

δ : Delta

μm : Mikrometre

cm: Santimetre

dk: Dakika

G: Rölatif Santrifüj Kuvveti (RCF)

HU: Haunsfield Unit

kg: Kilogram

m: Metre

mg: Miligram

ml: Mililitre

mm: Milimetre

mmHg: Milimetreciva

nm: Nanometre

Nm: Newtonmetre

$^{\circ}\text{C}$: Santigrad Derece (Celsius)

rpm: Dakikadaki Devir Sayısı

SS: Standart Sapma

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$: Kalsiyumfosfat

CaCl_2 : Kasiyumklorür

Ha: Hidroksiapatit

TKF: Trikalsiyum Fosfat

BHA: Sığır Kaynaklı Hidroksiapatit

DFDBA: Demineralize Edilip Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allogrefti

DK: Dondurulmuş kemik

FDBA Dondurularak Kurutulmuş Kemik Allogrefti

A-PRF: Geliştirilmiş Trombositten Zengin Fibrin

I-PRF: Enjekte Edilebilir Trombositten Zengin Fibrin

L-PRF: Lökosit ve Trombositten Zengin Fibrin
L-PRP Lökosit ve Trombositten Zengin Plazma
OFG: Otojen Fibrin Yapıştırıcı
PPGF: Büyüme Faktörlerinden Fakir Plazma
PPP: Trombositten Fakir Plazma
P-PRF: Lökositten Fakir Trombositten Zengin Fibrin
P-PRP: Lökositten Fakir Trombositten Zengin Plazma
PRF: Trombositten Zengin Fibrin
PRFM: Trombositten Zengin Fibrin Matriks
PRGF: Büyüme Faktörlerinden Zengin Plazma
PRP: Trombositten Zengin Plazma
T- PRF: Titanyum-Trombositten Zengin Fibrin
Ang: Angiopoetin
BMP: Kemik Morfogenetik Protein
BSP: Kemik Sialoprotein
MCP: Monosit Kemotaktik Protein
OC: Osteokalsin
OPG: Osteoprotegerinin
OPN: Osteopontin
ALP: Alkalenfosfataz
MMP: Matriks Metalloproteinaz
TRAP: Tartrate'e Dirençli Asit Fosfataz
CGF: Konsantre Büyüme Faktörü
CTGF Bağ Dokusu Büyüme Faktörü
EGF Epidermal Büyüme Faktörü
FGF: Fibroblast Büyüme Faktörü
HGF: Hepatosit Büyüme Faktörü
IGF İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IL: İnterlökin
KGF: Keratinosit Büyüme Faktörü
M-CSF Makrofaj Koloni Stimüle Edici Faktör
NGF Sinir Büyüme Faktörü

PDGF: Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü
PF: Trombosit Faktör
PIGF: Plasenta Büyüme Faktörü
PPAR: Adipogenik Transkripsiyon Faktörü
RANK: Reseptör Aktive Eden Nükleer Faktör
Runx2: Osteojenik Transkripsiyon Faktörü
SDF: Stromal Hücre Kaynaklı Faktör
TGF: Transforme Edici Büyüme Faktörü
TNF: Tümör Nekroz Faktörü
VEGF: Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü
CXCR: Kemokin Reseptör
EGFR: EGF Reseptörü
PTH1R: Tip I Paratiroid Reseptörü
RANKL: Reseptör Aktive Eden Nükleer Faktör Ligandı
HSC: Hematopoetik Kök Hücre
MSC: Mezenşimal Kök Hücreler
NK: Doğal öldürücü hücreler
DDH: Dana Hastalığı
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü
KBD: Kritik boyutlu defekt

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT.....	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	viii
İÇİNDEKİLER	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kemik Dokusu	3
2.1.1. Kemığın Makroskobik Yapısı.....	3
2.1.2. Kemığın Mikroskobik Yapısı	8
2.1.3. Kemik İyileşmesi ve Evreleri	14
2.1.4. Kritik Boyutlu Kemik Defekti	19
2.2. Kemik Greftleri	20
2.2.1. Kemik Greftlerinin Diş Hekimliği Alanındaki Kullanım Endikasyonları	20
2.2.2. İdeal Kemik Greft Materyali.....	23
2.2.3. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması.....	24
2.3. Trombosit Konsantreleri	38
2.3.1. Trombositler.....	38
2.3.2. Kandan Elde Edilen Ürünler ve Tarihsel Gelişimleri.....	44
3. MATERYAL VE METOT	56
3.1. Materyal	56
3.1.1. Deney Hayvanları	56
3.1.2. PRGF	56
3.1.3. Greftler.....	57
3.1.4. Deney Gruplarının Oluşturulması.....	57

3.2. Metot	58
3.2.1. Deneyin Uygulanması.....	58
3.2.2. Deneyin Sonlandırılması.....	65
3.2.3. Örneklerin incelenmesi	65
4. BULGULAR	69
4.1. Klinik Bulgular.....	70
4.2. Stereolojik Analiz Bulguları	70
4.2.1. Defekt Bölgesindeki Kemik Dokusu Miktarının Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi	70
4.2.2. Defekt Bölgesindeki Bağ Dokusu Hacminin Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi	73
4.2.3. Defekt Bölgesindeki Damar Dokusu Hacminin Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi	77
4.3. Radyolojik Bulgular	80
5. TARTIŞMA.....	82
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	96
KAYNAKLAR	97
ÖZGEÇMİŞ	124

1. GİRİŞ

Diş hekimliğinde alveolar kemik defektlerinin onarımı, uygulanması planlanan tedavilerin seyri açısından büyük önem arz etmektedir. Çünkü bu defektler planlanan tedaviyi zorlaştırabilmekte, engelleyebilmekte ya da tedaviden sonra bir takım estetik problemlere yol açabilmektedir.

Alveolar defekt onarımında partiküllü kemik greftleri, blok kemik greftleri, distraksiyon osteogenezisi veya kret split uygulamaları gibi, tercih edilebilecek birçok kemik artırma yöntemi bulunmaktadır (1). Bu yöntemler arasında en sık partiküllü kemik greftleri tercih edilmektedir çünkü hasta tarafından iyi tolere edilmektedir, hekim tarafından kolay uygulanmaktadır ve maliyetinin diğerlerine göre daha düşüktür (2).

Sert doku greftlemelerinde doğal ve sentetik kemik greftler kullanılmaktadır. Greft materyali olarak doğal kemikten elde edilen otogreftlerden, allogreftlerden, ksenogreftlerden, alloplastlardan veya bunların kombinasyonlarından sıkça yararlanılmaktadır. Bu greftler arasında otojen kemik grefti altın standart olarak kabul edilmektedir (3-5). Ancak cerrahi sahada ki artış, donör saha morbiditesi ve yeterli greft materyali elde edilememesi birçok vakada otogreftlerin kullanımını sınırlamaktadır. Bu dezavantajlar klinisyenlerin farklı yaklaşımlara ve farklı greft materyallerine yönelmelerine neden olmaktadır.

Otojen kemiklere alternatif olarak allogreftler, alloplastlar ve ksenogreftler gibi kemik greftleme materyalleri kullanılabilir. Ancak bu greft materyallerinin osteoindüktif özelliklerinin sınırlı oluşu, yeni kemik oluşturma hızının düşük oluşu, rezorpsiyon sürelerinin gerekenden kısa ya da uzun oluşu ve yüksek maliyet gibi dezavantajları mevcuttur. Greftlerin bahsedilen dezavantajlarını ortadan kaldırmak için birçok farklı yöntem denenmektedir.

Araştırmacılar son yıllarda rejeneratif yaklaşımlara yönelmektedirler. Rejeneratif materyaller ile greft kombine edilerek greftlerin bu dezavantajlarının aşılması ve elde edilen kemik kazanımının artırılması planlanmaktadır (6, 7). Böylece daha kısa sürede daha kaliteli ve daha az maliyetli tedaviler mümkün hale gelebilmektedir.

Rejeneratif yöntemlerin başında büyüme faktörleri gelmektedir. Büyüme faktörlerinin doku iyileşmesi ve kemik oluşumunda kritik rolleri vardır. Bu faktörler özellikle mezenşimal hücrelerin, osteoblastlara dönüşmesini aktive ederek kemik oluşumunu hızlandırmaktadır (7).

Büyüme faktörleri çoğunlukla trombositlerden salınmakta ve trombositten zengin kan ürünlerinde daha fazla bulunmaktadır (8). Çeşitli yoğunlaştırılmış trombosit ürünleri bulunmaktadır: Özellikle, Büyüme Faktörlerinden Zengin Plazma (PRGF), diğer ürünlere göre daha güvenilir ve daha biyoaktif bir materyal olduğu bildirilmiştir (9).

Bu tekniğin, büyüme faktörlerince zengin olması, beyaz kan hücreleri içermemesi, inflamatuvar mediyatörlerden fakir olması, kısa zamanda hazırlanması ve aktivasyon için sığır tromboplastini gerektirmemesi gibi önemli avantajları bulunmaktadır (10).

Bu doğrultuda projemizin amacı; greftlerin (otogreft, allogreft, ksenogreft) PRGF ile kombine edilmesinin erken dönemde (4 hafta) kemik iyileşmesi üzerine etkisinin histolojik ve radyolojik olarak araştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik vücudun mekanik ve metabolik fonksiyonlarının korunmasında önemli rol oynayan mineralize bir dokudur. Yetişkin bir insanın iskeletinin yapısında ki en büyük pay bu dokuya aittir. Kendine ait hücrelere sahip, sürekli bir yapım-yıkım (remodelasyon) ile dinamizmini sürdüren eşsiz bir dokudur ve yaşamsal fonksiyonlarda çok önemli görevler üstlenmiştir (11). Bunlardan bazıları:

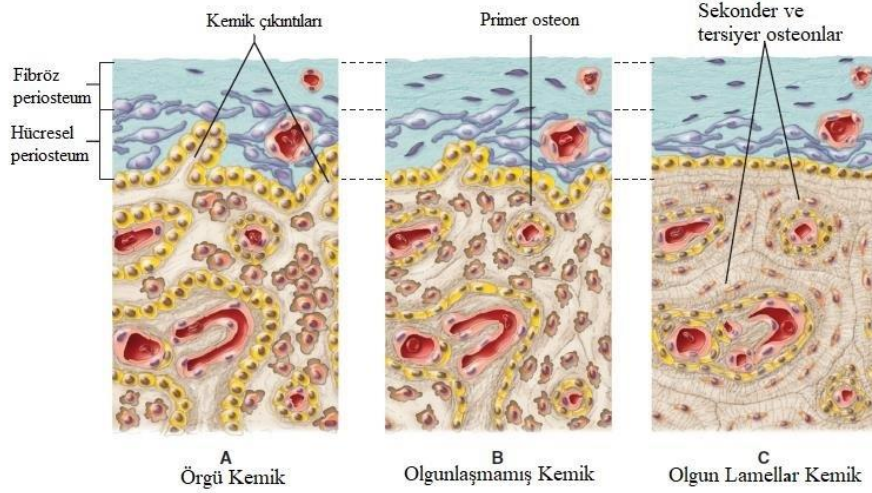
1. Doku ve organlara desteklik sağlar. Dik postürü sağlar.
2. Kaslar ile birlikte harekette rol oynar. Kaslardan aldığı gücü kaldıraç sistemi gibi kullanıp hareketi ya da kuvveti artırır. Hareketin açığa çıkarılmasında ve kısıtlanmasında kilit rol üstlenir.
3. Organ ve dokuların korunmasını sağlar. Beyin ve iç organlar gibi hayati öneme sahip dokuları dış etkilere karşı korur.
4. Barındırdığı kemik iliği ile hematopoeze katkı sağlar.
5. Depoladığı kalsiyum, fosfat ve diğer iyonlarla metabolizma dengesini, iyon dengesini ve pH dengesinin sağlar.
6. İşitme sisteminde ses iletiminde görev alır (12, 13).

Kemikler olgunluk durumuna göre birincil (immatür, örgü, nonlameller) ve ikincil (olgun, lameller) olmak üzere ikiye ayrılır. Örgü kemik normalde olmayıp bazı fizyolojik veya patolojik süreçlerde ortaya çıkar. Lamellar kemik ise “substantia compacta” (kompakt kemik, kortikal kemik) ve “substantia spongiosa” (spongiyöz kemik, süngerimsi kemik) olarak iki tabaka halinde gözlenir (14).

2.1.1. Kemğin Makroskobik Yapısı

Örgü Kemik

Fizyolojik süreçte embriyolojik gelişim sırasında ve kemik iyileşmesi sırasında (dış çekimi soketlerinin iyileşmesi vb.) oluşan kemiktir. Yeni kemik üretiminin olduğu bölgelerde (yassı kemiklerin eklem yüzeyleri ve tendonların kemiklere bağlandıkları bölgeler) de örgü kemik formasyonuna rastlamak mümkündür. Ayrıca patolojik bir durum olan Paget Hastalığı gibi hızlı ve reaktif kemik yapımı görülen hastalıklarda da bu kemik görülür (14).



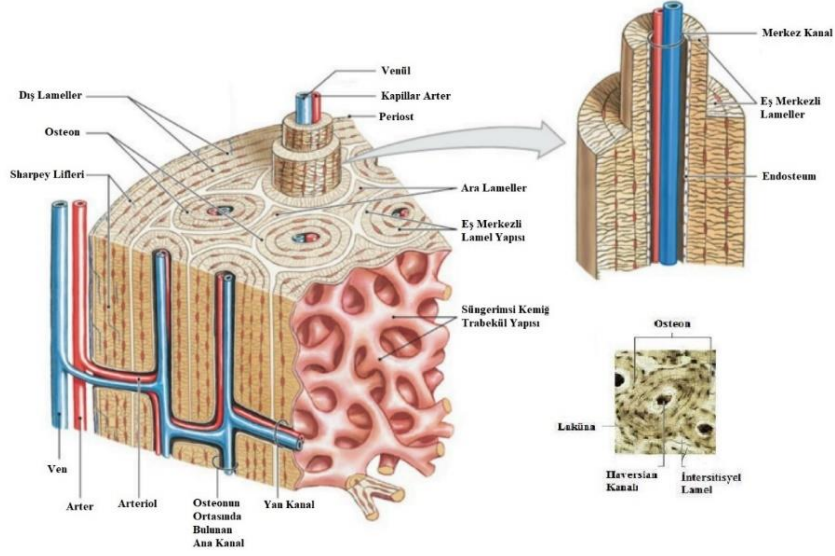
Şekil 1.1 Kemik olgunlaşma evreleri – Yüceer Çetiner⁽¹⁵⁾'den

İçerdiği elemanlar lamellar kemikle aynıdır ancak Tip 1 kollajenlerin dizilimi daha düzensizdir, osteosit yoğunluğu daha fazladır ve mineral içeriği daha düşüktür. Örgü kemik lamellar kemiğe göre metabolik olarak daha aktiftir ancak kuvvetlere daha dirençsizdir (Şekil 1.1) (16).

Lamellar Kemik

Yapısında Havers sistemini (osteon) bulunduran kemiklere lamellar kemik ismi verilir. Olgun bir kemiğin temelini osteonlar oluşturur. Havers sistemi kan damarlarını, lenf damarlarını ve sinir liflerini saran 5-20 eş merkezli lamel ve osteositlerden oluşan karmaşık bir sistemdir. Osteositlerin besin ve oksijen ihtiyacını karşılayan arterler (osteonal arter) hem periosttan gelen arterlerle hem de kemik iliğinden gelen arterlerle anastomoz yapar. Osteonlar çoğunlukla kemiğin uzun aksına paralel şekilde uzanırlar. Havers sistemlerinin arasında kalan alanlarda birbirlerine paralel, çok sayıda ancak belli bir merkezi bulunmayan “intersitisyel (ara) lameller” bulunur. Bu lameller yeni Havers sistemleri oluşurken eski sistemlerin osteoklastlar tarafından kısmen yıkılması sonucu oluşur. Osteonlar arası iletişimi Volkmann kanalları adı verilen transvers kanallar sistemi kurar. Volkmann kanallarının etrafı osteonlar tarafından sarılmaz.

Eş merkezli ve ara lameller dışında, osteoblastların oluşturduğu ve kemiğin enine büyümesini sağlayan iç ve dış dairesel lameller de bulunmaktadır. Dış lameller periostun hemen altında, iç lameller ise kemiğin meduller kısmını çevreleyecek şekilde konumlanmıştır.



Şekil 1.2 Kemığın lamellar yapısı - Grivas⁽¹⁷⁾'tan değiştirilerek

Havers sisteminin bir başka elemanı da osteositlerdir. Osteositler, lameller üzerindeki “laküna” denilen boşluklarda bulunur ve bu lakünalar mikrokanallar aracılığı ile birbirleriyle bağlantılıdır. Osteositlerin salgıladıkları Tip 1 kollajen, kemik lamellerin içinde oldukça düzenli bir şekilde de biriktirilir ve lamellerin fiziksel kuvvetlere karşı dirençli olmasını sağlar (16, 18).

Bir lamellar kemiğin uzun eksenine dik alınan bir kesitte kabaca kemiğin % 80'ini oluşturan yoğun bir dış kortikal tabaka ve içeride trabeküllerden oluşan az yoğun bir iç süngerimsi tabaka gözlenir. Kortikal tabakada osteonlar oldukça düzenli ve kemiğin uzun eksenine paralel sıralanır. Süngerimsi kemikte osteonlar bulunmasına rağmen kortikal kemik kadar organize değildir (Şekil 1.2)(19).

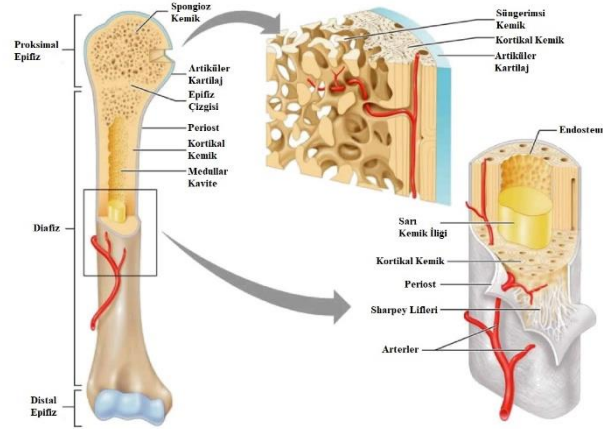
Kortikal (Kompakt) Kemik

Kortikal kemik, kemiklerdeki sert ve sıkı korteks tabakasını (diyafiz tabakasını) oluşturur. Uzun kemiklerde silindir şeklindeki yassı kemiklerde iki tabaka halinde spongioz kemiği örter (örneğin kafa kemiklerinde ki diploe tabakasını örter). Kortikal kemik, dokuya sertlik ve dayanıklılık kazandırır. Temel yapısını Havers sistemi oluşturur. Bu sayede kompakt yapısına rağmen metabolik fonksiyonlarını sürdürür (20).

Süngerimsi (Spongioz) Kemik

Kortikal kemik yüzeylerinin arasında konumlanır. Karmaşık trabeküler yapıdadır. Trabeküllerin arası kemik iliği ile doludur. Boşlukların kemiğe oranı yaklaşık

olarak % 50'dir (kortikal kemikte yaklaşık % 10). Kortikal kemiğe göre daha esnektir ve bu esneklik fazla enerjiyi sönümleme yeteneği sağlar. Yassı kemiklerde iki kortikal tabakanın arasında bulunurken uzun kemiklerde epifiz ve metafiz tabakalarında bulunur. Ayrıca diafiz tabakasının da çok az bir kısmını oluşturur (Şekil 1.3) (19).



Şekil 1.3 Kemik yapılarının makroskobik yapısı – Grivas⁽¹⁷⁾'tan değiştirilerek

Osteogenezis

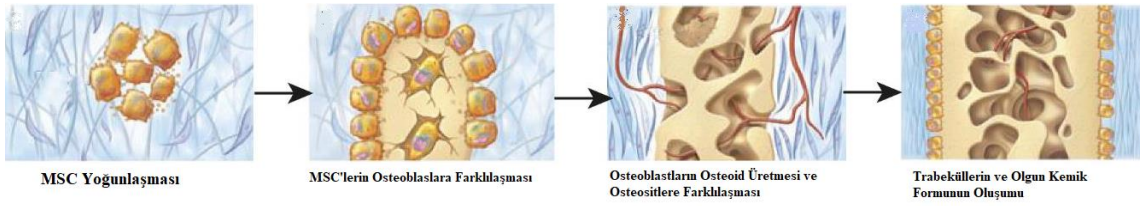
Kemik üretimi “osteoblast” adı verilen kemik doku için özelleşmiş bir tür hücre tarafından gerçekleştirilmektedir. Osteoblastların ürettikleri ilk kemik örgü kemiktir. Daha sonra yeniden organizasyon ile örgü kemik yerini lamellar kemiğe bırakır. Kemiyi üreten hücreler ve ortaya çıkan ürün aynı olsa da kemik üretiminde iki farklı mekanizma vardır (14, 21):

- 1) İntramembranöz (perikondral, direkt) kemikleşme
- 2) Kondral (inderekt) kemikleşme
 - a) Perikondral kemikleşme
 - b) Endokondral kemikleşme

İntramembranöz Kemikleşme

Mezenşimal kök hücre kaynaklı osteoblastların doğrudan kemik dokuyu salgıladıkları yöntemdir. Mezenşimal hücreler belli alanlarda toplanır ve bu alanlarda kanlanma artar. Yoğunlaşma bölgesindeki bazı mezenşimal hücreler kollajen lifleri salgılayarak bir membran oluştururlar. Membranın içinde kalan hücreler, osteoblastlara farklılaşırlar. Böylece osteoblastlar kemiğin temel elemanlarını sentezler ve salgırlar.

Salgılanan bu ilk maddeye “osteoid” ismi verilir. Osteoidler kollajen lifleri ve jelatinöz bir ara maddeden oluşur. Zamanla osteoid üzerine kalsiyum ve fosfor gibi iyonların çökmesi ile matriks daha sert bir hal alır. Bölgesel osteoid oluşumu ve osteoidlerin mineralizasyonu ile "spiküller" (öncül trabeküller) oluşmaya başlar. Kemik olgunlaştıkça mineralize osteoid içerisinde kalan osteoblastlar osteositlere dönüşür. İlk oluştuğunda zayıf bir yapıya sahip olan spiküller üzerinde biriken yeni osteoid ve bu osteoidlerin mineralizasyonu ile trabekülleri meydana getirirler. Bu esnada trabeküllerin arasında kalan mezenşimal doku yerini zamanla hematopoetik dokuya bırakır (Şekil 1.4).



Şekil 1.4 İntramembranöz kemik oluşumunun aşamaları - Papageorgiu⁽²²⁾'dan

Mezenşimal doku içinde gelişen kemiklere, yassı kemikler (frontal parietal, oksipital ve temporal kemik, mandibulanın simfiz ve koronoid çıkıntısı hariç kalan bölgeleri buna örnekler) ve uzun kemik olmasına rağmen klavikula örnek olarak gösterilebilir (23).

Kondral Kemikleşme

Bir kıkırdak taslağın kemik üretimine öncülük ettiği kemikleşme çeşididir. Kendi içinde perikondral ve endokondral kemikleşme olmak üzere ikiye ayrılır.

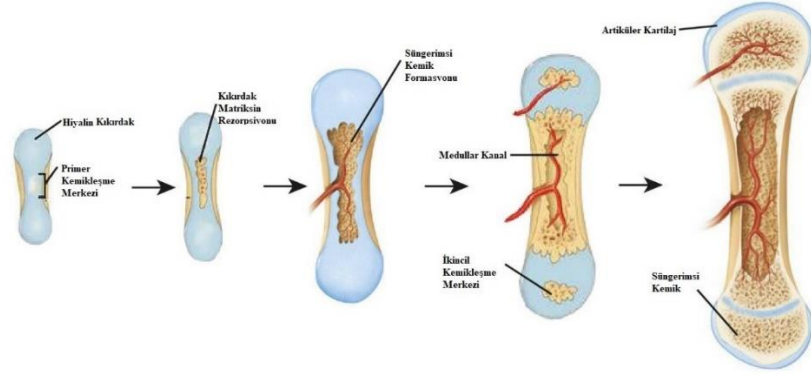
Perikondral Kemikleşme

Kıkırdak dokuyu çevreleyen perikondriumdan köken alan mezenşimal hücrelerin osteoblastlara dönüşmesi sonucu kıkırdak yapının çevresinde intramembranöz tarzda bir matriks ve mineral birikimi olur. Bu yapı organize bir şekilde katman katman birikir. Bu mekanizma ile uzun kemiklerin kalınlaşması sağlanır (24).

Endokondral Kemikleşme

Endokondral kemikleşme, uzun kemiklerin “embriyonik kıkırdaklı model” ile uzunlamasına büyümeye katkıda bulunduğu bir süreçtir. Ekstremitte kemikleri, vertebra ve pelvis kemiği, kafatası kemikleri endokondral kemikleşmeyle oluşan kemiklerdir.

Kıkırdak yıkımı ve kemik yapımının birlikte olması nedeniyle endokondral kemik oluşumu oldukça karmaşıktır (24).



Şekil 1.5 Endokondral kemik oluşumunun aşamaları - Papageorgiu⁽²²⁾'dan

Bağ dokusu veya mezenşimal doku içerisinde, kemikleşmenin gerçekleşeceği alanda, meydana gelecek olan kemiğin şekline benzer küçük bir hyalin kıkırdak taslağı oluşur. Bu taslağın yüzeyinde bulunan mezenşimal hücreler ileride perikondriyumu oluştururlar. Daha sonra hyalin kıkırdak olgunlaşır ve kondrositler çoğalarak orta bölgede hipertrofiye uğrarlar. Ürettikleri ekstraselüler matris daha sonra kan damarları, osteoklastlar, kemik iliği hücreleri ve osteoblastlar tarafından istila edilir (25). Böylece primer kemikleşme merkezini oluşturmaya başlarlar. Kondrositler arasında bulunan hücreler arası madde Alkalin Fosfataz'ın (ALP) ve Osteokalsin'in (OC) etkisiyle mineralize olur. Bu sırada da hipertrofik kondrositlerin apoptozisi gerçekleşmeye başlar. Bölgeye ulaşan osteoprojenitör hücreler osteoblastlara farklılaşarak kemik matrisinin depolanmasını gerçekleştirirler (Şekil 1.5) (24, 26).

2.1.2. Kemiğin Mikroskopik Yapısı

Kemiğin Hücreleri

Kemiğin üretiminden ve yenilenmesinden sorumlu hücreler iki farklı kök hücre grubundan köken alırlar. Bunlar mezenşimal “kök hücre kaynaklı” olan osteoprojenitör hücreler, osteoblastlar, osteositler, kemik astar (örtücü) hücreleri ve “monosit-makrofaj kaynaklı” olan osteoklastlardır(27, 28).

Mezenşimal Kök Hücre Kökenliler

Osteoprojenitör Hücreler

Endosteumun ve periosteumun iç tabakasında bulunurlar. Büyüme ve transkripsiyon faktörlerinin etkisiyle osteoblastlara dönüşerek kemik yapımında rol oynarlar. Yaşamları boyunca çoğalabilme özellikleri vardır. Büyüme ve gelişim sürecinde sürekli aktiftirler. Hayat boyunca kemik örtücü hücreleri olarak kalırlar ve kemik üretimini gerektiren durumlarda yeniden aktifleşirler (29, 30).

Osteoprojenitör hücreler, mezenşimden köken alan, osteojenik hücrelerdir. Kemiğe özel bazı hücrelere farklılaşabilme yetenekleri vardır. Mezenşimal kök hücreler (MSC) kemik iliğinde ve bağ dokusunda bulunabilen multipotent stromal hücrelerdir. Bu hücreler osteoblastlara, kondrositlere ve adiposit hücrelerine farklılaşabilirler. Morfolojik olarak, tek ve büyük bir çekirdeğe sahip, iğ şeklinde, fibroblast benzeri hücreler olarak tanımlanabilirler. MSC'ler, doku zedelenmesi ve/veya iltihaplanma bölgelerine bağlanma özelliğine sahiptirler. Kemik hasarı sırasında salgılanan insülin benzeri büyüme faktörü-1 (IGF1) ve stromal hücre kaynaklı faktör 1 (SDF-1) gibi birçok büyüme faktörleri ve kemokinler MSC'lerin göçünü düzenler. B lenfositler ve doğal öldürücü hücreler (NK) gibi immün hücrelerin çoğalmasını ve olgunlaşmasını potansiyel olarak uyarabilir ya da inhibe edebilirler. Kemik iyileşmesi sırasında, MSC'ler kallus oluşumunu uyararak için kondroblastlara ve osteoblastlara farklılaşabilirler. Kemik dokusundaki MSC farklılaşması, birtakım molekül ve hücre içi sinyal yolu ile düzenlenir. MSC'lerde Wnt / β -katenin sinyalinin aktivasyonu, Adipogenik Transkripsiyon Faktörü'nü (PPAR- γ) baskılar ve osteoblast farklılaşması için gereken bir transkripsiyon faktörü olan Runx2'yi uyarır. Pro-osteojenik büyüme faktörleri, MSC'lerin osteokondral hücrelere farklılaşmasını düzenleyen sinyal yollarını (örneğin, MAPK, p38 ve SMAD yollarını) da uyarır (31-33).

Osteoblastlar

Osteoblastlar, mezenşim kökenli osteoprojenitör hücrelerin farklılaşmasıyla oluşurlar. Tek çekirdekli, metabolik olarak aktif, kemiğin büyüyen yüzeylerini kaplayan hücrelerdir. Kemik matriksinin sentezlenmesi, düzenlenmesi ve mineralizasyonundan sorumludurlar. Aynı zamanda mekanoreseptör olarak görev alırlar. Kan-kalsiyum dengesinin sağlanmasında önemli bir yere sahiptirler (29, 34, 35). Aktiviteleri azalmaya

başladıktan sonra bir bölümü osteositlere dönüşürken, diğerleri endosteal ve periosteal yüzeylerdeki örtücü (astar) hücrelere dönüşürler (36).

Osteoblastlar, kemik yüzeyinin büyük bir bölümünü kaplayan küboidal hücrelerdir (37). Tamamen farklılaşmış osteoblast, protein üreten hücrelerin (örneğin, büyük çekirdek ve salgı organel ve granüllerinde zengin olan sitoplazma gibi) tüm özelliklerini sergiler (38). Osteoblastlar kemik oluşumunun erken evresinde mineralize olmamış matriks (osteoid) biriktirir. Osteoblastlar tarafından üretilen kemik matriksi, kollajen proteini esas olarak kollajen tip I ve osteopontin (OPN), kemik sialoprotein (BSP), OC dâhil olmak üzere kollajen olmayan proteinlerden oluşur (39). Bu osteoid doku, kemik apatitin nükleasyonu ve büyümesi ile aşamalı olarak mineralleşir. Osteoblastların ürettiği ALP kemik mineralizasyon sürecinin düzenlenmesinde büyük rol oynar (40). Osteoblastlar ayrıca tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α), reseptör aktive eden nükleer faktör kappa-B (RANKL) ligandının (RANKL) ve osteoprotegerinin (OPG) reseptör aktivatörü gibi osteoklastların oluşumunda rol oynayan çeşitli sitokinleri de üretebilir (41). Osteoblastların kemik üreten hücreler olarak rolü kemiğe gömüldükten ve osteositler haline geldikten sonra tamamlanır. Ayrıca osteoblastlar inaktif hale gelebilir ve düz bir morfolojiye sahip olan ve kemiğin yüzeyini kaplayan kemik astar hücrelerine dönüşebilirler (39).

Osteositler

Osteositler yıldızimsı hücrelerdir ve tüm kemik hücrelerinin % 95'inden fazlasını oluşturduğu için memeli kemiklerinin ana hücresel bileşeni olarak kabul edilirler (38). Osteoblast kemiğe gömülerek bir osteosit haline geldiğinde, hücresel morfolojilerinde değişiklik, hücre içi organellerde azalma ve hücre büyüklüğünde azalma gibi önemli değişiklikler meydana gelir. Osteositler kemik dokusunda “laküna” adı verilen boşluklarda bulunurlar ve “kanalikül” adı verilen küçük kanallardan geçen sitoplazmik uzantıları sayesinde birbirleriyle iletişim kurarlar. Moleküler seviyede, osteoblastların osteositlere farklılaşmasında, ALP, BSP, OC, tip I kollajen ve Runx2 gibi birkaç molekülün daha düşük üretimi rol oynar (42). Osteositler iskeletin mekanik yüklenmesine adaptif tepkileri kontrol etmek için mekanik sensörler gibi davranırlar. Çeşitli uyarılara cevap verebilir ve iskelet hemostazını düzenleyebilirler. Osteositlerin kemiğin tamir ihtiyacını hissedebildiği düşünülmektedir (43). Osteositler uzun ömürlüdür; ancak ölümsüz hücreler değildir ve apoptozis ile ölürlür. Kemik mikro hasarına cevap olarak

osteositlerin apoptozisinin kemiğin yeniden şekillenme sürecini başlattığı ve artırdığı öngörülmüştür (44).

Kemik Astar (Örtücü) Hücreleri

Kemikler üretim ya da rezorpsiyon fazında değilse, kemik yüzeyi kemik astar (örtücü) hücreleri olarak adlandırılan yassı ve uzun hücre katmanları ile tamamen kaplanır. Organeller açısından fakirdirler. Organel içeriğinden de anlaşılacağı üzere çok az aktivite işareti gösterirler. Farklılaşmış osteoblastlar olarak kabul edilirler. Kemik yüzeyini kaplayarak, osteoklastların rezorptif aktivitelerinden kemiği korurlar. Osteoblast oluşturmak için tekrar aktif hale getirilebilirler (45).

Monosit-makrofaj Kökenli Hücreler

Monositler, kanda dolaşan ve insan vücudundaki tüm lökositlerin yaklaşık % 3-7'sini oluşturan fagositik hücrelerdir (46). Normal koşullarda, monositler, bağ dokuya göç edebilirler (47). İnflamatuar sinyallere cevap olarak monositler, travma veya enfeksiyon bölgelerine hızla göç eder ve makrofajlara farklılaşırlar (48). Çeşitli inflamatuvar mediyatörleri salgırlar ve mikroorganizmaları veya yabancı partikülleri fagosit ederler. Kemik iyileşmesi sırasında makrofajlar sadece iltihaplanma evresinde değil, kemik oluşumu ve yeniden şekillenmesinde de rol oynarlar (49). Monositler ya da makrofajlar hücreleri sadece osteoklastlara değil, çok çekirdekli hücreler ve biyomateryal implantasyonuna cevap olarak yabancı cisim dev hücreleri gibi diğer fenotiplere de farklılaşabilirler (50). Her ne kadar monositlerin aktiviteleri, immün yanıt ve inflamasyon ile yakından ilişkili olsa da, materyal-doku entegrasyonunda önemli bir rol oynadıklarına inanılmaktadır (51, 52).

Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik iliğinde bulunan myeloid hematopoetik hücrelerin füzyonuyla ortaya çıkan çok çekirdekli hücrelerdir. Osteoklast öncülleri, kemik dokusu veya dolaşımdaki monositlerdir (53). Osteoklastlar, yüksek konsantrasyondaki asit fosfatazlarla dolu vezikül ve lizozomlardan dolayı homojen, “köpük” görünümlü bir sitoplazma ile karakterizedirler (54). Osteoklastların aktivitesine bağlı olarak oluşan asidik ortam nedeniyle mineralize matriksin çözünmesi sonucunda “Howship lakünaları” oluşur. Kalan organik bileşenler, kollajenolitik enzimlerin (özellikle katepsin K) toplanmasıyla çözünür (55). Tartrate'e dirençli asit fosfataz (TRAP), osteoklastlar

tarafından üretilir ve kemiğin rezorpsiyon sürecine dahil edilir. Bazı kemokinler, kemik iyileşme bölgelerinde osteoklast öncüllerinin toplanması, çoğalması ve farklılaşmasını düzenler. Monosit kemotaktik protein 1 (MCP-1) ve stromal hücre türevli faktör 1 (CXCL12 / SDF-1), osteoklast öncüllerinin kan dolaşımından kemiğe veya bir kemik iyileşme bölgesi içerisine geçişini kontrol etmede önemli moleküller olarak kabul edilirler (56-58). Makrofaj koloni stimüle edici faktör (M-CSF) ve osteoblastlar tarafından eksprese edilen RANKL, osteoklast farklılaşması ve aktivitesinde anahtar rol oynar. RANKL-RANK etkileşimi yoluyla osteoprojenitörlerle, osteoklast öncülleri arasındaki iletişimin, olgun osteoklast oluşumunu uyardığı düşünülmektedir. Bu etkileşim, osteoblast tarafından üretilen bir başka sitokin olan OPG ile engellenebilir (30). Ayrıca, TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinler kemik remodelingi sırasında osteoklastogenez için önemli araçlardır (59, 60).

Kemiğin Organik ve İnorganik Matrisi

Kemik matrisi organik ve inorganik bileşenlerden oluşan kompozit bir yapıdır. Organik matris, ıslak kemik ağırlığının ~% 20'sini oluşturur ve temel olarak kollajenden oluşur. Kollajen, kemik matrisinin ana yapısal bileşenidir; buradaki çoğunluk Tip I kollajendir (~% 90) ve daha az miktarda kollajen Tip III, V, X ve XII bulunur (14). Kollajen, ~1000 aminoasitten oluşan, üç boyutlu bir yapıya sahip ve uzunluğu ~300nm olan lifli bir proteindir. Bir kollajen fibrili, iki $\alpha 1$ ve bir $\alpha 2$ polipeptid zincirinden oluşan ve osteoblastlar tarafından sentezlenen prokollajenden oluşan üçlü sarmal şeklindedir (61, 62). Prokollajen molekülleri osteoblastlardan salgılandıklarında tekli yapılardır, daha sonra kollajen fibrilleri oluşturmak için spontan olarak birleşirler (63, 64).

Kollajen kemiğe esneklik verirken, kollajen ağına mineral ilavesi kemiğe sertlik sağlar. Kemik dokunun mineral bileşeni eksik olursa kemiğin esnekliği artar. Tersine, kollajen bileşeni eksik olursa kemiğin kırılabilirliği artar. Bu durum, kemiğe kollajen ve mineralin miktarını ve dağılımını değiştirerek, esneklik ve sertlik gereksinimlerini dengeleme kabiliyetini sağlar (65). Yaşlanma veya osteogenezis imperfekta (66) gibi genetik anormalliklerden kaynaklanan kollajen yapısındaki değişiklikler, kemik dokusunun yapısal bütünlüğünü tehlikeye atabilir ve daha zayıf bir yapıya neden olur. Bu durum kırılmaya karşı normalden daha fazla yatkınlık gösterir (63, 67).

Kollajene ek olarak, organik matriksin % 10'u fibronektin, OPN, osteokalsin ve BSP gibi kollajen olmayan proteinlerden dekrin ve biglikan gibi proteoglikanlardan oluşur. BSP ve osteopontin, kemik matriksinde bulunan kollajen olmayan proteinlerin çoğunu oluşturur. Kollajen olmayan proteinler ve proteoglikanlar, organik matriksin toplam kütesine az miktarda katkıda bulunurken, osteoblast farklılaşması, doku mineralizasyonu, hücre adezyonu ve kemik yeniden şekillenmesi sırasında önemli fonksiyonlara hizmet ederler (64).

İnorganik matriks, kemiğin ıslak ağırlığının yaklaşık % 65-70'ine katkıda bulunur ve toplam vücut kalsiyumunun yaklaşık % 99'unu, fosforun yaklaşık % 85'ini ve vücut sodyumunun ve magnezyumunun % 40-60'ını depolayan bir iyon rezervuarı görevi görür. Bu iyonlar kollajen liflerini çevreleyen kristal yapıları oluşturur ve kemiğe sertlik kazandırır. Kemik kristallerinin boyutu ~200Å'dur ve iskelette bulunan temel mineral olan kalsiyum, hidroksiapatit $[Ca_{10}PO_4OH_2]$ formundadır. Hidroksiapatit kristalleri hem yüzeyde bulunabilir hem de kollajen fibrillerinin aralarına nüfuz edebilir (64, 68, 69).

Kemiğin Zarları (Periosteum ve Endosteum)

Kemiğin dış ve iç yüzeyleri sırasıyla periosteum ve endosteum denilen özel bağ dokusu ile kaplıdır. Periosteum, kortikal kemik ile kortikal kemiğe komşu yumuşak doku veya kas doku arasında ayırıcı bir tabaka görevi görür. Eklem yüzeyleri, tendon bağlanma yerleri ve sesamoid kemiklerinin yüzeyleri hariç, tüm kemiklerin dış yüzeylerini kaplar (70, 71).

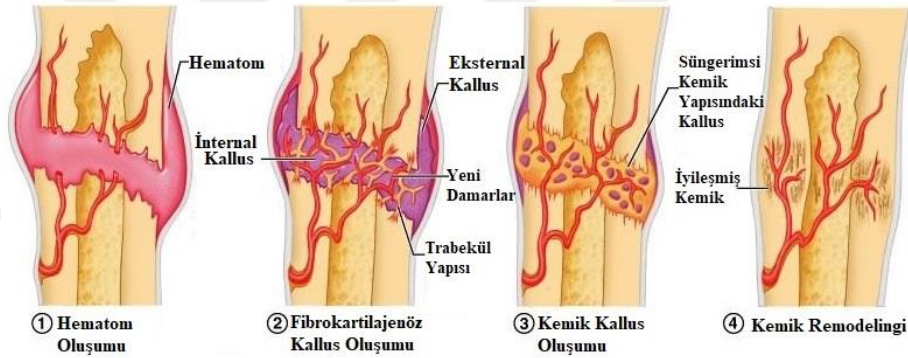
Periosteum iki ayrı katmana ayrılabilir. Dıştaki "fibröz" katman, belirgin bir sinir ve mikrovasküler ağın yanı sıra fibroblastları, kolajen fibrilleri ve elastin lifleri içermektedir (71, 72). İç "cambium" veya "hücresele" katman kemik yüzeyi ile doğrudan temas halindedir. Bu tabaka osteoblastlara ve kondrositlere farklılaşabilen MSC'leri, farklılaşmış osteoprogenitör hücreleri, fibroblastları, mikrodamarları ve sempatik sinirleri liflerini içerir. İçinde MSC'leri ve osteoprogenitör hücreleri bulunduran cambium tabakası, doku mühendisliği alanı için ilaç tedavileri ve kök hücre elde edilmesinde önemli bir alan haline getirmiştir (73-76).

Bir kemiğin iç yüzeyi meduller kanala bakar ve endosteum adı verilen membranöz bir kılıf ile kaplıdır. Endosteum, kemik iliğini içine almak için endokortikal ve trabeküler kemik yüzeyleri üzerinde kemik astar hücreleri (olgun osteoblastlar) ve osteoblastlardan oluşan ince bir zar ile kaplıdır (77). Ayrıca endosteumda aktif kemik

rezorpsiyon bölgelerinde osteoklastlar bulunabilir. Endosteum osteoprojenitör hücreler içermesine rağmen, MSC veya hematopoetik kök hücreler (HSC'ler) içermez. Bununla birlikte, endosteumun içindeki hücrelerin doğrudan veya dolaylı olarak multipotent HSC'leri destekleyebilir ve/veya etkileyebilir (78).

2.1.3. Kemik İyileşmesi ve Evreleri

Kemik iyileşmesi, farklı hücre tiplerinin (örneğin hematopoetik hücreler, immün hücreler, vasküler ve iskelet hücre öncülleri) ve proteinlerin yanı sıra, fonksiyonunun ve yapısal bütünlüğünün yeniden oluşturulması için çalışan çeşitli genlerin, arasındaki etkileşimleri içeren karmaşık ve iyi düzenlenmiş bir süreçtir. İyileşme sürecinde hücre göçü, çoğalması, farklılaşması, ve hücre dışı proteinlerin sentezi gibi birçok hücrel olay yaşanmaktadır. İki tip kemik iyileşmesi vardır: birincil veya doğrudan ve ikincil veya dolaylı iyileşme (Şekil 1.6) (79).



Şekil 1.6 Kemik onarımı - Grivas⁽¹⁷⁾'tan değiştirilerek

Primer İyileşme

Primer iyileşme, kemik uçlarının anatomik olarak boşluklar olmadan uç uca teması ve mutlak mekanik stabilite koşuluyla, yani optimum koşullar altında, gerçekleşir. Bu iyileşme tipinde, kallus oluşumu ve inflamatuvar aşama olmadan doğrudan iyileşme gerçekleşir. Primer iyileşme temas ve boşluk iyileşmesi olarak ikiye ayrılabilir (80).

Primer temasta iyileşen kırık kemik uçları tam temas halindedir ve tam stabildir. Osteoklastlar kırılma bölgesine göç eder eder ve kemiği rezorbe eder. Kırılma bölgesi uzun eksenli boyunca 50-80 µm / gün oranında konik çatlaklar oluşur. Bu çatlaklar, boyunca yeni damarlar oluşur ve bu damarlardan mezenşimal kök hücreleri bölgeye göç

eder. Son olarak kırık hattı boyunca osteonlar yenilenir, böylece kırılan kemik uçlarını birleştirir (81).

Primer boşluk iyileşmesi, kırık uçlar arasında küçük boşluklar (150-200 um) mevcut olduğunda meydana gelir. İlk olarak, boşluklar, kırılma uçlarını köprüler şeklinde birleştiren ossifiye doku ile doldurulur. Oluşan lameller, kortikal kemikte olduğu gibi kemiğin uzun eksenine paralel olarak düzenlenmemiştir. İkinci aşamada, tabakalar kemiğin uzun eksenini boyunca yeniden şekillendirilir (79).

Sekonder İyileşme

Kemik kırıklarının konservatif veya cerrahi tedavisinin çoğu vakasında, stabilizasyon primer kemik iyileşmesine izin vermek için yeterli değildir ve bu nedenle sekonder iyileşme gerçekleşir. Kemik iyileşmesi devamlı bir süreçtir, ancak üç aşamada (iltihaplanma, kemik oluşumu ve yeniden şekillenme) incelenebilir (82).

İnflamasyon (Yangı) Evresi

Bir kırılma meydana geldiğinde lokal kan akımı kesilir ve kırık alanındaki hücrelerin ölümü ile sonuçlanır. Bunu 1-2 gün süren aseptik bir inflamatuvar yanıt izler. Kemik hasarı ile birlikte damarlar, kemik matriksi ve çevresindeki yumuşak dokular hasar görür. Vasküler endotel hasar ile kan, damar dışına çıkar ve trombosit agregasyonu sonucu kan pıhtısı (hematom) oluşur. Hematom, hücresel göç için yollar sağlayan fibrin bir ağıdır. Bu ağ içindeki trombositler ve inflamatuvar hücreler, hücre göçü, çoğalması ve farklılaşması, doku matriks proteinlerinin sentezi ve sentezlenen proteinlerin bir doku matriksi oluşturacak şekilde düzenlenmesi gibi kemik iyileşmesinin erken hücresel olaylarını düzenleyen farklı büyüme faktörlerini ve sitokinleri üretir. İnflamasyon evresinde TGF- β , IL-1,-6, M-CSF gibi ve MSC göçünde PDGF-BB, TNF- α , SDF-1, BMP-2, -4, -5, -6 gibi mediyatörler rol oynar (Şekil 1.7) (22).

PMN'ler, doku makrofajları ve kan monositlerini içeren inflamatuvar hücreler, yaralanma bölgesine en erken gelen hücreler arasındadır. Ve bu hücreler IL-1, IL-6, TNF- α , MCP-1 ve SDF-1 gibi antiinflamatuvar sitokinler ve kemokinler salgırlar. Bu faktörler, ekstra inflamatuvar hücrelerin, fibroblastların ve MSC'lerin göçünü teşvik eder. MSC'lerin iyileşme bölgesine göç etmesi ve toplanması kemik rejenerasyonunun erken evrelerinde meydana gelen önemli olaylardandır. SDF-1 ve SDF-1 reseptörü kemokin reseptör tip 4 (CXCR4), MSC göçünde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. SDF-

l'in salınımı, hematomdaki hipoksik durumlarda uyarılır. Ayrıca hipoksi nedeniyle fibroblastlar ve endotel hücreleri, yeni kan damarlarının oluşumunu indüklemek için VEGF gibi anjiyojenik faktörleri salgırlar. VEGF sadece anjiyojenik bir faktör olarak kabul edilmez, aynı zamanda inflamatuvar hücreler için güçlü bir kemotaktik uyarıcı, MSC'lerin ve osteoblastların göçü ve çoğalması için önemli bir aktivatör olarak da işlev görür. Ayrıca pro-osteojenik, transforme edici büyüme faktörü (TGF) ailesi ve BMP'ler de iyileşmenin erken evresinde üretilir ve MSC'lerin fibroblastlara ve osteojenik hücrelere farklılaşmasında önemli bir rol oynar (83, 84). İyileşmenin ilk günleri boyunca, fibroblastlar granülasyon dokusunu oluşturmak için kollajen üretirler, oluşturulan granülasyon dokusu bağışıklık sistemi hücrelerini, hücre dışı matriksi oluşturan hücreleri ve kan damarlarının oluşumu ile bağlantılı çeşitli hücre tiplerini destekler.

Formasyon (Onarım) Evresi

Kemik onarımı, biyofiziksel ortama bağlı olan farklı spesifik mekanizmalarla gerçekleşebilir. Kemik oluşumu intramembranöz ve endokondral kemikleşme süreçlerinde ayrıca iyileşmenin onarıcı aşamasında gerçekleşir (85). İnamembranöz kemikleşme, kemik oluşumu, kırıkta kallus oluşmadan, doğrudan gerçekleşir. MSC'ler, osteoid doku oluşumu için osteoblastlara farklılaştıkları bir kemikleşme merkezi oluşturmak üzere kılcak kan damarı ağı etrafında çoğalır ve yoğunlaşır (86). Öte yandan, endokondral kemikleşme, bölgeler arası boşluk ve mobilite ortamında gerçekleşir. Kırıkta matriksi üretmek için MSC'ler kondroblastlara farklılaşırlar. Kondroblastlar sayıca çoğalırlar ve yoğunlaşırlar. Böylece kırıkta kallus şablonunu oluşturmak için kırıkta matriksi salgılamaya başlarlar (86, 87). Kondroblastlar, kendi matrikslerine gömüldükten sonra kondrosit halini alırlar ve kırıkta matriksi kalsifiye eden hipertrofik kondrositleri oluştururlar (88, 89). Matriks kalsifikasyonundan sonra, hipertrofik kondrositler apoptoz geçirirler ve kan damarları bölgeye nüfuz eder. Kan damarlarının bölgeye taşıdığı osteoprojenitör hücreler kırıkta matriksinin trabeküler kemik ile yer değiştirmesini sağlarlar (88).

Kemik yaralanmasından sonra iyileşme tipini, defektin büyüklüğü, alanın stabilitesi, kanlanma ve oksijen miktarı gibi çeşitli faktörler etkiler. Örneğin, endokondral kemik oluşumu, kemik kırığı iyileşmesinde ana kemik onarım şeklidir (90). Öte yandan, silindirik bir kemik defekti oluşturma durumunda meydana gelen (matkap deliği, punch defekti) kemik yaralanmasında intramembranöz ossifikasyonla kemik oluşumu görülür.

Bu iyileşme tipleri süreci destekleyen hücelere, moleküler sinyallere, iyileşme alanındaki sitokinlere ve büyüme faktörlerine bağlı olarak değişir (91).

Kemik üretiminin yumuşak kallus oluşumu aşamasında Ang-1, -2, FGF-2, VEGF-A, PIGF-A, PDGF'ler ve BMP'ler anjiyogenezisi düzenler, TGF- β 'lar, IGF-1, PDGF-BB, FGF, GDF-5 ve BMPs ise kondrogenesis ve matriks üretiminde görev alır. Kallusun mineralizasyonu ve rezorpsiyonu aşamasında VEGF'ler anjiyogeneziste, M-CSF RANKL OPG, TNF- α kırıkta kallus rezorpsiyonunda, BMP'ler ve Wnt ligandlar MSC'lerin farklılaşmasında ve kırıkta ile kemiğin yer değiştirmesinde rol alır (Şekil 1.7) (22).

Kemik Yapımı Sırasında Osteoprojenitör Hücrelerin Farklılaşması

Kemik oluşumuna katkıda bulunan MSC'lerin potansiyel kaynakları periosteum, kemik iliği ve kan dolaşımıdır (92). MSC'lerin kondrosit/osteoblast hücrelerine farklılaşması için uyarılması, esas olarak BMP'ler, TGF- β ve TGF- α süper aile molekülleri tarafından düzenlenir. Bu moleküller farklı hücre tipleri tarafından üretilir ve progenitör hücrelerde serin/treonin kinaz membran reseptörleri üzerinde etki eder. Bu reseptörlerin aktivasyonu, çekirdekteki gen ekspresyonunu uyararak hücre içi sinyal yollarını tetikler (93). BMP'ler, kemotaksis, mezenşimal hücre çoğalması, farklılaşması ve hücre dışı matriksin kontrollü sentezi de dahil olmak üzere, kondro-osteogenez için sıralı bir olaylar dizisini indükler. BMP'lerin düzenleyici etkisi, hedeflenen hücrenin tipine, farklılaşma aşamasına, ligandın lokal konsantrasyonuna ve diğer dolaşımdaki faktörlerle etkileşimine bağlıdır. 14 tip BMP arasında, MSC'lerden osteoblast farklılaşmasını en güçlü uyarıcılar BMP-2, -6 ve -9 gösterilmektedir (94). Ayrıca, TGF- β , MSC'lerin göçünü teşvik eder ve osteojenik hücelere farklılaşmalarını ve çoğalmalarını destekler. Aslında, hem TGF- β hem BMP'ler MSC'ler üzerindeki reseptörleri ile bağlanır ve osteojenik genlerin ekspresyonunu tetikleyen osteojenik transkripsiyon faktörünü (Runx2) aktive eder (95).

SMAD ve p38 MAPK yolları gibi osteoprojenitör hücrelerin farklılaşmasında çeşitli hücre içi yollar bulunur (33). Wnt sinyali aynı zamanda MSC'lerin osteojenik farklılaşması için önemli bir düzenleyici yoldur. Wnt sinyal yolunun aktivasyonu, MSC'lerin osteokondral hücelere farklılaşmasını sağlar, ek olarak adipogenik farklılaşmayı da engeller. Ayrıca, Runx2'nin varlığı ile yüksek düzeyde Wnt sinyali oluşur, böylece osteoblastogenezini teşvik eder (96). MSC'lerin osteojenik farklılaşması,

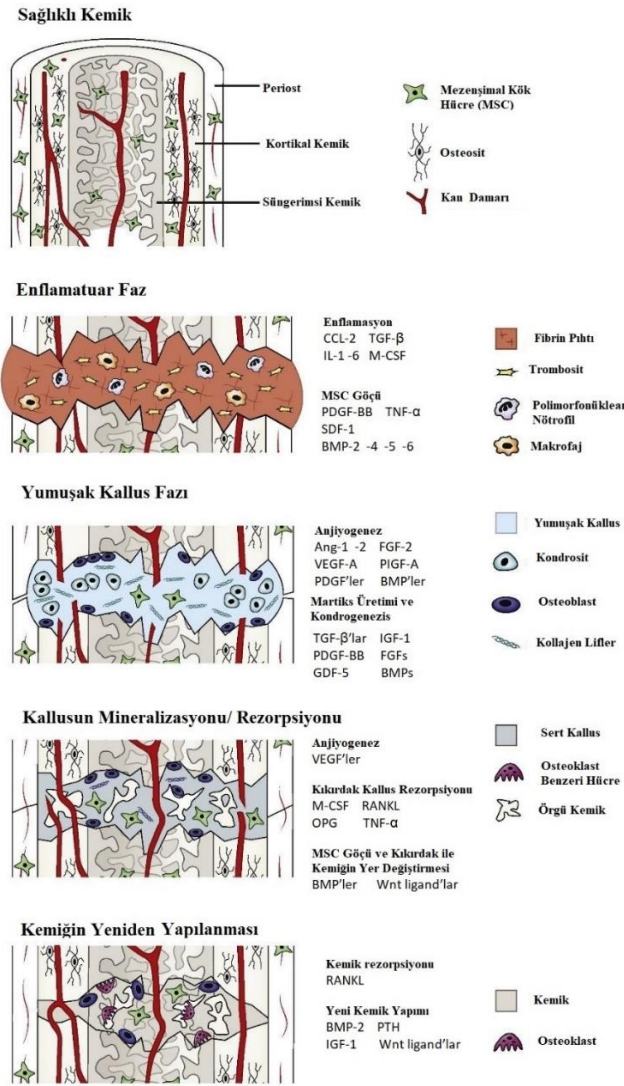
genellikle osteoblast fenotipinin en erken belirteçleri olan ALP ve kollajen Tip I'in yüksek ekspresyonu ile ilişkilidir. ALP, Tip I kollajen ve Tip I paratiroid reseptörü (PTH1R) osteoblastlar olgunlaştıkça yükselen erken belirteçlerdir, ancak osteoblastlar osteositler haline geldikçe azalır (97). Ayrıca, mineralize osteoid ile ilişkili proliferatif olgun osteoblastlarda, OC yüksek düzeyde regüle edilir ve bu nedenle osteoblastların geç belirteci olarak kabul edilir (98).

Remodelasyon (Yeniden yapılanma) Evresi

Kemik remodelingi, kalsiyum homeostazisi ve iskeletin bütünlüğünü korumak için gerekli olan, yaşam boyu süren bir kemik yapım/yıkım olayıdır (99). Aynı zamanda, örgü kemiği lamellar kemik yapısına çevirmek ve kemiğin orijinal şeklini ve kuvvetini eski haline getirmek için kemik iyileşmesi sırasında da ortaya çıkar. Bu aşamada çeşitli kemik bölgelerinde zayıf trabeküller, kemik yıkımına ve yapımına uğrarlar. Bu işlem, kemik dokusunun iki ana hücresinin işlevine dayanır; kemik matriksi tahrip eden osteoklastlar ve yeni kemik oluşumundan sorumlu hücreler olan osteoblastlar. Osteositler de özel mekanik-duyusal işlevleri ile bu sürecine katılan başka bir önemli hücre tipidir (43, 99, 100).

Yeniden yapılanma süreci, sistemik aktive edici sinyaller (örneğin paratiroid hormonu) ve işlemi başlatıp sürdüren lokal biyomekanik uyarıcılar aracılığıyla meydana gelmektedir (101). Yeniden şekillenme işlemi, osteositlerden iletilen sinyallere cevap olarak astar hücrelerinin altındaki kemikten ayrılmasıyla başlatılmaktadır. Osteoblastlar ve osteoklastlar, temel çok hücreli birimler (BMU) adı verilen hücresel bir sisteme bağlıdırlar. Yeniden şekillenme bölgesinde, vasküler hücreler ve bağışıklık hücreleri arasında birçok hücresel olay ve etkileşim gerçekleşmektedir. BMU içerisindeki hücrelerin benzersiz düzeni, aktivasyon, kemik oluşumu, kemik rezorpsiyonu ve sonlandırmayı içeren remodelasyon işleminin fazlarının koordinasyonunu sağlar (99).

Kemiğin yeniden yapılanma evresinde kemik rezorpsiyonundan RANKL sorumluyken kemik yapımından BMP-2, PTH, IGF-1 ve Wnt ligandlar sorumludur (Şekil 1.7) (22).



Şekil 1.7 Kemik iyileşmesinin fazları - Papageorgiou⁽²²⁾, dan değiştirilerek

2.1.4. Kritik Boyutlu Kemik Defekti

Kemikte doku kaybı meydana getiren yaralanmalar sekonder kemik doku iyileşmesi mekanizmaları kullanılarak onarılır. Normal bir iyileşme sürecinden sonra yaralanma bölgesinde herhangi bir defekt ya da skar formasyonu kalması beklenmez. Ancak kaybedilen kemik doku miktarı belirli bir büyüklüğü aştığında kemik iyileşme mekanizmaları tam anlamıyla işlemez ve dışarıdan bir müdahale (greftleme vb.) olmadıkça yara bölgesinde eksik bir iyileşme izlenir. Kemik dokunun kendini iyileştiremeyeceği en küçük boyutlu defekte “kritik boyutlu defekt (KBD)” adı verilir. Kemik dokudaki bu eksik iyileşme fibröz doku ile tamamlanır (102).

2.2. Kemik Greftleri

“Doku mühendisliği, canlı hücrelerin, destek malzemeleri ve/veya biyolojik moleküllerin yardımıyla biyolojik dokuları oluşturmalarıdır.” Bu ifade ile 2001 yılında Avrupa Komisyonu doku mühendisliğini tanımlamıştır. Doku mühendisliği kaybolan, eksilen veya fonksiyonunu kaybeden dokuların onarımına olanak sağlar. İnsan dokuları endojen ya da eksojen kaynaklı nedenlerden dolayı zarar görebilir. Vücudun kendi kendine onaramayacağı hasarların en kısa zamanda kayıpsız veya en az kayıpla onarılması fonksiyon ve estetiğin yerine koyulması bu alandaki ilerlemeler ile mümkün olacaktır. Doku mühendisliği alanındaki gelişmeler, diş hekimliğini de yakından ilgilendirir.

Diş hekimliği ile ilişkili olan önemli dokulardan biri kemik dokusudur. Çünkü kemik dokusunda ki değişimler direkt ya da dolaylı olarak ağız sağlığını etkiler. Alveolar kretin uzun süre dişsiz kalması, ileri periodontal harabiyet, önceden geçirilmiş cerrahi operasyonlar, uyumsuz protez kullanımı ve kemikleri etkileyen bazı sistemik hastalıklar kemik dokusunda kayba neden olur. Bu kemik kaybı alveolar kretin yüksekliğinin veya genişliğinin azalmasına ya da bölgesel kemik defektlerine neden olur (103). Çene kemiklerindeki kalıcı kayıpların onarılmasında sıklıkla kemik greftleri ya da kemik oluşumunu destekleyici birtakım biyouyumlu materyaller kullanılır. Sert doku greftleri kullanılarak kaybolan kemik dokusunun kazanılması işlemi aslında birkaç asır önceye dayanmaktadır. Doğan ve Zafer⁽¹⁰⁴⁾, ilk ksenogreftin 1668 yılında Jop Van Meekeren tarafından, ilk otogreftin 1820 yılında Philips Von Walter tarafından ve ilk allogreftin 1880 yılında William Macewen tarafından uygulandığını bildirmiştir .

2.2.1. Kemik Greftlerinin Diş Hekimliği Alanındaki Kullanım

Endikasyonları

Kemik dokudaki kalıcı kayıpların giderilmesinde greft kullanımı giderek artmaktadır. Kullanılacak greft materyalinin özelliği ve miktarı alıcı sahanın ihtiyaçlarına göre seçilmelidir. Aynı zamanda uygulanacak operasyon çeşidi de greft seçimini etkilemektedir. Diş hekimliğinde sert doku greftlemesinin kullanıldığı alanları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz:

1. Alveol defektlerinin oluşumunun engellenmesi ya da onarımı: Travmatik diş çekimi, gömülü diş çekimi, kist ve tümör operasyonları esnasında defekt

oluşabileceği öngörülebiliyorsa ve ya operasyon sonrasında da oluşmuş bir defektin onarımı gerekiyorsa sert doku greftlemesi yapılabilir.

2. Kırık tedavisi: Özellikle kırık fragmanlarından doku kaybı varsa veya kırık hattında tekrar bir onarım yapılacaksa sert doku greftlemesi yapılabilir.
3. Protez öncesi hazırlık: Üzerindeki proteze fonksiyonel ya da estetik olarak yetersiz olan alveol kretin restorasyonunda sert doku greftlemesi yapılabilir.
4. İmplant operasyonu öncesi hazırlık: Dental implant uygulamalarında alveolar kretin yüksekliğinin veya genişliğinin yetersiz olması sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Bu tip vakalarda sert doku greftlemesi uygulanarak alveol kemik miktarının artırılması planlanır. Ayrıca anatomik yapıdaki kısıtlılıkları ekarte etmek için de kullanılabilir (örneğin alveolar inferior damar-sinir paketinin lokalizasyonunun değiştirilmesi).
5. Ortognatik operasyonlar: Bu operasyonlar esnasında oluşabilecek defektler ya da oluşturulan kırık hattı açılacak şekilde konumlandırılacaksa uzaklık miktarına göre sert doku greftlemesi yapılabilir.
6. Temporomandibular eklem operasyonları: Temporomandibular eklem kemik segmentlerine yönelik bir operasyonda sert doku greftlerine ihtiyaç duyulabilir.
7. Periodontal ve periimplat defektler veya endoperio lezyonlar: Oluşan defekt dokunun rejenerasyon kapasitesini aşıyorsa sert doku greftlemesi yapılabilir.
8. Bir dokunun ya da organın bir kısmının ya da tamamının kaybı: Büyük boyutlara ulaşmış veya agresif ilerleyen tümörlerin, metastazlarının ve kistlerin geniş rezeksiyonları sonucu ve trafik kazaları, iş kazaları ve ateşli silah yaralanmaları sonucu bir dokunun ya da organın bir kısmında ya da tamamının da kayıp meydana gelebilir.
9. Bifosfonat, medikaman ya da enfeksiyon kaynaklı osteomyelitlerin neden olduğu defektler: Osteomyelit şiddetine göre kemik dokusunun kaybı da değişir. Kayıp kemik dokusuna göre sert doku greftlemesi yapılabilir.
10. Konjenital anomaliler veya bir sendromun neden olduğu anomaliler: Damak yarıkları, retrognati, prognati, Crouzon Sendromu, Pfeiffer Sendromu gibi anomalilerin tedavilerinde sert doku greftlemesi yapılabilir (105-112).

Kemik greftleri kullanılırken hedeflenen tedavi şekli önemlidir. Dikkat edilmesi gereken konu, cerrahın tedavi edilen alanda “onarım” veya “rejenerasyon” ile ilgili amacıdır. Çünkü bu iki kavram birbirinden farklıdır. Onarım, bir parçanın fiziksel olarak benzer olan ancak biyolojik olarak veya fizyolojik olarak orijinal yapıyla aynı olmayan bir şeyle değiştirilmesidir. Buna karşılık, rejenerasyon, eksik vücut kısmının, kaybedilen ile her şekilde özdeş biyolojik bir yapı ile değiştirilmesine olanak sağlayan olayları içerir. Bir cerrah onarım ya da rejenerasyon hedefine göre greft materyali seçimi yapmalıdır. Seçilen grefte bağlı olarak vital kemiğin yüzdesi, hacim artışı ve iyileşme hızı ilgili değişimler olabilir (113).

Kemik greft materyalleri esas amacı olan yeni kemik oluşumunu sağlamak için aşağıdaki ilk 4 yolun en az birini kullanır (114). 5. yol ise tek başına ayrı bir alternatif değildir:

1. **Osteoindüksiyon:** Pluripotensiyel mezenşimal kök hücrelerin ve osteoprogenitörlerin, osteoblastlara farklılaşmasının indüklenmesi işlemidir. Bu hücreler olayların kaskatına, en önemlileri BMP'ler ve TGF-beta süper ailesi olan bir dizi büyüme ve farklılaşma faktörü aracılık eder (115). Bu aşamada Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 2 (IGF 2) ve Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) gibi çeşitli sitokinler ve kemokinler de görev alır (92, 116-118).
2. **Osteokondüksiyon:** Greft materyalinin, kemik oluşumunda rol oynayan hücreler elemanların ve vasküler infiltrasyonun hücreler elemanlarının göç için mikroskobik ve makroskobik iskelet görevi görmesidir. Osteoblastlar osteoid üretebilen tek hücrelerdir ve mezenşimal kök hücrelerden köken alırlar. Mezenşimal kök hücrelerini kemotaksisi, osteositlere farklılaşması ve osteoidin salgılanması; greftin bileşiminden, geometrisinden, mekanik stabilitesinden ve greftin yüzey özelliklerinden büyük ölçüde etkilenir (118-122).
3. **Osteogenez:** Yeni kemik oluşturabilme yeteneği anlamına gelir. İdeal bir kemik greftinin yeni kemik oluşturabilmesi beklenir. Greft materyalinin hücre oluşturabilme kapasitesi olması için içerisinde canlı osteoblast ve osteoklastları ya da mezenşimal kök hücreleri içermelidir. Aynı zamanda alıcı bölgede immün reaksiyon oluşturmamalıdır. Bu sadece otogreftlerle mümkündür. Ek olarak bir greft materyalinin osteogenezis özelliğinin olabilmesi için hem osteoindüktif hem

de osteokondüktif olmalıdır. Alıcı bölgedeki osteoblastları uyarak yeni kemik oluşumunu uyarmalı, yeni oluşan kemiğe de bir iskelet görevi görmelidir. Osteogenez oluşmasında BMP, TGF- β , IGF, FGF, PDGF, VEGF ve bazı interlökinler mediyatör olarak görev alır (7, 114, 123-125).

4. **Osteointegrasyon:** Biyouyumlu bir materyal ile kemik dokusu arasında direkt bir temas ile birlikte kimyasal bağlantı oluşmasıdır. Defekt bölgesine konan greft materyali ile kemik doku arasında da bu tip bir bağlantı istenir. Bazı durumlarda iki yüzey arasına fibrotik dokular girebilmektedir. Bu tip bir durum bir kapsül oluşmasına ve greftin başarısızlığına neden olur (7, 126-128).
5. **Osteopromosiyon:** Bir materyalin osteoindüktif özelliklere sahip olmadan, osteoindüksiyona katkı sağlamasıdır. Örneğin, enamel matriks türevi biyomateryaller, demineralize dondurularak kurutulmuş kemik allogreftinin (DFDBA) osteoindüktif etkisini artırır, ancak tek başına kemik büyümesini uyarmaz (129).

2.2.2. İdeal Kemik Greft Materyali

Elde edilen sonuçların kalite ve kantite açısından optimum olması için ideal greft materyali seçilmez. Bohner ve ark⁽¹³⁰⁾'na göre, ideal bir greft materyalinin 3 özelliği vardır:

1. Yük taşıma özelliği: Bu materyallerin mekanik özelliği uygulandığı bölgeden daha iyi ya da en az uygulandığı bölge kadar iyi olmalıdır.
2. Bozunabilirlik: Kullanılan materyal zamanla rezorbe olup yerini normal kemiğe bırakabilmelidir.
3. Osteokondüktivite: Yeni kemik oluşumu, materyalin yüzeyi tarafından desteklenmelidir. Ek olarak biyouyumlu olmalıdır. Greft materyali, alıcı bölgedeki hücreler üzerinde olumsuz etki oluşturmamalıdır.

Bu 3 ana özelliğe ek olarak osteoindüktif olması, osteointegre olabilmesi, uygulandığı bölgenin şeklini 3 boyutlu olarak yeterli doğrulukta alabilmesi ve koruyabilmesi önemli parametrelerdir. Anjiyogenezisi uyarması istenir. Ancak antijenik, karsinojenik ve toksik olmamalıdır. Kullanımı için özel ekip ve donanıma ihtiyaç duyulmamalıdır. Sterilize olabilmeli, raf ömrü uzun olmalı, yeterli miktarlarda elde edilebilir olmalıdır. Son olarak kabul edilebilir bir maliyetinin olması beklenir (131).

Greft Materyalinin Kemikleşmesi ve Alıcı Bölge İle Birleşmesi

Greft materyali alıcı bölgeye yerleştiği andan itibaren kemik doku iyileşmesine benzer bir süreç başlar. Öncelikle hemostaz oluşur, ardından inflamasyon fazı gelir, sonrasında öncül kemik oluşumu ve kalsifikasyon oluşur son olarak oluşan kemiğin yeniden şekillendirilmesi aşaması başlar. Greft eğer vaskülerize değil ise hemostaz sadece alıcı sahada oluşur. İnflamasyon ise hem greftte hem de alıcı bölgede gerçekleşir. Greft vaskülerize olmasa dahi alıcı sahadan gelen inflamatuvar hücreler greftte de inflamasyonu başlatır. İnflamasyon fazı nedeniyle farklı miktarlarda hem greftte hem alıcı bölgede rezorpsiyon oluşur. Öncül kemik oluşumu aşamasında birinci faz mezenşimal kök hücre göçü ve çoğalmasındır. Mezenşimal hücrelerin kondroblastlara ve kondrositlere dönüşmesi ile ikinci faz başlar ve greft ile kemik yüzeyi arasında bir kırıkta kallus oluşur. Üçüncü fazda ise bu kırıkta kallusa kan damarları girmesi ile başlar ve mezenşimal hücrelerden farklılaşan osteosit ve osteoblastların kemik matriks üretmesi devamında da kemik matriksi kalsifiye etmesi ile sonuçlanır. Öncül kemik oluşuktan sonra yapım ve yıkım olayları ile olgun kemik halini alır. Böylece greft materyali alıcı bölgedeki kemik yapısına uygun şekilde kemikleşmiş ya da kemikle birleşmiş olur (132, 133).

Greft materyalinin kemikleşmesi greftin çeşidi, büyüklüğü ve beslenmesi, alıcı bölgenin karakteristiği, inflamatuvar yanıtın şiddeti, greftin immobilizasyonu gibi faktörlere bağlıdır (134-138).

2.2.3. Kemik Greftlerinin Sınıflandırılması

Kemik greft materyalleri kişinin kendisi kaynaklı olabileceği gibi başka bir kişi, başka bir canlı kaynaklı veya yapay olarak üretilmiş bir materyal olabilir. Güncel literatürde greftlerin alındığı kaynağa göre, içinde barındırdıkları materyallere göre, greftin büyüklüğü ya da şekline göre, vaskülerite durumuna göre ve hazırlanma şekline göre farklı sınıflamalar mevcuttur (Tablo 1.1) (12, 13, 104, 131, 139, 140).

Tablo 1.1 Greft materyallerinin sınıflandırılması

1-Otojen Kemik Greftleri (Otogreftler)					
a) Kansellöz Greftler b) Kortikal Greftler c) Kortikokansellöz Greftler d) Otojen Kemik İliği Grefti e) Vaskülerize Greftler f) Osteokondral Greftler g) Kompozit Greftler					Otogreftin Şekline Göre Alternatif Sınıflama i. Blok Otogreft ii. Partiküllü Otogreft <ul style="list-style-type: none"> • Bone Mill • Bone Scraper • Piezo • Bone Filter
2-Homojen Kemik Greftleri (Homogreft)					
a) Allojenik kemik Greftleri (Allogreftler)			b) İzojenik Kemik Greftleri (İzogreftler)		
I. Taze Allogreft II. Deproteinize Kemik Matrisi III. Dondurulmuş Kemik IV. Dondurulmuş Kurutulmuş Kemik V. Demineralize Dondurulmuş Kurutulmuş Kemik		Alternatif Sınıflama A) Kansellöz Allogreftler B) Kortikal Allogreftler C) Osteokondral Allogreftler			
3-Heterojenik Kemik Greftleri (Ksenogreft, Heterogreft)					
a) Demineralize Edilmiş Kemik b) Deproteinize Edilmiş Kemik <ul style="list-style-type: none"> • Sığır kaynaklı hidroksiapatit 			Ksenogreftin Alındığı Kaynağa Göre Alternatif Sınıflama i. Hayvan Kaynaklı Ksenogreftler ii. Mercan Kaynaklı Ksenogreftler iii. Kalsifiye Alg Kaynaklı Ksenogreftler		
4-Alloplastlar					
a) Seramikler	b) Kompozit Polimerler	c) Kalsiyum Fosfat	d) Kalsiyum Sülfat	e) Metaller	f) Jelatin film
1) Hidroksi Apatit 2) Trikalsiyum Fosfat 3) Biyoaktif Camlar	1) Polimetilmetakrilat 2) Proplast 3) Polyalioksanone 4) Poliamide Metch 5) Polyglactin 90 6) Polietilenler 7) Polipropilen 8) Silikonlar 9) Politetrafluor-etilen (Teflon)		1) Rezorbe olanlar 2) Rezorbe olmayanlar		
5-Kombine Greftler					
6-Doku Kaynaklı Biyomateryaller ve Yenilikler					
1) Dentin greftler 2) Kıkırdak greftler 3) Büyüme faktörleri 4) Kollajen 5) Gen terapisi					

Otojen Kemik Greftleri

Otojen kemik grefti ya da otogreft bireyin kendi kemiğinden elde edilen grefttir. Diğer greft materyallerinin aksine canlı hücreler içerdiği gibi çoğunluğu tip I kollajenden oluşan matriks proteinleri, osteopontin, kemik sialoprotein, osteonektin, osteokalsin, fibronektin ve BMP de içermektedir. Ayrıca immünolojik açıdan tam olarak uyumlu olmaları en büyük avantajlarından biridir (141). Otojen olarak alınan greftler eğer doğru şekilde saklanırsa 2 saate kadar canlılığını koruyabilir. Greftleme işleminden önce greft materyali kuru bir ortamda saklandığı takdirde 30 dakika içinde greftin içerdiği hücreler canlılığını yitirmektedir (142, 143).

Diğer greft çeşitlerinde olmayıp otogreftlerde olan bir diğer özellikte osteoindüksiyon, osteokondüksiyon ve osteogenez özelliklerinin bir arada olmalarıdır. İçinde bulundukları osteoprojenitör hücreler ile osteogenez, hidroksiapatit kollajen matriks ile osteokondüksiyona ve içerdikleri hücrelerel mediyatör ve büyüme faktörleri ile osteoindüksiyona katkı sağlarlar (144, 145). Bu özellikleri bir arada barındıran tek greft materyali olmaları onları “altın standart” yapmaktadır (146).

Baş ve boyun cerrahisinde kullanılan greftler genellikle nonvasküler blok ve partiküllü greftlerdir. Bu greftler endikasyona, gerekli miktar ve türe göre intraoral ve ekstraoral olarak elde edilebilirler. Kemiğin kalitesi dolayısıyla alınacak olan greftin kalitesi bireyler arasında ve aynı bireyde alındığı yere göre farklılıklar gösterir. Greft alınacak bireyin yaşı, cinsiyeti, sistemik sağlığı, kullandığı ilaçlar, greft alınacak bölge ve alınma yöntemi; greftin geometrisini, kortikokansellöz oranını, osteojenitesini, osteokondüktivitesini ve osteoindüktivitesini etkiler (147-150).

Oral ve maksillofasiyal cerrahide kemik bloklarını toplamak için en sık kullanılan ekstraoral donör bölgeler (Tablo 1.2) anterior ve posterior iliak krest, tibia ve kalvaryadır (151). İliak krest ve tibia endokondral kemikleşirken kalvarya intramembranöz kemikleşir (152, 153). İntraoral olarak ise sıklıkla mandibular simfiz ve ramus, maksillar tuber, çenelerdeki ekzositozlar, çekim bölgesindeki interdental ve interradiküler septumlar greft elde etmek için donör alan olarak kullanılabilirler (128, 146, 154). Bu bölgelerden mandibula intramembranöz kemikleşirken maksilla endokondral kemikleşmektedir. Bu embriyonik kemikleşme temellerindeki farklılığın greftin özelliklerini etkileyeceğini, intramembranöz kemiğin endokondral kemikten daha önce

revaskülerize olduğunu, rezorpsiyonun ise daha yavaş olduğunu belirten araştırmalar bulunmaktadır (155-158).

Tablo 1.2 Otojen kemik grefti alınabilecek yerler ve miktarları - Garg ve ark.⁽¹⁵⁴⁾'dan

Greft Alınabilecek Alan	Greft Formu	Maksimum Alınabilecek Miktar (mL)
<i>Ekstraoral bölge</i>		
Posterior iliak krest	Blok ve/veya partikül	140
Anterior iliak krest	Blok ve/veya partikül	70
Tibia	Partikül	20-40
Kranium	Kortikal blok	40
<i>İntraoral bölge</i>		
Mandibula, ramus	Blok	5-10
Mandibula, simfiz	Blok ve/veya partikül	5
Tuber	Partikül	2

Otojen greftler elde edilme ya da uygulama prosedürü esnasında kontamine edilmedikçe biyouyumlu ve güvenlidirler. Otogreftler hidrofildir bu yüzden kan ya da serum fizyolojik ile ıslatılabilir. Bütün otogreftler rezorbe olabilirler. Rezorpsiyon miktarını ise alındığı birey, alındığı bölge ve alım yöntemi etkiler (151).

Farklı alım yöntemleri farklı greft partikül morfolojilerine neden olur. Bu morfoloji ise büyüme faktörleri ya da canlı hücre içeriğini etkiler. Bir greft partikülü ne kadar işlenirse ve manipüle edilirse canlı hücre içeriği o kadar düşer (159-163). İşlenmemiş kansellöz kemikte kortikal kemiğe göre daha fazla osteogenez hücresi bulunur. Bu aynı zamanda maksillar kansellöz kemiğin mandibular kortikal kemikten daha fazla hücre içerdiğini ortaya koymaktadır (164).

Donör bölgeden kemik alma yöntemleri aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Donör alandan kemik bloğu alınabilir: kemik bloğunun büyüklüğüne ve alındığı bölgeye göre kansellöz-kortikal oranları değişebilir. İstenilen

özelliklere göre kemik bloğu alınırken çeşitli frezler, osteotomlar ve piezoelektrikli cihazlar kullanılabilir. Blok greftlerin partiküllü greftlere göre klinik olarak daha stabil olduğu böylece greftleme ile kazanılan hacmin daha iyi korunduğu gösterilmiştir (165, 166).

2. Kemik bloğu alınıp bir kemik öğütücünden geçirilir ve partiküllü hale getirilebilir: elde edilen partiküllerin karakteri orijinal bloğun geometrisine ve kullanılan kemik öğütücüsüne bağlıdır (167). Partikül büyüklüğü azaldıkça yüzey alanı artar böylece BMP'lerin ve büyüme faktörlerinin etkinliği artar. Sonuç olarak osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon artar. Benzer şekilde greftin revaskülerizasyonu kolaylaşır. Ancak partiküller küçüldükçe içerdikleri canlı hücre sayısı da düşer (162, 165).
3. Kemik kazıyıcı ile partiküllü kemik grefti elde edilebilir: kemik yüzeyinden kemik parçaları toplayarak kemik grefti elde edilir. Partikül büyüklüğü kemik öğütücüde hazırlanana göre daha küçük ancak piezo-cerrahi ve kemik filtreleri ile elde edilene göre daha büyüktür. Toplanan greft materyali çoğunlukla kortikaldir. Kortikal kökenine rağmen invitro çalışmalarda osteojenik hücrelerin varlığı kanıtlanmıştır (160-162).
4. Piezoelektrikli cihazlarla partiküllü greft elde edilebilir: Bu cihazlar ultrasonik mikrovibrasyonlar ile çalışır. Çevre yumuşak dokulara zarar vermemesinden dolayı geleneksel yöntemlere göre kemiği ilgilendiren cerrahilerde son dönemlerde daha sık tercih edilir olmuşlardır. Çevre yumuşak dokulardaki koruyucu özelliğinin osteojenik hücrelerde de gösterdiği varsayılmaktadır (168).
5. Kemik filtreleriyle partiküllü kemik grefti toplanabilir: bir aspiratöre bağlanmış filtre ile toplanan kemik partikülleri greft materyali olarak kullanılabilir. Toplanan kemik partikülleri içerisinde canlı osteoblast ve osteositler de bulunmaktadır ancak diğer yöntemlere göre sayıları oldukça düşmektedir. Benzer şekilde partikül büyüklüğü düştüğü için rezorpsiyon hızının arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Ayrıca oral floradan kontaminasyon riski oldukça fazladır (162, 168-170).

Jensen ve ark.⁽¹⁷¹⁾ 2016 da yapmış olduğu çalışmada otogreftlerin içerdikleri osteojenik aktiviteleri, büyüme faktörleri, mekanik stabilite ve rezorpsiyonları bir tablo ile göstermişlerdir (Tablo 1.3).

Tablo 1.3 Otogreft çeşitlerine göre özellikleri tablosu – Jensen ve ark.⁽¹⁷¹⁾’dan

Greft Tipi	Osteojenik Hücreler	Büyüme Faktörleri	Mekanik Stabilite	Rezorpsiyon Potansiyeli
Kortikal Blok Greftler	++	++++	++++	+
Kotikokansellöz Blok Greftler	++++	+++	+++	++
Kortikal Partiküllü Greftler	+	+++	++	+++
Kansellöz Partiküllü Greftler	+++	++	+	++++
Kemik Kazıyıcı ile Elde Edilmiş Greftler	+	+++	+	++++
Piezocerrah ile Elde Edilmiş Greftler	+	+	+	++++
Filtreler ile Elde Edilmiş Greftler	+	+	-	+++++

Sert doku greftlemelerinde otojen kemik greftleri “altın standart” olmalarına rağmen bir takım dezavantajları da vardır. Bunlar:

1. İkinci bir operasyon sahası gerektirmesi
2. Operasyon süresini uzatması
3. Operasyonun karmaşıklığını artırması
4. Hızlı rezorpsiyon riski
5. Donör alanda morbiditeye neden olması
6. Donör alanda ağrı
7. Donör alanda enfeksiyon riski
8. Sınırlı miktarlarda greft elde edebilme
9. Hospitalizasyon süresinin uzamasıdır (106, 109, 172-177).

Otolog Kansellöz (Süngerimsi, Spongiyoz) Kemik Greftleri

Otojen greft materyali donör alandan alındıktan sonra optimum koşullarda saklanıp uygun koşullarda alıcı sahaya uygulansa dahi içerdiği canlı hücrelerde iskemi oluşur ve apoptoza girerler. Transplantasyon işlemi sırasında oluşan iskemiyeye en dayanıklı hücreler kemik iliğindeki farklılaşmamış mezenşimal hücreler ve endotelial progenitör hücrelerdir. Bu hücreler transplantasyondan kaynaklanan hipoksiye, pH değişimlerine ve sitokin düzeyindeki dengesizliklere rağmen canlı kalabilirler (128). Kansellöz kemik bu hücreleri ve uygun ortamı barındırma açısından en avantajlı greft çeşididir. Ayrıca içerdiği BMP ve büyüme faktörlerinin etkileriyle osteoindüktif etki gösterirken hidroksiapatit kollajen matrisi ile de osteokondüktif etki gösterir. Bu doğrultuda defekt onarımı açısından en etkili greft materyali olarak bilinir (178). Ancak alıcı bölgenin özelliklerinden ve greftlenen alanın büyüklüğünden etkilenirler (179). İlk uygulandıklarında yapısal özellikleri yetersiz olmasına rağmen 6-12 ayda alıcı bölgenin dayanıklılığına ulaşırlar (146).

Otolog Kortikal Kemik Greftleri

Donör sahadan alınan kortikal kemik grefti alıcı bölgeye uygulandığında kemik greft matrisi, osteositlerin canlı kalması için gerekli olan maddelerin difüzyonuna yeterli düzeyde izin vermez. Bu nedenle immün reaksiyonu uyarmayan nekrotik bir kemik grefti oluşur. Kortikal greftlerin avantajı alıcı bölgede mekanik destek sağlamalarıdır (128). Büyük oranda osteokondüktif az miktarda osteoindüktiftirler. Kansellöz kemik greftlerine göre daha fazla miktarda elde edilebilirler. 6 cm üzeri kemik defektlerinde iyi bir seçenektir ancak 12 cm üzerindeki defektlerde vaskülarizasyondaki gecikmenin başarıyı yarı yarıya düşürdüğü bildirilmiştir (146).

Transplante edilen kortikal kemik greftindeki nekroze osteonlar için ve revaskülarizasyon için osteoklastlar tarafından rezorpsiyon başlatılır. Bu rezorpsiyon nedeni ile ilk 6 ay greftin mekanik direnci düşer. Rezorpsiyonun şiddetine göre greftte fraktür görülebilir, alıcı saha ile kaynaşmasında gecikme olabilir ya da kaynaşmayabilir (7, 146).

Elde edilen greft kansellöz kemik grefti kadar osteojenik değildir hatta osteojenik olarak kabul edilmez (128). Bu nedenle otojen kansellöz kemik greftlerine göre başarıları daha düşüktür. Postoperatif dönemde revaskülarizasyon daha yavaştır. Daha az mezenşimal kök hücre içerirler (7, 124).

Vaskülerize Kortikal Otojen Kemik Greftleri

Kemik greft materyali ile birlikte bu yapıyı besleyen arter ve venlerin alınıp alıcı bölgede uygun anastomozları sağlanarak yapılan greftleme işlemidir. Uygun koşullarda yapılan greftleme ile greftte iskemi gelişmez ve osteoblastların % 90'a yakını canlı kalabilir (180). Vaskülerize olmayan kortikal greftlere göre revaskülarizasyon çok düşük olduğu için osteoklastik aktivitede de oldukça azdır. Bu nedenle vaskülerize olmayan kortikal greftlerde görülen ilk 6 aydaki yapısal dirençteki düşme bu greftlerde oluşmaz. 12 cm'yi geçen büyük defektlerde diğer greftlere oranla başarı şansları daha yüksektir (7, 106).

Otolog Kemik İliği Grefti

Kemiğin içinde bulunan ve kemik iliği olarak adlandırılan kısım içerisinde osteoblastlara farklılaşabilen kök hücreleri içerir. Birtakım özel teknikler ile bu temel kök hücreler izole edilebilirler ya da izole edilen kök hücreler hücre kültürlerinde çoğaltılabilirler (181). Yapılan bazı çalışmalarda bu kök hücrelerin kemik dışı bir alanda yeni kemik oluşturabildikleri görülmüştür (182). Böylece kemik oluşturmak amacı ile greft materyali olarak kullanılmışlardır. Ayrıca osteokondüktif özelliği olan diğer greft materyalleri ile karıştırılarak uygulandıklarında başarıyı artırdıkları görülmüştür (183).

Homogreftler

Allojen Kemik Greftleri

Biyolojik açıdan aynı tür olan bireylerden birinden alınan greft materyali, bir diğeri için allogrefttir. Allogreftler kadavralardan ya da canlı bireylerden elde edilebilirler ve ortopedik ve maksillofasial cerrahide sıklıkla kullanılırlar. Allogreftlerin kalitesi de otogreftlerinkine benzer faktörlerden etkilenir. Sınırlı da olsa bir standart oluşturulmak isteniyorsa donör taraması ve alınan materyalin makroskopik olarak değerlendirilmesi gerekir (184). İdeal bir allogreft içerisinde enfeksiyon barındırmamalı, alerjik reaksiyon oluşturmamalı, kolay steril edilebilmeli, osteokondüktif ve osteoindüktif olmalı, mekanik özellikleri iyi, elde edilmesi ve kullanımı kolay olmalıdır (13).

Allogreftlerin başarıları otojen kemik greftlere göre daha düşüktür. Osteojenik özellikleri bulunmaz. Alıcı bölge ile kaynaşma süreleri daha uzundur. Ayrıca az da olsa bakteriyel ve viral hastalık taşıma olasılıkları vardır ve immünolojik reaksiyon

oluşturabilirler. Ek olarak allogreftin kalitesi verici bireye ve bölgeye göre değişiklik gösterir.

Allogreftlerin başarıları otojen kemik greftlere göre daha düşüktür. Osteojenik özellikleri bulunmaz. Alıcı bölge ile kaynaşma süreleri daha uzundur. Ayrıca az da olsa bakteriyel ve viral hastalık taşıma olasılıkları vardır ve immünolojik reaksiyon oluşturabilirler. Ek olarak allogreftin kalitesi verici bireye ve bölgeye göre değişiklik gösterir.

Allogreftler greftin yapısına göre kortikal, kansellöz, kortikokansellöz ve osteokondral gibi yapısal çeşitleri vardır. Hazırlama yöntemine göre taze olarak uygulanabilirler, dondurularak, dondurulup-kurutularak (freeze drying) (liyofilizasyon) kimyasal koruyucular uygulanarak, deproteinize edilerek ve çözücüler ile dehidrate edilerek (solvent dehydration) uygulamaya hazır hale getirilebilirler. Allogreftlerin taze olarak uygulanması önerilmez. Çünkü taze allogreftler canlı hücre içermesi nedeni ile immün reaksiyon oluşturma ihtimalleri yüksektir. Bu nedenle allogreftlerin içerdikleri canlı hücreler uzaklaştırılmalıdır (104, 184). Bunlara ek olarak alınan greftler istenilen özelliğe göre deproteinize ya da demineralize edilebilirler.

Allogreftlerde dondurma işlemi iki şekilde yapılabilir:

1. Derin dondurulmuş (deep freezing), -70 °C deki dondurucularda dondurulur. Dondurma işlemine ek olarak dondurulan greftin nemi vakumlanıp % 5 kadar indirilirse kurutma işlemi uygulanmış olur ve dondurulmuş-kurutulmuş allogreft olur. Ek olarak uygulanan kurutma işlemi immün reaksiyon riskini de düşürür (13, 128).
2. Sıvı azot ile dondurma(cryopreservation), -196 °C deki sıvı azot ile dondurulur (13).

Dondurma işlemi ile osteoindüktif ve osteokondüktif özellikler kaybolmaz. Allogreftlere kimyasal koruyucu olarak gliserinli, civalı veya formaldehitli bileşikler uygulanabilir. Dehidratasyon işlemi çözücü kimyasallar ile de elde edilebilir. Çözücüler ile dehidrate edilirken hidrojen peroksit ve aseton uygulanabilir. Hidrojen peroksit enfeksiyon riskini düşürürken aseton dokudaki yağların ve suyun uzaklaştırılmasını sağlar (13, 185).

Allogreftler hazırlama yöntemlerine göre; taze allogreft, dondurulmuş kemik (DK), dondurulmuş ve kurutulmuş kemik (FDBA), demineralize dondurulmuş ve kurutulmuş kemik (DFDBA) ve deproteinize kemik olmak üzere 5 gruba ayrılabilir.

Taze allogreftler canlı donörden alınırlar ve minimal işlem görek alıcı sahaya aktarılırlar. Greftteki kemik iliği hücreleri ve periost hücreleri büyük oranda antijenik olduğundan grefti reddetme ihtimali yüksektir (yaklaşık % 50) (186, 187). Ayrıca bir hastalık taşıma ihtimalleri de olduğundan genellikle kullanılmazlar. Bu dezavantajların üstesinden gelmek için farklı yollar kullanılmış, greft sterilize edilmeye ve antijenik özellikleri azaltılmaya çalışılmıştır (188).

DK greftleri, donör sahadan alındıktan sonra çeşitli çözeltilerden ve antimikrobiyal ajanlardan geçirilir ve yaklaşık -70°C de dondurulurlar. Dondurma işlemi immünojenik özelliği düşürür ancak tamamen ortadan kaldırmaz (189). İçerdiği proteinler büyük oranda korunduğu için osteoindüktif özellikleri vardır ancak antijenik proteinler de korunduğu için sıklıkla tercih edilmezler (7, 189, 190).

FDBA greftler, DK greftlere dehidratasyon ve liyofilizasyon işlemleri uygulanması ile elde edilirler. Bu işlemler proteinlerin yapısını bozar, böylece immünojenik yanıtın oluşma riski düşer ancak osteoindüktif özelliğın kaybolduğu düşünülür. Sadece osteokondüktif özellik kalır. Ayrıca kollajen liflerin üzerinde mikro çatlaklar oluşmasına neden olduğu için greftin mekanik özelliklerini olumsuz etkiler (189).

DFDBA greftler ise DK greftlere bir asit tatbiki sonrası ısı, dehidratasyon, liyofilizasyon, gama ışınları ve etilen oksit uygulanarak elde edilir. Kullanılan asidin çeşidine bağlı olarak osteoindüktif özelliğın az da olsa kalabileceği düşünölmektedir ancak klinik olarak sadece osteokondüktif etki gösterir. FDBA greftlerde kemiğın inorganik yapısı çıkarıldığı için yapısal sağlamlığında fazladan kayıp meydana gelir. Bu nedenle yük taşıyan alıcı sahalarda yeterli desteklik sağlayamayacağı göz önünde bulundurulmalıdır (128, 191-193).

Bu allogreftler partiküllü (kortikal ya da kansellöz), blok (kortikal ya da kansellöz) veya putty (kortikal ya da kansellöz) şeklinde uygulanabilmektedirler. Ayrıca güncel yaklaşımlarda alıcı bölgedeki defektin 3 boyutlu taranması ile o bölgeye en uygun şekilde bir greft bloğu üretmekte mümkündür (194).

İzojen kemik greftleri

Alıcının tek yumurta ikizinden elde edilen allogreftlere izojen greftler (izogreftler) adı verilir. Diğer özellikleri bakımından allogreftlere benzerdir (12).

Heterogreftler (Ksenogreftler)

Ksenojenik kemik greftleri ya da ksenogreftler bir türden, başka bir türe nakil edilmek için alınan grefti ifade eder. Greft vericisinden alıcıya bulaşıcı hastalık geçme riski daha düşüktür. Antijenik özellikleri allogreftlerden yüksektir. Yabancı cisim reaksiyonuna ya da ciddi immün cevaba neden olabilirler (128). İmmün yanıtı önlemek için grefte bazı işlemler uygulanmaktadır ancak bu işlemler matriks proteinlerine zarar verir. Bu nedenle osteoindüktif ve osteogenez özellikleri yoktur, ksenogreftler bir türden, başka bir türe nakil edilmek için alınan grefti ifade eder. Greft vericisinden alıcıya bulaşıcı hastalık geçme riski daha düşüktür. Antijenik özellikleri allogreftlerden yüksektir. Yabancı cisim reaksiyonuna ya da ciddi immün cevaba neden olabilirler Hayvan kaynaklı ksenogreftler kazlar, kartallar, tavşanlar, domuzlar, köpekler, atlar, maymunlar ve sığırlar gibi çok çeşit hayvan türlerinden elde edilebileceği gibi mercan ve kalsifiye alg gibi kemik benzeri alternatif doğal yapılardan da elde edilebilirler. Ancak en sık sığır kemiği kaynaklı ksenogreftler tercih edilmektedir (166, 195-202) .

Sığır kaynaklı ksenogreftler taze dondurulmuş ve dondurulmuş kurutulmuş olarak denenmiştir. Sığır kemiğine ısı, kimyasal maddeler ve gamma radyasyon uygulanarak kemiğin protein bileşenleri elimine edilerek deproteinize sığır kaynaklı kemik greftleri (BHA) elde edilmiştir. Ve bu greftin avantajları nedeni ile güncel olarak, sıklıkla BHA greft derivasyonları tercih edilmektedir. Çünkü organik komponenti bulunan ksenogreftler immün yanıtı neden olabilmektedir. Ayrıca prionlarla bulaşan Deli Dana Hastalığı (DDH) (bovine spongiform encephalopathy) (İnsandaki formu Creutzfeldt-Jakob'dur.) gibi bulaşıcı hastalık riskini en aza indirebilmek için deproteinizasyon işlemi son derece önemlidir. Deproteinize edilen kemik dokusu DDH açısından son derece güvenlidir. Ayrıca Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) kemik dokusunu prion hastalıkları açısından güvenilir olduğunu bildirmiştir. Ek önlem olarak DDH'nın görülmediği bölgelerdeki sığırlardan elde edilen ksenogreftler tercih edilebilir (203, 204) ya da atlardan elde edilen ksenogreftler kullanılabilir (205).

BHA greftler, osteokondüktif olmaları, hazırlanmasının ve şekil verilmesinin kolay olması, blok ya da partikül halinde kortikal, kansellöz ya da kortikokansellöz olarak

bulunabilmesi ve biyouyumlu olması gibi avantajlara sahiptir. Deneysel, klinik ve histomorfometrik araştırma raporları, BHA greftlerinin periodontal, oral ve maksillofasial rekonstrüksiyonda, tek başına ya da otojen greftlerle kombine kullanılabilir en uygun ksenogreftler olduğunu bildirmişlerdir (166, 195-199).

Son yıllarda daha düşük maliyet, daha az immün reaksiyon ve daha düşük bulaşıcı hastalık riski için mercan kaynaklı ksenogreftler üretilmiştir. Mercanlar türlerine göre farklı por büyüklüklerine sahiptir. Porlu yapısı kemik dokuyu taklit eder ve greft konulduktan sonra kemik iliği hücreleri porlara göç eder. Anjiyogenez başladıktan sonra osteoklastlar mercan yapısını rezorbe ederken açığa çıkan kalsiyum iyonlarını kullanarak osteoblastlar yeni kemik sentezlerler. Bu aşama yaklaşık 8-24 hafta sürer. Ancak greftin partikülleri fazla büyük olurlarsa rezorpsiyonu gerçekleştirebilir ya da kısmen gerçekleşir (203, 206, 207).

Ksenogreftlerin bir önemli avantajı da otogreftlerle kombine olarak kullanılabilmesidir. Böylece kullanılan otogreftin miktarı düşürülebilir (208).

Alloplastlar

Alloplastlar sentetik olarak üretilmiş ve greft fonksiyonu gören materyallerdir. Üretildikleri materyalin özelliklerine ve üretilme şekillerine göre birçok çeşidi bulunmasına rağmen kemiğin inorganik komponenti ile benzerlik göstermesi nedeni ile sıklıkla kalsiyum fosfat (CaP) türevleri olan hidroksiapatit (Ha) ve trikalsiyum fosfat (TKF) ile çalışılmaktadır.

Sentetik CaP greftler biyouyumludur ve yabancı cisim reaksiyonuna neden olmazlar. Osteokondüktif özellikleri vardır ancak osteojenik hücre ve osteoindüktif molekül içermezler. Mezenşimal kök hücreler osteoblastlarla ya da büyüme faktörleri ile kombine edilerek tek başlarına ortaya çıkarabilecekleri etkiden daha güçlü bir etkiye sahip olabilirler (209).

Ha, kemiklerin ve dişlerin yapısında bulunan bir kalsiyum bileşiğidir. Mercan ve sığır kemiği gibi doğal kaynaklardan elde edilebileceği gibi yapay olarak da sentezlenebilir. Greft materyalinin partikül büyüklüğü, kalsiyum /fosfat oranı, por yapısı greftin fiziksel direncini ve rezorpsiyon hızını etkiler (106).

TKF, Ha gibi bir CaP bileşiğidir ancak kemik ve diş yapısında bulunmaz. Ha'e göre por yapısı daha düzensizdir, daha kontrolsüz bir biyobozunmaya sahiptir ve daha hızlı rezorbe olurlar (10-20 kat). Yük taşımayan alanlarda tercih edilirler (106, 210).

Bir diğerk alloplastik greft materyali de biyoaktif camlardır. Yapılarında çeşitli oranlarda silika, kalsiyum oksit, disodyum oksit ve pirofosfat ihtiva ederler. Porlu bir yapıya sahip olmadıklarından greft içerisine doğru bir anjiyogenez görülmez. Yeni kemik yapımı ile birlikte çevre kemik dokuya kimyasal bağlar ile tutunurlar. Bir nevi osteointegre olurlar. Direkt olarak osteojenik ve osteoindüktif etkileri olmamasına rağmen yüksek biyoaktif özelliğı bu etkileri aktive eder (106, 146).

Yukarıdaki alloplast greft materyallerinin dışında kompozit polimerler, kalsiyum sülfatlı bileşikler, metaller ve jelatin filmler alloplastik greft materyali olarak kullanılabilir. Ancak teknolojinin gelişmesi ve malzeme bilimi alanındaki ilerlemeler daha iyi sonuçlar veren greft materyallerinin üretilmesine olanak sağladıkça bu greft materyalleri terk edilmektedir.

İdeal alloplast materyalinde olması gereken özellikler:

- Biyouyumlu olmalı
- Sitotoksik olmamalı
- Kanserojen olmamalı
- İmmün reaksiyon oluşturmamalı
- Fibrotik aktiviteyi uyarmamalı
- Biyolojik olarak inert olmamalı
- Kullanımı ve depolanması kolay olmalı
- Maliyeti düşük olmalı
- Osteokondüktif ve mümkünse osteoindüksiyonu desteklemeli
- Kolay uygulanabilmeli
- Mekanik kuvvetlere dirençli olmalı
- Hidrofilik yapıda olmalı
- Kolay steril edilebilmeli
- Fiziksel özellikleri alıcı sahaya uyum göstermelidir (13).

Kombine Greftler

Bir kemik grefti ideal olabilmesi için daha önceden de bahsetmiş olduğumuz birçok özelliğı kendinde barındırıyor olmalıdır. Ancak bütün avantajları kendinde barındıran bir greft materyali henüz keşfedilememiştir. Bu problemin üstesinden gelebilmek için birkaç farklı türde kemik greftinin bir arada kullanılması düşünülmüştür.

Kombine kemik grefti kullanımı ile birlikte farklı greftlerin avantajları birleştirilerek ideale yakın bir greft elde edilebilir. Bunlardan en sık kullanılanı, ilik içeren spongiöz kemik ile allogreftlerin kombinasyonudur. Bu kombinasyondaki allogreft faz II osteogenezde görev alırken kemik iliği içeren spongiöz kemik faz I osteogenezde görev alır. Ayrıca yeterli miktarda otogreft alınamayan durumlarda otogreft dışında bir greft kullanılarak otogreftte olan ihtiyaç azaltılmış olur(211).

Ancak unutulmamalıdır ki kullanılan greft materyalinin türü kadar cerrahi alanın kanlanması, enfekte olmaması, mobil olmaması ve greft materyalinin fiziksel özellikleri (örneğin partikül büyüklüğü ve şekli) de önemlidir (212).

Doku Mühendisliği ve Yeni Uygulamalar

Son yıllarda kemik doku kaynaklı olmayan yeni alternatifler maddeler ve yöntemler geliştirilmiştir. Bu yeni maddeler direkt olarak greft materyali olarak kullanılabilir gibi greftlerle karıştırılan kimyasallar kemik yapımını aktive edebilir ya da genler üzerinden bu kimyasalların salınımını aktive edebilir.

Güncel uygulamalarda dentin dokusunun greft olarak kullanılması yükselen bir popüleriteye sahiptir. Dentin dokusu bir otogreft olarak uygulanır. Otogreft olması nedeni ile alıcı için bulaşıcı hastalık riski taşımaz, immün reaksiyon oluşturmaz, osteoindüktif ve osteokondüktiftir. demineralize edilerek, kısmi demineralize (% 70) edilerek, demineralize edilmeden; partiküllü ve blok olarak kullanılabilir (213).

Otogreftler dışındaki greftlerin osteoindüksiyon özellikleri ya çok düşük ya da hiç yoktur. Bu problemi çözmek amacı ile bu greftlerin büyüme faktörleri ile kombine edilmesi düşünülmüştür. Büyüme faktörlerinin proliferasyon, diferansiyasyon, kemotaksis ve anjiyogenez gibi özelliklerinden faydalanılarak greftlere osteoindüksiyon özelliği kazandırılmış ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (214).

Greftlerle birlikte kollajen kullanılması da bu yeni yöntemlerden biridir. Kollajen lifleri greft için hem bir taşıyıcı rolü üstlenir hem de anjiyogenez ve osteogenez için iyi bir iskelet oluşturur (140).

Genetik bilimindeki ilerlemelerle birlikte bazı gen bölgelerinin aktive edilmesi ya da yeni gen bölgeleri eklenerek kemik yapısında kullanılan maddelerin veya kemik yapımını artıran kimyasalların sentezinin artırılması sağlanabilmektedir. Ancak bu yöntemler henüz çok yeni ve maliyetli olduğundan daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır (215, 216).

2.3. Trombosit Konsantreleri

Doku rejenerasyonunda trombositler büyüme faktörlerinin ve iyileşmeyi hızlandırıcı proteinlerin potansiyel bir kaynağıdır. Cerrahi bir alanda ya da hasar görmüş bir dokuda iyileşmeyi hızlandırıcı birçok ürün geliştirilmeye çalışılmıştır. Fibrin yapıştırıcılar ile başlayan bu çaba otolog trombosit konsantreleri ile devam etmektedir. Kanda bulunan trombositleri konsantre hale getirmek ve diğer hücresel elemanlardan ayırmak için santrifüj işlemi uygulanır (217, 218).

Hastadan alınan kan tüplere konur. Santrifüj cihazı bu tüpleri istenilen hızda ve sürede belirli bir açı ile bir aks etrafında çevirir. Bu hız, süre, açı ve dönme ekseninin çapı tüpün içerisindeki kana dolayısıyla kan hücrelerine ve proteinlerine bir merkezkaç kuvveti uygular. Uygulanan merkezkaç kuvveti sürtünme ve kaldırma kuvvetlerini yendiğinde kan içindeki maddeler özkütlelerine göre (özkütlesi en büyük olan tüpün en altında toplanacak şekilde) sıralanırlar. Eritrositler en altta lökositler ortada ve trombositler ve plazmanın büyük kısmı en üstte kalır. Böylece bir trombosit konsantresi oluşur. Ayrıca eritrositlerin ve lökositlerin elimine edilmesi yara iyileşmesini hızlandırır (219, 220).

İstenilen son ürüne göre antikoagülan bulunan ya da bulunmayan tüpler kullanılabilir ya da santrifüj aşaması tekrarlanabilir (221).

2.3.1. Trombositler

Trombositlerin en önemli görevi hemostazı sağlamaktır ancak damarlanmanın (anjyogenez), hücre proliferasyonunun, kollajen lif oluşumunun, hücre proliferasyonunun ve doku rejenerasyonunun indüklenmesinde rol oynar (222).

Trombositler, kemik iliğinde bulun megakaryosit kaynaklı 1-3 μm çapında oval stoplazmik fragmanlardır. Çekirdekleri yoktur ancak gelişmiş bir hücre iskeleti, reseptör yapısı ve sekretuar granüllere sahiptir (α , β ve γ) (223). Bir mm^3 kanda ortalama 140,000 ile 400,000 adet trombosit bulunur. Bir trombositin ortalama yaşam süresi 7-10 gündür (224).

Trombositlerin membranı çift katlı fosfolipid bir yapıdan oluşur ve ince, buruşuk bir görünüme sahiptir. Bu özellik geniş membran yüzeyi sağlar. Membranın yüzeyinde küçük açıklıklar kanalcıklar sistemiyle bağlantılıdır. Hücre membranı glikokaliks tabakası ile çevrilidir ve bu tabaka hemostatik cevap vermeyi sağlayan glikoprotein reseptörleri barındırmaktadır. Sitoplazmalarında 3 majör tip salgı organeli bulunur.

Bunlar α granüller, yoğun granüller (δ granüller) ve lizozomlardır (225). Bu granüllerde; otokrin ve parakrin proteinler, adeziv proteinler, koagülasyon faktörleri kemokinler, sitokinler, büyüme faktörleri, proteoglikanlar, immünoglobülinler, proteazlar ve proteaz inhibitörleri bulunur (226).

Alfa granüller (α granüller)

Trombositte en fazla bulunan organeller alfa granülleridir. Çapları 200-500 nm arasında değişir. Her trombositte 40-80 adet bulunur. Bulunduğu zona göre içeriği farklılık gösterse de genel olarak kemokinler, proteoglikanlar, fibrinojen ve von Willebrand faktör bulundurlar. Bu granüller ekzositoz yoluyla intersitisyel aralığa içeriğini salar. α granüller pek çok büyüme faktörünün de kaynağıdır. Bu büyüme faktörleri doku iyileşmesinde gerçekleşen hücre çoğalmasında, hücre göçünde ve planlı hücre ölümlerinde rol oynar (227).

Alfa granülleri kaynaklı başlıca büyüme faktörleri:

- **Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF):**

PDGF nötrofil, monosit, ve fibroblast gibi yara bölgesine gelen hücreler için kemotaktik olarak tanımlanan ilk büyüme faktörüdür. Kemotaksi özelliği güçlüdür. Fibroblast proliferasyonunu uyarır ve hücre dışı matriksin (özellikle tip 1 kollajen) üretimini artırır. Ülser tedavisinde onaylanan ilk büyüme faktörüdür (228). PDGF yaralanma sonrası erken dönemde trombositlerden çok miktarda salınır. Diğer yandan fazla salınan PDGF fibroblastların fazla aktive olmasına neden olarak aşırı bir hücre dışı matriks yapımı nedeniyle hipertrofik yara izine ya da keloid oluşumuna neden olabilir (229). PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC ve PDGF-DD gibi alt türleri bulunmaktadır (226).

- **Fibroblast büyüme faktörü (FGF):**

FGF'ler 22 farklı subtipten oluşurlar ve 4 farklı FGF reseptörünü (FGFR 1-4) aktive ederler. Aktivasyon için heparin ya da heparan sülfata ihtiyaç duyarlar (230). FGF grubunun üyelerinin çoğu mezodermal, ektodermal ve endodermal hücrelerin proliferasyonunu stimüle eder. FGF-7 [keratinosit büyüme faktörü (KGF)] yetişkin bir bireydeki epitelial hücreler için özelleşmiştir. FGF-1 ve FGF-2 anjiyogenezis üzerine etkilidir. FGF'ler fibroblastlar ve keratinositler üzerinde mitotik etki gösterir (231). Ayrıca bazı FGF türlerinin stres altındaki hücreleri koruyucu ve destekleyici etkisi bulunmaktadır (232).

- **Epidermal büyüme faktörü (EGF):**

EGF, farklı hücre tiplerinin proliferasyonunu uyaran yaygın bir mitojenik faktördür. Özellikle fibroblastlar ve epitel hücreleri üzerinde etki gösterir. EGF, hücre içi sinyalleşmeyi başlatan EGF reseptörünü (EGFR / ErbB) aktive eder. EGF sadece mitotik hücrelere değil, aynı zamanda postmitotik nöronlara da etki eder ve birçok çalışma EGF'nin çeşitli nöron tipleri üzerinde nöromodülatör etkiye sahip olduğunu göstermiştir (233). Ayrıca bazı EGFR'lerinin onkogenik hale gelebildiği bildirilmiştir (234).

- **Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF):**

Vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF), endotel hücreleri üzerinde mitojenik ve anti-apoptotik etkiye sahiptir, vasküler geçirgenliği ve hücre göçünü artırır. Bu etkiler nedeniyle, normal ve patolojik anjiyojenik işlemlerin düzenlenmesinde aktif olarak katkıda bulunur. VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E (viral VEGF), VEGF-F, plasenta büyüme faktörü (PlGF) ve son keşfedilen endokrin bez kaynaklı vasküler endotelial büyüme faktörü (EG-VEGF) ile aynı ailede bulunur (235). Ayrıca VEGF'nin kemik rejenerasyonunda hem osteogenez hem de anjiyogeneze aracılık ettiği bildirilmiştir (236).

- **İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF):**

IGF-I ve IGF-II, insülin reseptörüne benzeyen bir tip tirozin kinaz olan tip I IGF reseptörü aracılığıyla birçok farklı hücre tipinin hayatta kalmasını sağlar ve mitogenezini uyarır. IGF -I ve -II, metabolizma, büyüme, farklılaşma ve gelişimin düzenlenmesi için önemli peptidlerdir. IGF'ler etkilerini otokrin, parakrin veya endokrin olarak ortaya koyabilir (237). Ek olarak, birkaç çalışma, özellikle diğer büyüme faktörleriyle birlikte eksojen IGF-I'in yara iyileşmesi üzerindeki yararlı etkileri olduğunu ortaya koymuştur (238).

- **Sinir Büyüme Faktörü (NGF):**

NGF, hem merkezi hem de periferik sinir sistemlerinde belirli sempatik ve duyuşal nöronların gelişimi ve hayatta kalması için gerekli olan polipeptitlerden nörotrofin ailesinin bir prototipidir. İnflamasyonun başlatılması ve sürdürülmesinde rol oynar. Yaraya dışarıdan uygulanan NGF'nin kutanöz doku iyileşmesine faydalı olduğunu bildiren yayınlar bulunmaktadır (239, 240).

- **Transforme Edici Büyüme Faktörü- Beta (TGF- β):**

TGF- β süper ailesi, homeostazis, hastalık ve tamir sırasında önemli roller oynayan çok çeşitli proteinleri içerir. TGF - β 1, - β 2 ve - β 3 şeklinde subtipleri bulunmaktadır (241). Her bir TGF- β izoformu, yara iyileşmesi üzerinde farklı bir etki gösterebilir. Özellikle, TGF- β 1 yetişkinlerin yaralarında fibrozise aracılık edebilirken, TGF- β 3 fetusta skarsız iyileşmeyi sağlar (242). Üç TGF-p izoformunun, fibroblastlar için mitojenik olduğu gösterilmiştir, ancak keratinositler dahil olmak üzere çoğu diğer hücrenin çoğalmasını inhibe eder. Ayrıca, bu sitokinler hücre dışı matriks proteinlerinin ve integrin ekspresyonunun çok güçlü uyarıcılarıdır (243). Böylece, yara iyileşmesi senaryosunda en çok çalışılan moleküller arasında yer almaktadır.

- **Bağ Dokusu Büyüme Faktörü (CTGF):**

Damarlanmayı, kıkırdak doku onarımını ve fibrozisi aktive edici rolü vardır (244).

- **Trombosit Faktör 4 (PF4):**

PF4 fibroblast ve nötröfillerin inflamasyon alanına göçünden sorumludur, aynı zamanda endotel hücre çoğalması üzerine negatif etki yapar ve damarlanmayı azaltır (245).

- **Temel Fibroblastik Büyüme Faktörü (b-FGF):**

b-FGF, kondrositlerin proliferasyonunu indükleyen çok etkili bir büyüme faktörüdür. Ayrıca mezenşimal kök hücreleri ve endotel hücreleri üzerinde uyarıcı etkisi vardır (246).

Büyüme Faktörlerinin Sert Doku İyileşmesi Üzerine Etkisi

Doku rejenerasyonu sitokinler ve büyüme faktörleri gibi pek çok molekülün farklı miktarlarda ve geniş bir etkinlik alanı içerisinde düzenlenen karmaşık bir süreçtir. Sitokinler ve büyüme faktörleri yaralanma bölgesinde hücre çoğalması, farklılaşması ve organize olmasında lokal sinyal molekülleri olarak görev alırlar (247).

Embriyolojik olarak mezenşimal kökenli olan kemik doku, mineralize bir matriks ve kemik dokuya özel hücrelerden oluşur. Kemik dokunun büyümesi gelişmesi bir takım hormonların, büyüme faktörlerinin ve sitokinlerin etkisi altında gerçekleşir. Kemik iyileşmesi esnasındaki revaskülerizasyon, matriks sentezi, matriks mineralizasyonu ve kemik iliği oluşturulması gibi olaylar hümmoral ve hüccresel işbirliği ile sağlanmaktadır. Kemik iyileşmesinin ve yumuşak doku iyileşmesinin ilk aşamaları

birbirleri ile benzerlik gösterir. Her iki aşamada da yara bölgesinde yeni doku formasyonu oluşur. Ancak sonrasında yumuşak doku iyileşmesinde fibrozis görülürken kemik iyileşmesinde normal kemik anatomisi görülür. Kırık bir kemik iyileşirken bu bölgeye mezenşimal hücreler göç ederler, çoğalırlar ve hücreler arası matriksi salgırlar. Kemikteki yaralanma sonrası iyileşme hemen başlar. Yaralanma bölgesinde oluşan hematoma içerisinde trombositler ve inflamatuvar hücreler tarafından büyüme faktörleri salgınır. Oluşan hematomdaki büyüme faktörleri kırık onarımı sırasında hücresel proliferasyon, farklılaşma ve hücre dışı matriks sentezinin merkezi düzenleyicileri olduğu düşünülmektedir (248). Ayrıca, anormal büyüme faktörü ekspresyonunun, diğer dokularda bozulmuş veya anormal iyileşmeye neden olduğu, bunun da anormal veya gecikmiş kırık onarımından da sorumlu olabileceği öne sürülmüştür (248).

Yoğun Granüller

Yoğun granüller, α granüllere oranla hem daha küçük hem daha az sayıdadırlar. Belirli bir morfolojileri yoktur. Yoğun granüller; kalsiyum, magnezyum, fosfor, pirofosfat gibi iyonları ATP, ADP, GTP, GDP gibi nükleotidleri CD63, LAMP 2 gibi membran proteinlerini ve transmitter olarak serotoninini depolar.

Lizozomlar

Lizozomlar, yoğun granüllerden daha az sayıda bulunurlar. Bir trombositte hiç lizozom bulunmayacağı gibi 3 adetten fazla da bulunmazlar. α granüllerinden daha küçüktürler ve oval bir şekli vardır. İçeriğinde asit hidrolazlar, katepsin D ve E, lizozomal membran proteinleri LAMP-2 ve CD63 bulundurulur.

Fibrinin Yapısı

Fibrinojen α -heliks sarmallı, keratin, miyosin ve epidermin içeren bir lifli proteindir. İnsan kan plazmasında 1.5-4 g/L konsantrasyonda bulunur ve bu oran hemostaz, yara iyileşmesi, iltihaplanma, anjiyogenez ve diğer birçok biyolojik fonksiyon için önem teşkil eder. Fibrinojen, çözünür bir makromoleküldür, ancak damar duvarı hasarı, aktif kan hücreleri veya yabancı bir yüzey tarafından tetiklenen enzimatik reaksiyonlar ile aktive edilen serin proteaz enzimi, trombininin etkisiyle fibrinojenin fibrine dönüşümüne neden olur ve çözünmeyen bir pıhtı veya jel oluşturur. Kan kaybını önlemek (kanamayı durdurmak hemostaz olarak adlandırılır) ve yara iyileşmesini desteklemek için mekanik olarak stabil bir pıhtı gereklidir. Fibrin pıhtıları, pozitif ve

negatif geri beslemeli bir dizi enzimatik reaksiyona etki eden fibrinolitik sistem tarafından çözülür (249).

Fibrin ilk aşamada ekstraselüler matriks görevi üstlenir. Çevre dokudan hücre göçü için ve göç eden hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için uygun ortam oluşturur. Fibrin ağ endotel hücrelerinin göçü ve kolonileşmesini kolaylaştıracağından anjiyogeneze yardımcı olur.

Trombosit ürünlerinde fibrin doğal yollarla (trombositten zengin fibrin) ya da dışarıdan müdahale ile (trombositten zengin plazma) oluşturulabilmektedir. Oluşturulma yöntemine göre fibrin kendi arasında farklı bağlar kurar. Kurulan bağların yapısı fibrin matriksin yoğunluğunu etkiler (227).

Fibrin yapıştırıcılar fibrin polimerizasyonunu başlatmak için bir sıgır trombini ve/veya kalsiyum klorür (CaCl_2) karışımı kullanır. Bu reaksiyonun hızı, kullanılan aktivatörün miktarı ve çeşidi ile ilişkilidir. Öte yandan PRF, santrifüjleme sırasında doğal olarak ve yavaşça polimerleşme gösterir. Dışarıdan herhangi bir aktivatör eklenmediği için buradaki fibrinizasyon neredeyse fizyolojiktir. Polimerizasyon çeşidi, nihai fibrin matriksinin mekanik ve biyolojik özelliklerini önemli ölçüde etkileyecektir. Jelleşme sırasında, fibrin fibrilleri aralarında 2 farklı biyokimyasal bağ kurulabilir: yoğunlaştırılmış tetramoleküler (çift taraflı, bilateral) bağlantılar ve trimoleküler (eşkenar, equilateral) bağlantılar. İki taraflı bağlantılar, güçlü trombin konsantrasyonları ile oluşturulur ve yoğun bir ağına oluşumuna yol açar, fibrin polimerlerinin kalınlaşmasına izin verir. Bu nedenle sitokin dolaşımına ve hücre göçüne elverişsizdir. Buna karşılık, zayıf trombin konsantrasyonları, çok sayıda eşkenar bağ oluşması anlamına gelir. Bu bağlantılar sitokinlerin yapışmasını ve hücre göçü destekleyebilen ince ve esnek bir fibrin ağının kurulmasını sağlar. Bu 3 boyutlu organizasyon, esnek, elastik ve güçlü bir PRF oluşmasını sağlar. Fibrin yapıştırıcıların güçlü polimerizasyonu, sitokinlerin fibrin matriksine etkili bir şekilde girmesini zorlaştırır. Dolayısıyla, salınan trombosit sitokinleri dışsal, yani jelleşme sırasında fibrin ağları arasında değil kolloidal süspansiyonda kalmış olacaktır. Buna bağlı olarak fizyolojik eliminasyonları hızlı olacaktır. Eşkenar polimerizasyonda, dolaşımdaki sitokinlerin fibrin ağlarına girme oranı daha yüksektir. Böylece, sitokinler daha uzun süre salınır (uzun vadeli etki). Böylece, hücreler skatrisyel matriks remodelingine başladığında, sitokinlerin etkileri devam ediyor olacaktır.

PRF bileşiminin biyokimyasal analizi, bu biyomateryalin, yavaş bir şekilde polimerize edilmiş bir fibrin ağı içine yerleştirilmiş sitokinlerin, glikanik zincirleri ve yapısal glikoproteinleri (fibronektin) içerdiğini göstermektedir. Bu biyokimyasal bileşenlerin iyileşme süreçleri üzerinde iyi bilinen sinerjik etkileri vardır (250).

2.3.2. Kandan Elde Edilen Ürünler ve Tarihsel Gelişimleri

Tıp biliminin ortaya çıkışından beri kan ve kan ürünleri hem tedavi edici amaçla (ciddi kan kayıplarında replasman gibi) hem de koruyucu (canlı aşı) amaçla kullanılmıştır. Kanın hücresel elemanlar ve plazmadan oluştuğunun keşfi ile daha spesifik olarak hücrelerin yada plazmanın transferine başlanmıştır. Özellikle kandaki şekilli elemanlardan biri olan trombositlerin ve trombositlerin ürettiği fibrinin, pıhtılaşma mekanizmasındaki yerinin anlaşılmasından sonra trombosit transfüzyonu ayrı bir önem kazanmıştır. Yapılan araştırmalarda trombositlerin fibrinden oluşan bir matriks salgılayarak pıhtı oluşmasına ve doku iyileşmesini hızlandırıcı bir takım kimyasallar (büyüme faktörleri) salgılayarak yara iyileşmesine katkıda bulunduğu anlaşılmıştır. Bu aşamadan sonra yüksek trombosit konsantrasyonu içeren ürünlerin yara bölgesine lokal olarak uygulanarak kanamanın durdurulması ve iyileşmenin aktive edilmesi fikri ortaya çıkmıştır. 1950'lerin ortalarına doğru trombosit zengin kan ürünleri elde edilmeye başlanmıştır (251).

Fibrin yapıştırıcılar

1900'lü yılların başlarında fibrin yapıştırıcılar ve fibrin yapıştırıcıların topikal kanama durdurucu olarak kullanımı önerilmiştir. Kanama durdurucu materyallerin geliştirilmesi ile operasyon süresinin azalması, cerrahi doku yönetimi kalitesinin artırılması gibi avantajlar elde edilmesi amaçlanmıştır. 1. Dünya Savaşı esnasında fibrin yapıştırıcılar yumuşak dokuda kanama durdurucu olarak kullanılmışlardır (252). 1940 yılında Young ve Medawar⁽²⁵³⁾ periferik sinir onarımında adeziv olarak kullanmış, 1944 yılında Tidrick ve Warner⁽²⁵⁴⁾ kan pıhtısı oluşturmak ve deri greftlerini iyileştirmek amacıyla kullanmıştır. 1970'lerde Avrupa'da fibrinojen ve sığır kaynaklı trombin kombinasyonu bir fibrin yapıştırıcı kullanıma sunulmuştur (255). 1985'te Dresdale ve ark.⁽²⁵⁶⁾ kriyopresipitat ve sığır trombinini karışımı ile edilen bir fibrin yapıştırıcı tanıtmıştır.

İlk fibrin yapıştırıcılar, fibrini oluşturan fibrinojen, bu reaksiyonun başlaması için gerekli olan trombin ve tepkimeyi hızlandıran kalsiyum klorür ihtiva etmekteydi.

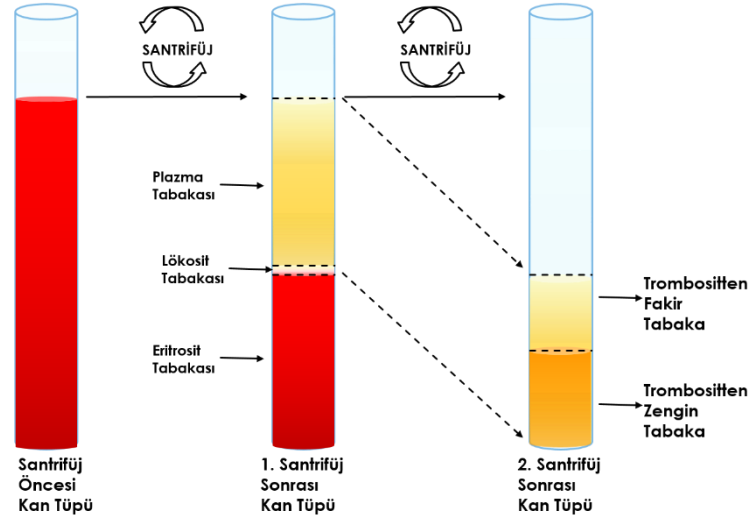
Fibrin yapıştırıcılardaki temel amaç cerrahi alanı ya da yara bölgesini primer olarak kapatmak, eğer bu mümkün değilse sızdırmazlığı sağlamaktır. Otojen olarak elde edilebilen fibrin yapıştırıcıların fibrinojen ve trombin yoğunluklarının düşük olması nedeni ile sağlanan etki yeterli olmamaktaydı ayrıca hastanın birkaç gün önceden kan bankası ile iletişime geçmesi, kan bankası tarafından yapılan kayıt hataları ve hekimin kan bankası ile çalışması gibi zorluklar nedeni ile rutin olarak uygulanamamıştır (257). Bu nedenle allojen fibrin yapıştırıcılar kullanıma sunulmuş ve fibrinojen yoğunluğu artırılarak istenilen özelliklerde bir materyal elde edilmiştir. Ancak allojen olmasının getirdiği bir takım dezavantajlar ortaya çıkmıştır. Bunlar kaynaktan alıcıya bulaşıcı hastalık geçişi ve alıcıda immün reaksiyon oluşmasıdır. Ayrıca fibrin yapıştırıcıların diğer dezavantajı trombosit bulunmaması nedeni trombositlerin salgıladıkları yara iyileşmesini aktive eden maddelerden yoksun olmasıdır (258).

Trombosit içeren fibrin yapıştırıcılar üretilmiş ve platelet jeller olarak isimlendirilmişlerdir. Bu ürünler fibrin yapıştırıcıların otolog bir modifikasyonudur. Platelet jeller, otolog kanın çift aşamalı santrifüjü sonrası elde edilen trombosit bakımından zengin bir plazmanın trombin ve kalsiyum klorür ile karıştırılmasıyla hazırlanır. Klinik olarak Kinghton ve ark.⁽²⁵⁹⁾ 1986'da kutanöz ülserlerde kullanmış Whiteman ve ark.⁽²⁵⁷⁾ da birkaç yıl sonra oral ve maksillofasial cerrahide kullanmıştır. Fibrin yapıştırıcıların dezavantajları nedeni ile kullanımları giderek azalmıştır ancak günümüzde özellikle kardiyovasküler prosedürlerde olmak üzere nöroşirürji, plastik cerrahi, torasik cerrahi, oral cerrahi, jinekolojik prosedürler ve farklı klinik uygulamalarda kullanımları söz konusudur (260, 261).

Trombosit Konsantreleri

Trombositten zengin plazma (PRP)

PRP fibrin yapıştırıcı ve fibrin jelden farklı olarak az bir hacimdeki plazmanın içindeki konsantre trombosit anlamına gelir. Trombosit konsantreleri aslen trombositopeni tedavisi için kullanılmaktaydı. 1954 yılında standart trombosit konsantreleri Kingsley⁽²⁵¹⁾ tarafından "trombositten zengin plazma" olarak isimlendirildi ve maksillofasial cerrahide kullanımına Marx ve ark.⁽²⁶²⁾ tarafından greftler üzerinde yapılan bir çalışma neticesinde başlandı. Zamanla popüler hale gelen PRP için farklı prosedürler ve kitler önerilmiştir. Ancak temel olarak iki aşamada hazırlanır.



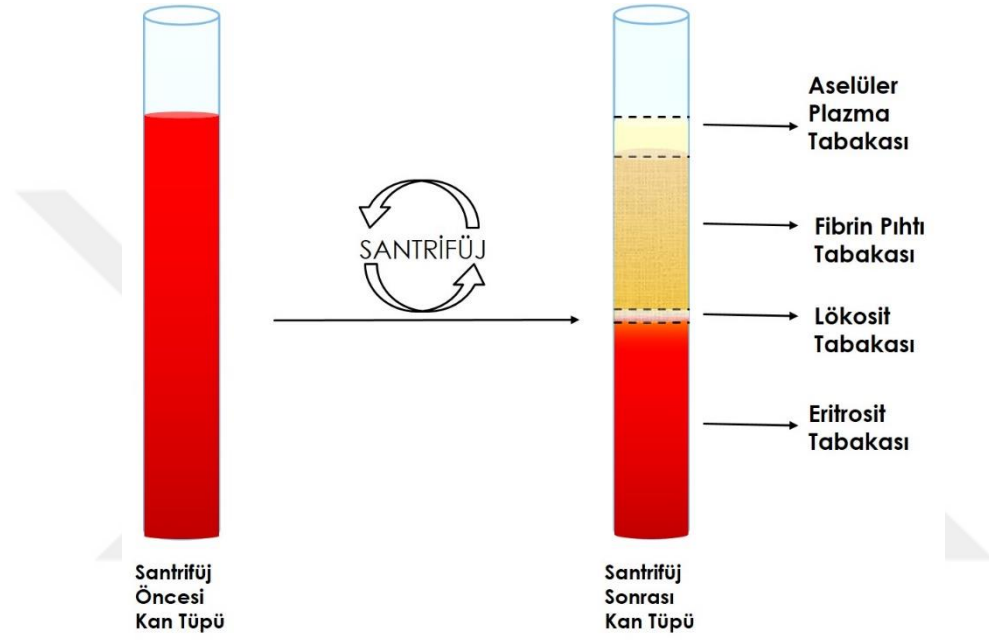
Şekil 1.8 Kanın 1. santrifüjden sonra elde edilen tabakaların temsili görüntüsü

Operasyon esnasında ya da hemen önce hastadan antikoagülanlı bir tüpe kan alınır. İlk aşamada nispeten düşük hızda ve kısa süreli santrifüj (soft spin) uygulanır. Santrifüjdeki temel amaç kandaki hücrelerin ve maddelerin özgül ağırlıklarından faydalanarak aynı tür olanları bir araya toplamaktır. Böylece hem birbirlerinden ayırması mümkün olur hem de daha az bir hacimde daha yüksek konsantrasyonlar elde edilebilir. Kanın santrifüjünden sonra 3 katmanı bulunur. Bu katmanlar yukarıdan aşağı doğru; trombositler ve plazmanın birlikte bulunduğu tabaka [bu tabaka teoride iki kısımdan oluşur üstteki kısım trombositten fakirken (PPP) alt kısımlar trombositten zengindir (PRP)], beyaz hücre tabakası (buffy coat layer) ve eritrosit tabakasıdır (Şekil 1.8) (263).

İkinci aşamada ise trombositlerin bulunduğu plazma katmanı (PPP ve PRP), beyaz kan hücreleri katmanı ve istenmeden de olsa bir miktar eritrosit alınarak ikinci bir tüpe aktarılır. Bu tüp birinciye göre daha hızlı ve daha uzun süre santrifüj (hard spin) edilir (farklı protokollerde uygulamalar farklılık gösterebilir). Tüp içeriği yukarıdan aşağıya olacak şekilde PPP tabakası, PRP tabakası, beyaz hücre tabakası ve ince bir kısımda eritrosit tabakası oluşur (Şekil 1.8). Bu aşamada trombositler daha konsantre bir hal alır ve PRP elde edilir. Protokole göre beyaz kan hücreleri PRP ye dahil edilebilir ya da edilmeyebilir. Elde edilen PRP fibrin matriks oluşturması için trombin, kalsiyum klorid ya da benzer bir aktivatörle karıştırılıp cerrahi alana veya yara bölgesine uygulanabilir (263, 264).

Trombositten zengin fibrin (PRF)

Fibrin yapıştırıcılar, trombosit jelleri ve PRP'den sonra 2001 yılında yeni bir protokol de Choukroun ve ark.⁽²⁶⁴⁾ tarafından tanıtıldı. PRF'de, fibrin yapıştırıcılardan ve trombosit jellerden oldukça farklıdır. PRP'ye benzerlik gösterse de tek aşamalı santrifüj uygulanır. Hastadan alınan kana antikoagülan ve aktivatör (trombin, kalsiyum klorid, vb.) konulmaz. Bu aşamaların elimine edilmesi klinik kolaylık ve zamandan tasarruf sağlar.



Şekil 1.9 PRF elde edilirken santrifüj işlemi sonrası elde edilen ürünlerin şematik görüntüsü

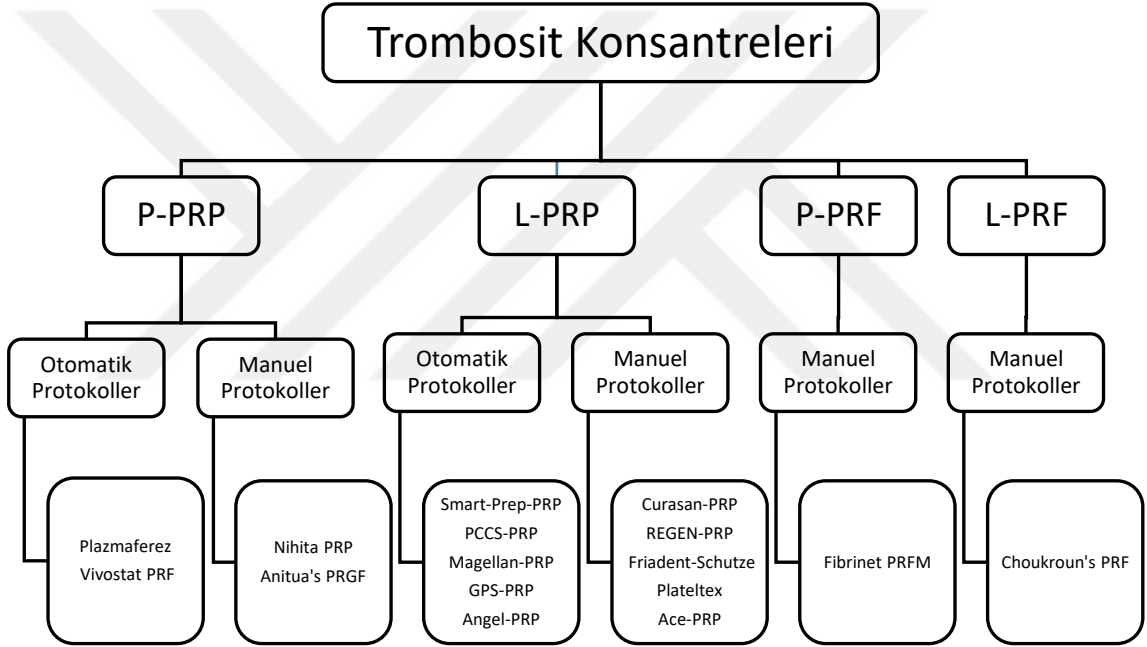
Cerrahi esnasında yada öncesinde hastadan tüp içerisine yeterli miktarlarda venöz kan alınır ve bekletilmeden santrifüj edilir. Alınan kana antikoagülan karıştırılmadığı için aktivatör olmadan trombositler aktifleşir ve fibrinojenden fibrin oluşmaya başlar. Santrifüj esnasında bu işlem devam eder. Santrifüj işlemi bittiğinde tüp içerisinde en üstte aselüler bir plazma tabakası hemen altında kalın bir fibrin pıhtı ve en altta da eritrositler birikir (Şekil 1.9).

Trombositler ve lökositler kendiliğinden oluşan bu pıhtıda bulunur. Oluşan fibrin matris oldukça güçlüdür ve kendi kendine çözünmez. Yara bölgesine uygulandığında doğal pıhtının ortadan kaldırılması için gerekli olan mekanizma gereklidir (221, 265).

Trombosit Konsantrelerinin Terminolojisi ve Sınıflandırılması

Trombosit kaynaklı kan ürünlerinin kullanımı yaygınlaştıkça farklı protokoller, kitler ve santrifüj parametreleri kullanılmaya başlanmış, bunun sonucunda ortaya çıkan ürünün isimlendirilmesinde karışıklıklar olmuştur. 2009 yılında bu karışıklığı gidermek amacıyla ile bir sınıflama önerildi ve terminolojinin netleşmesi adına önemli bir adım olduğu düşünülmektedir. Sınıflamanın mantığı oldukça basit 2 değişkene bağlıdır. Bunlar; sonuçta kullanılacak ürünün lökosit içerip içermemesi ve fibrin matriks içerip içermemesidir. Bu sınıflamaya göre 4 ana başlık vardır (Tablo 1.4).

Tablo 1.4 Trombosit konsantrelerinin sınıflaması – Dohan ve ark.⁽²⁶⁶⁾'dan değiştirilerek



1. Saf Trombositten Zengin Plazma (P-PRP), (Lökositten Fakir Trombositten Zengin Plazma)

Bu grup lökosit içermez ve düşük yoğunlukta fibrin matrikse sahiptir. İkinci santrifüjden sonra lökosit tabakası alınmaz. İlk üretildiğinde sıvı bir çözelti halindedir ancak aktive edilirse jel formu da alabilir. Bu iki formun farklı kullanım alanları vardır. Sıvı formu iyileşmeyi desteklemek için doku için enjekte edilebilirken jel formu cerrahi alanı veya yara yüzeyini kapatmada kullanılabilir(267).

Santrifüj dışında farklı hücre ayırma yöntemleri (plazmaferez) kullanılarak da hazırlanabilirler. Bu yöntemler otomatik veya manuel protokollere sahip olabilir. Ayrı bir

başlık altında bahsedilecek olan Büyüme Faktörlerinden Zengin Plazma (PRGF), [EndoRet, Biotechnology Institute BTI, Vitoria, Spain] kendi içerisinde ki protokolleri özelleşmiş olsa da esas olarak bir manuel protokollü P-PRP ürünüdür. Bir başka teknik olan Vivostat PRF (Platelet-Rich Fibrin, Vivostat A/S, Allerød, Denmark) isimlendirmede ki PRF ifadesi nedeni ile karışıklığa neden olmakta ancak bu ürün de otomatik protokollü P-PRP grubuna dahildir (268).

2. Lökosit ve Trombosit Zengin Plazma (L-PRP)

Bu ürünün P-PRP den tek farkı lökosit içeriyor olmasıdır. İkinci santrifüjden sonra lökosit tabakası da alınır. P-PRP gibi sıvı halde dokuya enjekte edilebilir ya da aktive edilerek jel formunu alabilir ve düşük yoğunlukta fibrin içerir. Jel formu yara ve cerrahi alanlarda kullanılabilir.

L-PRP kullanımı P-PRP'ye göre oldukça yaygındır. Şuanda üretilen ticari preparatlar protokolü oldukça standartlaştırmış ve kolaylaştırmıştır. Bunlara örnek olarak; otomatik protokol ile hazırlananlar Harvest Smart-PreP (Harvest Technologies, Plymouth, MA, USA) and Biomet GPS III (Biomet Inc., Warsaw, IN, USA) iken manuel protokol ile hazırlanan Plateltex (Prague, Czech Republic) or Regen PRP (RegenLab, Le Mont-sur-Lausanne, Switzerland)'dır (268).

3. Saf Trombosit Zengin Fibrin (P-PRF), (Lökosit Fakir Trombosit Zengin Fibrin)

Bu grubun PRP gruplarından en büyük farkı yüksek yoğunlukta fibrin matriks içermesidir. Yalnızca jel formunda bulunurlar ve içerdiği yoğun fibrin matriks nedeni ile doku içerisine enjekte edilemezler. Santrifüj işleminden sonra alınan kısma lökosit tabakası dâhil edilmez. Yalnız manuel protokolleri mevcuttur ancak diğer PRF grubu olan L-PRF (lökosit ve Trombosit Zengin Fibrin)'e göre daha karmaşık ve daha maliyetlidir. Güncel ticari preparatı ortopedik uygulamalarda da kullanılan Tromboitten Zengin Fibrin Matriks (PRFM) (Cascade Medical, Wayne, NJ, USA)'dir (267).

4. Lökosit ve Trombosit Zengin Fibrin (L-PRF)

Bu grup da yüksek yoğunluklu fibrin matrikse sahiptir ancak P-PRF den farklı olarak lökosit barındırmaktadırlar. P-PRF'ler gibi yalnızca jel formları bulunduğu için doku içerisine enjekte edilemezler ancak solid yapıları nedeni ile bir takım uygulamalara daha uygun olabilirler (267, 269).

L-PRF hazırlama protokolü (2700rpm, 12dk veya 3000rpm, 10dk) ve tüp yapısı (yuvarlak uçlu cam ya da plastik kaplı cam tüp) değiştirilerek [daha yavaş santrifüj (1500 rpm) ve daha uzun zaman (14 dk)], (düz cam tabanlı tüp) fibrin liflerinin daha düzenli dağılmasını sağlamak, daha uzun süre büyüme faktörü ve sitokin salgılanmasını sağlamak amacıyla Gelişmiş PRF (A-PRF) üretilmiştir (267, 268, 270).

Fujioka - Kobayashi ve ark.⁽²⁷¹⁾ A-PRF’i modifiye edilerek (1300 rpm, 8 dk) A-PRF+’yı sunmuşlardır. Bu modifikasyondaki amaç düşük santrifüj hızı sayesinde lökositlerin ve trombositlerin fibrin matriksten uzaklaşmasını önlemektir.

Bütün PRF türevleri jel formunda olduğu için doku içine enjekte edilememektedirler. Fibrin yapı oluşmadan önce hücre ayırımı yapmak ve PRF’i sıvı halde elde etmek için santrifüj protokolleri değiştirilmiştir (700 rpm, 3 dk). Böylece Enjekte Edilebilir PRF (I-PRF) elde edilmiştir (272).

Santrifüj hızı artırılarak (2400-2700rpm) daha yoğun bir fibrin matriks ve daha konsantre trombosit elde etmeyi amaçlayan bir yöntem 2006 yılında Sacco⁽²⁷³⁾ tarafından “Konsantre büyüme faktörü (GCF)” olarak tanımlanmıştır.

Santrifüj esnasında kullanılan cam veya plastik tüpler yerine titanyum tüpler kullanılarak benzer santrifüj değerlerinde daha yoğun bir fibrin matriks elde edilmiştir ve Titanyum-PRF olarak isimlendirilmiştir. Kullanılan titanyum tüplerin daha biyouyumlu oluşu silikanın zararlı etkilerinin elimine edilmesi ile fibrin yapının daha güçlü kurulduğu düşünülmektedir (274).

Büyüme Faktörlerinden Zengin Plazma

1999 yılında Anitua⁽²⁷⁵⁾ manuel protokollü bir P-PRP çeşidi olan PRGF’yi tanıttı. Bu sistemdeki temel amaç klinik prosedürlerin azaltılmasıdır. Ayrıca yara iyileşmesi için gerekli olan büyüme faktörlerinin hem daha fazla miktarda, hem de daha uzun sürede salınımını sağlamaktır (275).

PRGF normal periferik kana oranla iki-üç kat daha fazla trombosit içerir. Bu orta dereceli trombosit yoğunluğuna denk gelir. Bu seviyeden az olursa büyüme faktörlerinin miktarlarının düşmesine bağlı olarak biyolojik fayda düşecektir. Bu seviyenin üzerinde olması durumunda biyoyararlanımın artması beklenirken artan trombosit miktarı inhibitör görevi görebilir ve beklenen fayda sağlanamayabilir (276, 277).

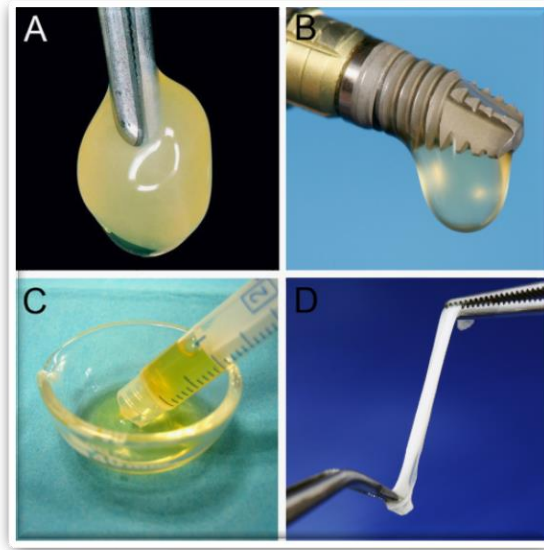
Hastadan alınan venöz kan antikoagülanlı plastik bir tüpte tek aşamalı santrifüj edilir. Tek aşamalı santrifüj işlemi klinik uygulama işleminin karmaşıklığını azaltır. İşlem

sonunda elde edilen ürünün lökosit içermesi istenmez. Lökositlerin her ne kadar enfeksiyon ile mücadelede çok önemli bir yeri olsa da salgıladıkları lizozomal enzimler (özellikle polimorfonükleer nötrofillerin ürettikleri elastaz, kollajenaz, katepsin, vb.) ve serbest radikaller ile inflamasyonu alevlendirerek sağlam dokuda ve uygulanan biyomateryalde harabiyete neden olabilmektedirler (278). Bu harabiyet rejenerasyonu olumsuz etkiler. Bu nedenle kan ürünü ile gelen lökositler elimine edilir ve bölgenin enfeksiyon ile mücadelesi dokudan gelen lökositler aracılığı ile sağlanır (227, 277, 279).

PRGF ilk elde edildiğinde bir sıvı çözelti şeklindedir. Ancak jel formunda kullanılmak isteniyorsa bir fibrin matrisi oluşturulmalıdır. Antikoagülanlı tüp kullanıldığı için plazma trombinini bu işlemi gerçekleştirilemez. Sığır kaynaklı trombin kullanımı immün reaksiyon sonucu ciddi kogülopatilere veya çapraz enfeksiyon geçişine neden olabileceği bilindiği için kalsiyum klorür (CaCl_2) ($50 \mu\text{L}/\text{mL}$) kullanılmıştır. Ayrıca kalsiyum klorür sığır kaynaklı trombin kadar güçlü bir aktivatör değildir. Bu nedenle fibrinojenin fibrine dönüşümü zaman alır. Bu süre boyunca büyüme faktörleri salınmaya devam eder. Böylece doku daha uzun süre büyüme faktörlerinden yararlanır.

Aktivasyondan sonra, trombositlerin a-granülleri, hücre çoğalması, büyüme ve farklılaşma gibi çeşitli biyolojik süreçleri etkileyen ve uyaran biyolojik olarak aktif protein karışımı salgılar. Bu biyolojik olarak aktif protein karışımı bol miktarda trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF), transforme edici büyüme faktörü – beta tip 1 ($\text{TGF-}\beta 1$), fibroblast büyüme faktörü (FGF), epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF-1) ve hepatosit büyüme faktörü (HGF) içerir.

PRGF teknolojisi diş hekimliği, implantoloji, nörobiyoloji, ortopedi, spor hekimliği ve oftalmoloji gibi alanlarda yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu amacıyla kullanılmaktadır (280). PRGF'nin bir diğer avantajı da birçok farklı formunun bulunmasıdır. Böylece farklı alanların isteklerini karşılayabilecek özellikte üretilmektedir (Şekil 1.10).



Şekil 1.10 (A) PRGF-Endoret supernatant ve fibrin matriks, (B) Sıvı PRGF-Endoret, (C) PRGF-Endoret matriks, (D) Otolog fibrin membran – Anitua ⁽²²⁷⁾’dan

1-PRGF-Endoret supernatant:

Santrifüjizasyon işleminden sonra üstte kalan sıvı kısım PRGF süpernantı olarak isimlendirilir. Fibrin yapı içermez ancak trombositlerden salınan büyüme faktörlerini ve plazma proteinlerini içerir. Göz kuruluğunda göz damlası olarak, korneal defektlerde tercih edilebilirler. Ayrıca hücre kültür ortamını desteklemek için kullanılabilirler (281).

2-Sıvı PRGF-Endoret:

Sıvı PRGF doku içine uygulanabileceği gibi eklem aralığında ve dış hekimliğinde implant uygulamasında da kullanılabilir. İmplant yerleştirilmeden önce implant yüzeyine uygulanan sıvı PRGF biyoaktif bir nano membran gibi davranır. Bu membrandan salınan büyüme faktörleri ile daha hızlı kemik iyileşmesi ve daha erken osteointegrasyon olması beklenir. Ek olarak eklem içi enjeksiyonlarda, cerrahi alanlarda ve deri rejenerasyonunda kullanılmaktadır (282).

3-PRGF-Endoret matriks:

Aktivatör uygulandıktan sonra oluşan yapıda 3 botlu bir matriks, büyüme faktörleri, plazma proteinleri ve trombositler bulunur. PRGF matriks özellikle açık yaralarda ve doku mühendisliğinde kullanılmaktadır. Ayrıca aktivatör uygulanmadan önce greft ile karıştırılıp sonra aktivatör uygulandığında fibrin lifleri greft partikülleri arasında oluşarak biyolojik bir tutkal gibi partikülleri bir arada tutan bir yapı

oluşturulabilir. Böylece hem greft içerisine hücre göçü kolaylaşır hem büyüme faktörleri ile kemik rejenerasyonu hızlanır hem de greftin uygulaması kolaylaşır (282, 283).

4-Otolog fibrin membran:

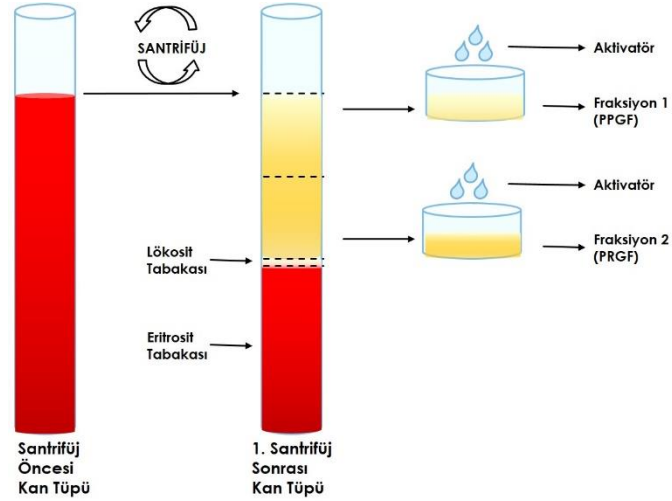
Koagülasyon işleminden sonra oluşan fibrin yapı büzülerek elastik, yoğun, hemostatik fibrin yapısındaki PRGF'yi oluşturur. Bu son form özellikle diş çekim soketlerini doldurmak ve bu bölgelerde tam bir epitelizasyon oluşturmak için kullanılabilir (282).

PRGF tüplerinde bulunan antikoagülan miktarı Avrupa yasalarına göre tıbbi ürün sınıfına girdiği için 2016 yılında Anitua⁽²⁸⁴⁾ tarafından yeni bir PRGF türevi geliştirilmiştir. Kullanılmakta olan protokol PRGF-A, yeni protokol ise PRGF-B olarak isimlendirilmiştir. PRGF-A modülünün ekstraksiyon tüpünde 0,9 mL trisodyum sitrat ve aktivatöründe 50 µL kalsiyum klorür bulunmaktaydı. PRGF-B'de ise antikoagülan olarak 0,4 ml trisodyum sitrat ve aktivatöründe 20 µL kalsiyum klorür bulunmaktadır. Temel hematolojik parametreler, trombosit fonksiyonu, büyüme faktörü içeriği ve biyolojik etki her iki PRGF protokolü arasında karşılaştırıldı. PRGF-B'nin diğer yonteme göre trombosit aktivasyonları daha yüksek, salınan büyüme faktörü miktarı daha fazla ve pıhtı oluşum süresi daha kısa olduğu görüldü (284).

PRGF üzerindeki çalışmalar devam etmektedir. Son yıllarda PRGF'nin damarlanmaya katkıda bulunduğu (282), antibakteriyel etki gösterdiği (Staphylococcus aureus ve Escherichia coli'ye karşı) (285), antiinflamatuvar etkisinin bulunduğu (monosit kemotaktik protein-1 inaktivasyonu ile) (286) ve karaciğer rejenerasyonuna katkıda bulunduğu (içeriğinde bulunan trombositlerden salınan serotonin sayesinde) yönünde raporlar bulunmaktadır (287).

PRGF Hazırlama Protokolü:

- Hastadan alınan venöz kan mavi kapaklı tüplere konur. Tüpler santrifüj cihazına yerleştirilir. Genellikle cihazın dönme hızı ve süresi otomatik olarak programlanmıştır (ancak firmanın talimatları 580 G ve 8 dakika santrifüj edilmesi şeklindedir).
- Santrifüj işlemi sonucunda tüp içerisinde en alta koyu kırmızı eritrosit tabakası, ortada parlak bir lökosit tabakası (buffy coat) en üstte de trombositleri içinde bulunduran plazma tabakası bulunur (Şekil 1.11).



Şekil 1.11 PRGF hazırlanırken santrifüj işlemi sonrası elde edilen ürünlerin şematik görüntüsü

- Bu plazma katmanını iki tabaka halinde düşünmek mümkündür. Üstte kalan hacimce plazmanın yaklaşık olarak % 60'lık kısmına denk gelen trombositten fakir tabakadır (PPP) (fraksiyon-1). Trombositten fakir olarak adlandırılrsa da periferik kandan daha fazla oranda trombosit içerir.
- Trombositten zengin tabaka (fraksiyon-2) ise fraksiyon-1'den de daha yüksek oranda trombosit içerir. Gerek görülürse tüp üzerinde fraksiyonların ayrılma noktalarına tahmini bir işaret konabilir.
- Tüplerin santrifüjden çıkarılırken ve tüpün kapağı açılırken, tabakaların birbirine karışmaması için, sarsılmamasına özen gösterilmelidir.
- Kıtte bulunan plazma aspire cihazı ile tüplerden fraksiyon-1 tabakaları toplanarak beyaz kapaklı tüpe konur ve fraksiyon-1 olarak işaretlenir.
- Daha sonra fraksiyon-2 tabakaları toplanır ve fraksiyon-2 olarak ayrılan beyaz kapaklı tüpe konur. Burada dikkat edilmesi gereken nokta fraksiyon-2 tabakası alınırken hemen altında bulunan lökosit tabakası alınmamalıdır.
- Kalsiyum klorür içeren aktivatör, etkinleştirme enjektörüne çekilerek her bir beyaz kapaklı tüpe dozu 20 µl/ml olacak şekilde fraksiyonlara eklenir ve karıştırılır.
- Karışımlar cam godelere aktarılarak Plasmaterm H (BioTeknoloji Enstitüsü (BTI), Victoria, İspanya) cihazına konur ve 37 °C'ta fraksiyon-2 yaklaşık 10 dakika, fraksiyon-1 yaklaşık 20 dakika bekletilir ve ürün hazır hale gelir (220, 227, 281).

PRGF Sisteminin Avantajları:

- Kolay elde edilebilir (otolog venöz kandan elde edilebilir).
- Otoimmün reaksiyon gelişme ihtimali yoktur.
- Sığır trombini kullanılmadığı için koagülopati gelişme ihtimal yoktur.
- Başka bir verici olmadığından bulaşıcı hastalık riski yoktur.
- Tek aşamalı santrifüj sistemi klinik kolaylık ve zamandan tasarruf sağlar.
- Aktivatör olarak kalsiyum klorür kullanılması fibrin yapının daha yavaş oluşmasına ve büyüme faktörlerinin daha uzun süre salınmasını sağlamaktadır.
- Trombosit konsantrasyonunun normal kana oranla 2-3 kat fazla olması optimum oranı sağlamaktadır. Anitua'ya göre bu oranın daha az ya da daha çok olması biyolojik faydayı düşürecektir
- Lökosit içermemesi nedeniyle inflamasyonun artması ve inflamasyona bağlı doku yıkımı önlenmiş olur.
- Farklı tıbbi alanlarda kullanılabilecek formlarının bulunması etki alanını artırmaktadır (268).

PRGF Sisteminin Dezavantajları:

- Özel ekipmana ihtiyaç duyulur.
- Kitlerin depolanması zordur.
- Pipetleme yapılırken standardizasyonun sağlanamaması fraksiyon kalitelerinin değişmesine ya da son ürünün içerisine lökosit karışmasına neden olabilmektedir (268).

3. MATERİYAL VE METOT

Bu deneysel çalışma için Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'nun 03/10/2018 tarihli ve 68489742-604-E.21906 sayılı onayı alınmıştır. Denepli hayvanlarının temini, cerrahisi, bakımı ve sakrifikasyonu Ondokuz Mayıs Üniversitesi Denepli Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde, gerçekleştirildi.

Çalışmamızın her aşamasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu Yönergesi'nde belirtilen kurallara özenle uyulmuştur.

Çalışmamıza Ondokuz Mayıs Üniversitesi Proje Yönetim Ofisi tarafından PYO.DIS.1904.18.017 dosya numarası ile desteklenmiştir. Ayrıca bu çalışmanın histolojik incelemesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda ve radyolojik incelemesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Denepli Hayvanları

Çalışmamızda Ondokuz Mayıs Üniversitesi Denepli Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi (DEHAM)'nden temin edilen 12 adet, yetişkin, her biri yaklaşık olarak 3 kg ağırlığında, erkek, Yeni Zelanda Tavşanı kullanıldı. Denekler yetiştirilme ve denepli süresi boyunca optimum laboratuvar koşullarında (uygun kafes büyüklüğü, 12 saat gece ve 12 saat gündüz uygulaması, 21 ± 2 °C'de % 40-60 bağıl nem oranı) ayrı ayrı kafeslerde tutuldu, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Denepli Hayvanları Araştırma ve Uygulama Merkezi (DEHAM)'nden temin edilen steril standart tavşan yemleri ve ad libitum olarak su ile besledi. Çalışma süresince denekler, veteriner hekim kontrolü altında tutuldu.

3.1.2. PRGF

Çalışmamızda PRGF protokolü olarak PRGF [Biotechnology Institute BTI, Vitoria, Spain], kullanıldı. PRGF kiti olarak:

KIT KMU 15

- a. 4 adet mavi kapaklı ekstraksiyon tüpü [vakumlu, 9ml, (0.4ml, % 3,8 sodyum sitrat içerir)],
- b. 2 adet beyaz kapaklı fraksiyonlama tüpü (vakumlu, 9ml),

- c. 1 adet plazma aspirasyon pipeti,
- d. 1 etkinleştirme şırıngası (insülin enjektörü),
- e. 1 adet aktivatör (1ml, kalsiyum klorür 20 µL),
- f. 1 adet kanatlı kan alma seti,
- g. 5 adet tanımlama etiketi, kullanıldı.

Ayrıca PRGF hazırlanırken üretici firma önerileri doğrultusunda kite özel

- Santrifüj sistemi V,
- Plasmaterm H,
- İş rafı,
- Etkinleştirme konteynerleri (50 mm çapında) (cam gode),
- Dijital zamanlama birimi, kullanıldı.

3.1.3. Greftler

Allogreft

Allogreft olarak demineralize dondurulmuş kurutulmuş, insan kaynaklı, kortikokansellöz, 0.25-0.5 mm partikül büyüklüğünde greft materyali (Maxxeus Community Tissue Services, Ohio, USA) kullanıldı.

Ksenogreft

Ksenojenik greft materyali olarak sığır kaynaklı anorganik kemik grefti (sığır kaynaklı hidroksiapatit) (Integros Boneplus-xs® , Integros Sağlık Ürünleri Ar-Ge İmalat, İthalat, İhracat, San. ve Tic. Ltd. Şti., Adana, Türkiye) kortikokansellöz 0.25-0.5 mm partikül büyüklüğünde greft materyali kullanıldı.

Otogreft

Bikortikal defekt oluşturmak için 6 mm çaplı, 10 mm kullanım uzunluğu bulunan kesici özellikte trephine frez kullanıldı. Oluşturulan defektlerden alınan bikortikal kortikokansellöz kemikten, pens şeklinde bir kemik değirmeni (Şekil 2.5) kullanılarak partiküllü otogreft elde edildi.

3.1.4. Deney Gruplarının Oluşturulması

Bu çalışmada 12 adet deney hayvanı, öncelikle PRGF uygulanan (PRGF+greft, deney grubu) ve PRGF uygulanmayan (sedece greft, kontrol grubu) olmak üzere rastgele

iki ana gruba ayrıldı. Her bir hayvanın kalvaryasına 3 adet kritik boyutlu defekti oluşturulup, her bir defektin bir greft meteryeli ile ya da PRGF+greft karışımı ile doldurulması planlandı (Tablo 2).

Tablo 2 Deney gruplarının şeması

Gruplar	Otogreft Grubu (n)	Allogreft Grubu (n)	Ksenogreft grubu (n)
Kontrol	6	6	6
PRGF n: örneklem sayısı	6	6	6

3.2. Metot

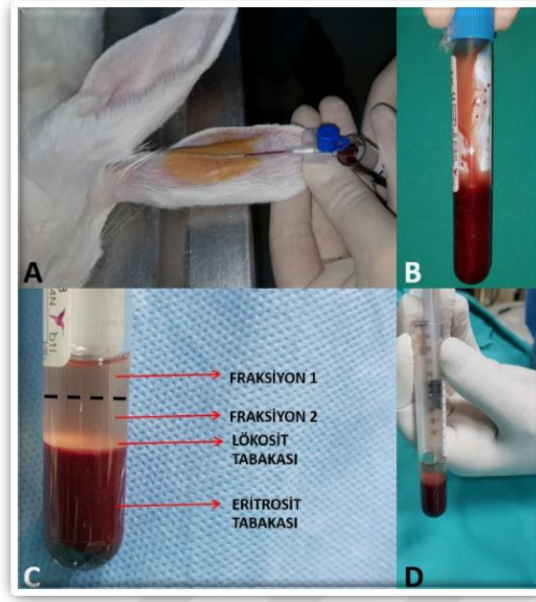
3.2.1. Deneyin Uygulanması

Her bir deney hayvanı intramuskuler 50 mg/kg Ketamin (Ketalar; Pfizer, İstanbul, Türkiye) ve 8mg/kg Xylazine (Rompun; Bayer, İstanbul, Türkiye) ile genel anestezi altına alındı. Genel anesteziyi takiben deney hayvanının kafasının üst kısmındaki tüyleri, kulakları birleştiren hayali bir hattan göz çukurlarının anterior kenarlarını birleştiren bir başka hayali hatta kadar tıraşlandı. Tıraşlanan alanın antisepsisi povidon-iyodin solüsyonu (Baticonol®, Dermosept, Türkiye) ile sağlandı ve bu bölge cerrahi alanı açıkta bırakacak şekilde delikli steril bir örtü ile örtüldü.

PRGF'nin Hazırlanması

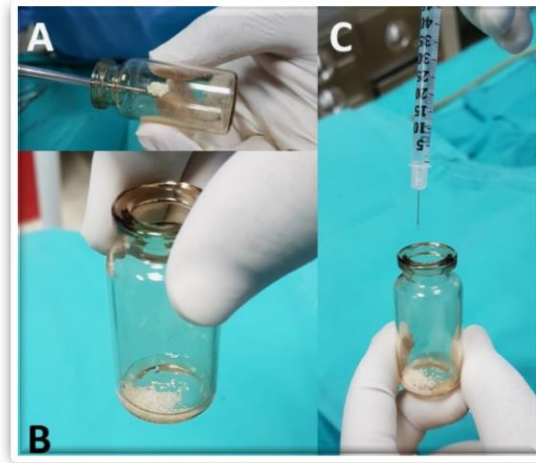
Denek hayvanının uyutulmasını takiben kulak povidon-iyodin solüsyonu ile silinerek antisepsi sağlandı. Kulak merkez arterinden 5ml kan alındı, alınan kan antikoagülan (sodyum sitrat) içeren mavi kapaklı tüpe konuldu ve yavaş hareketlerle ters-düz edilerek antikoagülan madde ile karışması sağlandı.

PRGF-Endoret kitine özel santrifüj cihazı ile (PRGF Sistem V, BTI-Biyoteknoloji Enstitüsü, Victoria, İspanya) üretici firmanın talimatları doğrultusunda Anitua^(288, 289) (1902 rpm, 580 G, 8 dakika) santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonucunda kan, yukarıdan aşağıya sıralı olarak, büyüme faktörlerinden fakir plazma tabakası (PPGF), büyüme faktörlerinden zengin plazma tabakası (PRGF), lökosit (buffy-coat) tabakası ve eritrosit tabakası olmak üzere 4 kısma ayrılmış oldu.



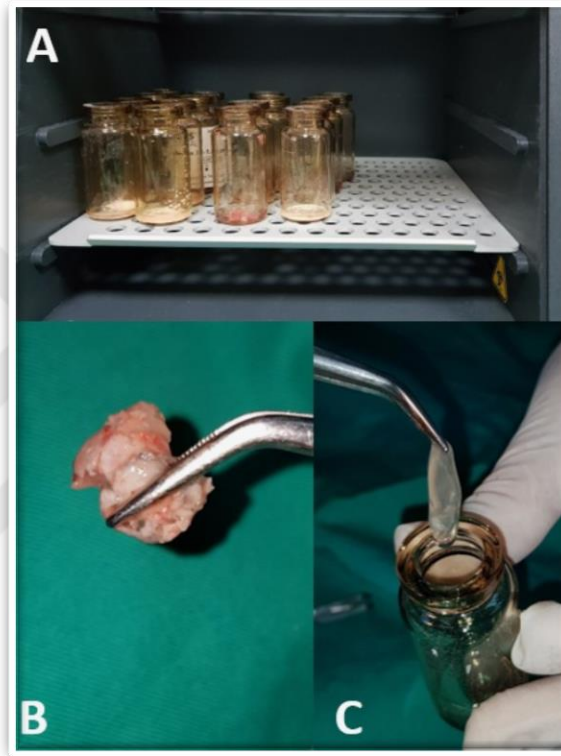
Şekil 2.1 (A) Deneğin santral kulak arterinden kan alınması, (B) Santrifülemeye hazır otolog kan, (C) Santrifürlenmiş otolog kan ve fraksiyonların görünümü, (D) Fraksiyonların ayrılması

PPGF ve PRGF tabakalarının ayrımı göz ile mümkün olmadığı için Anitua⁽²⁷⁵⁾'nın önerisi doğrultusunda ayırım noktası plazma tabakasının yaklaşık olarak orta kısmı olarak kabul edildi (Şekil 2.1). PPGF tabakası pipetlenerek beyaz kapaklı bir tüpe (herhangi bir madde ihtiva etmeyen tüp) konuldu ve tüp, fraksiyon 1 olarak işaretlendi.



Şekil 2.2 (A) Standart miktarda greftin cam kaba yerleştirilmesi, (B) Graft ve fraksiyon 2'nin karıştırılması, (C) Aktivatörün eklenmesi

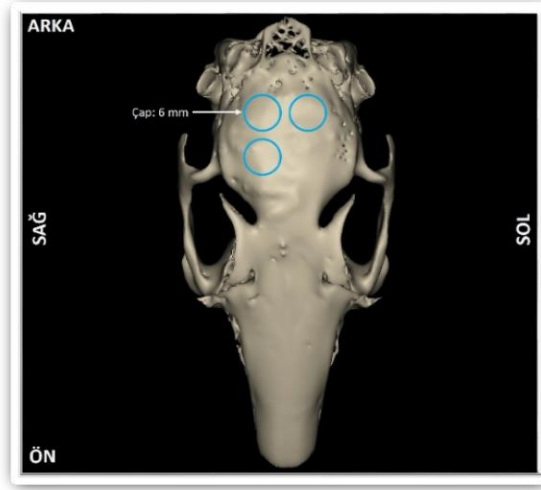
Aynı şekilde fraksiyon 2 kısmı da alınarak başka beyaz kapaklı tüpe konuldu ve fraksiyon 2 olarak işaretlendi. Fraksiyon 1 uygun bir cam kaba aktarıldı. Fraksiyon 2'ler ise uygun bir cam kapta greft materyalleri ile karıştırıldı. Her iki kaba da aktivatör (CaCl₂) eklendi (Şekil 2.2). Fraksiyon 1 ve greft ile karıştırılmış olan fraksiyon 2'ler plazmaterm cihazına (Plasmaterm H, BTI-Biyoteknoloji Enstitüsü, Victoria, İspanya) konuldu. Fraksiyon 2'ler 8 dk, fraksiyon 1'ler ise 20 dk sonra uygulamaya hazır halde cihazdan çıkarıldı (Şekil 2.3.).



Şekil 2.3 (A) Karışımların plazmaterm cihazındaki görünüşleri, (B) Plazmaterm cihazından çıkan otogreft ve aktive olmuş fraksiyon 2'nin görünüşü, (C) Aktive olmuş fraksiyon 1'in görünüşü

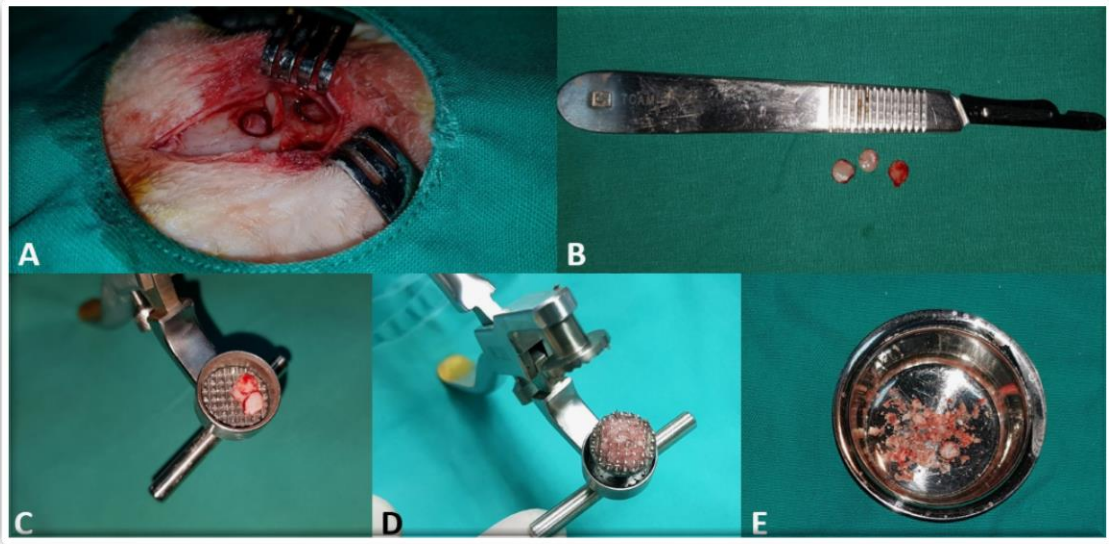
Cerrahi Operasyon

Her bir hayvan için, operasyon alanında 1:200,000 epinefrin ve 20 mg artikain içeren (Ultracain-DS; Hoechst Marion Roussel, İstanbul, Türkiye) 0,5 ml solüsyon ile lokal anestezi sağlandı. Sagittal sutura ile frontoparietal suturanın kesiştiği nokta ortada kalacak şekilde sagittal sutura paralel, tam kalınlık, 3 cm uzunluğunda insizyon yapıldı. Periostun bütünlüğünü bozmamaya özen gösterilerek parietal ve frontal kemiklerin bir kısmı (operasyon için yeterli olan en küçük alan) açığa çıkarıldı.



Şekil 2.4 3 boyutlu model üzerinde defekt alanının planlanması

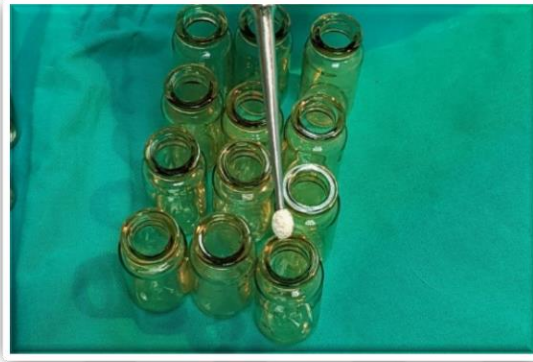
Bir adet sol parietal kemikte, bir adet sağ parietal kemikte ve bir adet de sağ frontal kemikte olacak şekilde 3 defekt alanı belirlendi (Şekil 2.4). Bir trephine frez 10.000 rpm hız ve 40 Nm tork ile çalıştırılarak oda sıcaklığındaki % 0.9 izotonik sodyum klorür solüsyonu ile (Biofleks, Osel İlaç San. ve Tic. A.Ş. Türkiye) soğutma yapılarak, belirlenen alanlarda 6 mm çapında bikortikal defektler oluşturuldu.



Şekil 2.5 (A) Otojen kemik elde edilmesi, (B) Bir denekten elde edilen toplam otogreft miktarı, (C) ve (D) Otogreftin partiküllü hale getirilmesi, (E) Partiküllü otogreftin son hali,

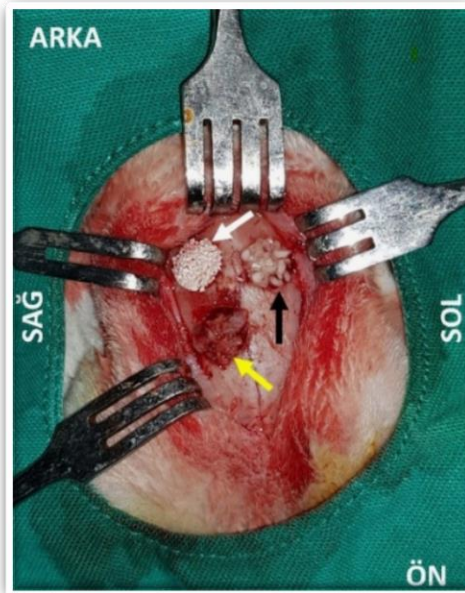
Defektlerden çıkan otogreftler daha sonra kullanılmak üzere bir kemik öğütücü yardımı ile kortikokansellöz partiküllü greft materyali haline getirildi (Şekil 2.5).

Defektlerin iyileşmelerinin birbirlerinden etkilenmemeleri için aralarında en az 3 mm sağlam kemik bırakılmaya özen gösterildi. Kanama kontrolü sağlandıktan sonra greftleme aşamasına geçildi. Greftleme yapılırken greftin defekti tam doldurmasına, taşmamasına, duramatere baskı yapmamasına ve greft partiküllerinin yakın boyutlarda olmasına dikkat edildi.



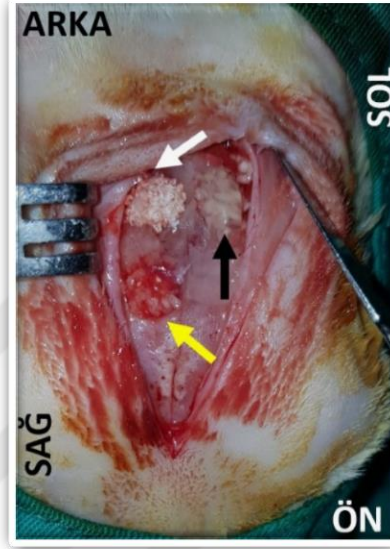
Şekil 2.6 Volkman küret ile, konulan greft miktarının standardize edilmesi

Kullanılan greft miktarının standart olması açısından her bir defekte bir ölçek kemik grefti konuldu ve ölçek olarak Volkman küret 10 x 6 mm (Standard curette 17 cm 140803, Kruuse, Denmark) kullanıldı. Bir ölçekte yaklaşık olarak 0.06 cc grefte denk gelmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.7 Kontrol gruplarının oluşturulması (Beyaz ok KK grubu, siyah ok KA grubu, sarı ok KO grubunu göstermektedir.)

1. Kontrol Grubuna greftler aşağıdaki şekilde uygulandı (Şekil 2.7):
 - A. Sağ frontal defekte yalnızca otogreft (KO, grubu)
 - B. Sağ parietal defekte yalnızca ksenogreft (KK, grubu)
 - C. Sol parietal defekte yalnızca allogreft (KA, grubu)



Şekil 2.8 PRGF gruplarının oluşturulması (Beyaz ok PK grubu, siyah ok AA grubu, sarı ok PO grubunu göstermektedir.)

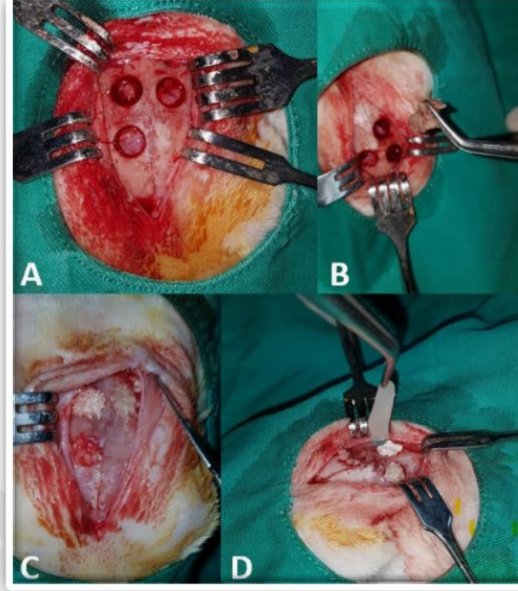
2. Deney Grubunda (PRGF Grubu) ise greftler, PRGF protokolü ile elde edilen fraksiyon 2 ile karıştırılıp aktive edildi. 8 dk plazmaterm (Plazmaterm H, BTI-Biyoteknoloji Enstitüsü, Victoria, İspanya) cihazında bekletildi ve aşağıdaki şekilde uygulandı (Şekil 2.8).

- A. Sağ frontal defekte otogreft+PRGF (PO, grubu)
- B. Sağ parietal defekte ksenogreft +PRGF (PK, grubu)
- C. Sol parietal defekte allogreft +PRGF (PA, grubu)

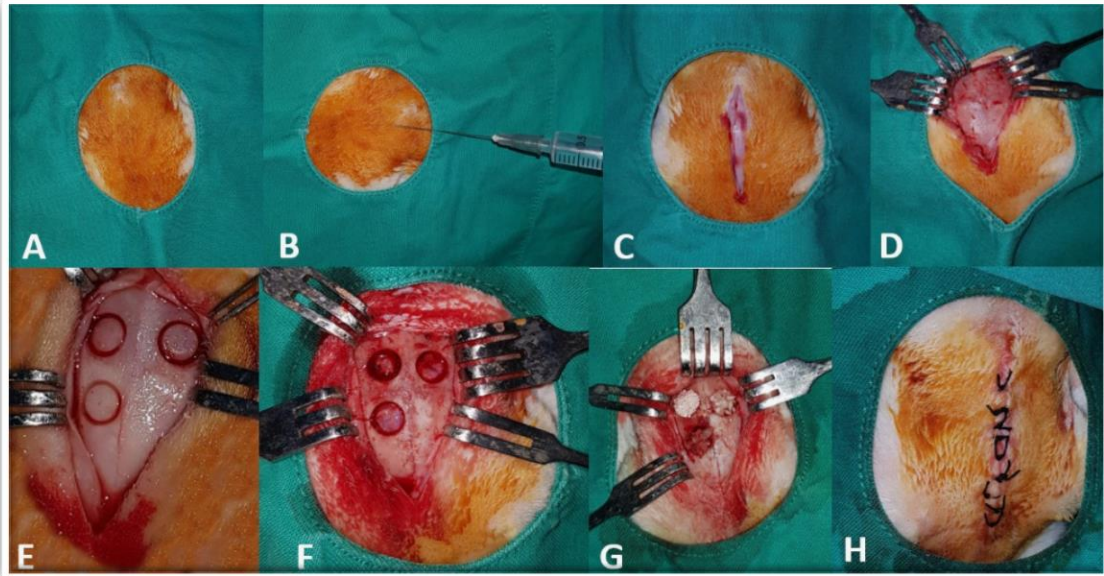
Kontrol grubunda herhangi bir membran materyali kullanılmadı, deney grubunda ise defektlerin üzeri PRGF protokolünün bir avantajı olarak elde edilen aktive edilmiş fraksiyon 1 materyali ile örtüldü (Şekil 2.9).

Operasyon sahası tabakalar halinde cilt altı dokular rezorbe olabilen suture (4/0 Vicryl®, Johnson & Johnson, Brüksel, Belçika) ile sonra da cilt ipek suture (İpek Suture

4/0, Dođsan, Trabzon, Türkiye) ile kapatıldı (Şekil 2.10). Operasyon alanı serum fizyolojik ile temizlenip, insizyon hattına Neo Caf Sprey (İntervet, MSD, İtalya) uygulandı.



Şekil 2.9 PRGF gruplarının cerrahi aşamaları (A) Boş defekt görüntüsü, (B) Defekte greft ve PRGF karışımının yerleştirilmesi, (C) Defektlerin greftli görüntüsü (D) Fraksiyon 1 ile defektlerin üzerinin örtülmesi



Şekil 2.10 (A) Cerrahi alanın hazırlanması ve antisepsisi, (B) Operasyon alanının anestezisi, (C) İnsizyon hattı, (D) Derinin ve periostun eleve edilerek kalvarya kemiklerine ulaşılması, (E) Trephine frez

ile bikortikal kemik kesilerinin oluşturulması, (F) Boş defektlerin görüntüsü, (G) Defektlerin greftlendikten sonraki görüntüsü, (H) Flebin kapatılması

Postoperatif Bakım

Operasyon sonrası postoperatif ağrı ve enfeksiyon kontrolü amacıyla analjezik (Tramadol, 1mg/kg; Contramal, Abdi İbrahim, İstanbul, Türkiye) ve antibiyotik (Cefazolin sodium, 50 mg/kg; Sefazol, M Nevzat, İstanbul, Türkiye) 2x1, i.m., 5 gün uygulandı. Ayrıca 5 gün boyunca Neo Caf Sprey (İntervet, MSD, İtalya) ile cerrahi alanın pansumanı yapıldı. Hayvanların yem ve su tüketimleri, vücut ağırlıkları ve genel durumları belirli günlük olarak uzman bir veteriner hekim tarafından 28 gün takip edildi. Kafes temizliğine ve ortam koşullarının iyi olmasına dikkat edildi.

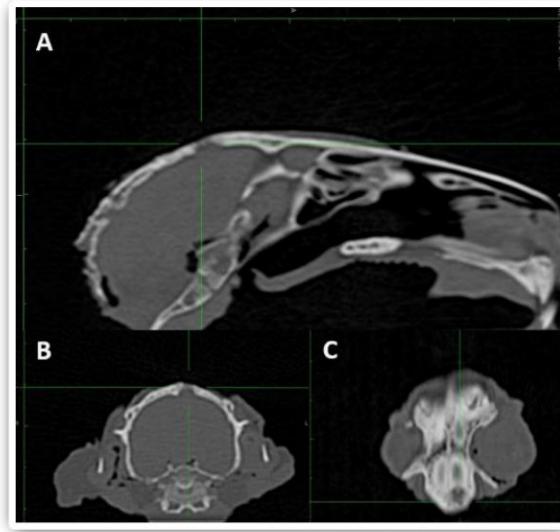
3.2.2. Deneyin Sonlandırılması

28 gün sonra yüksek doz Ketamin ve Xylazine HCL kullanılarak sakrifiye edilen hayvanların kafa kemiklerinin radyografik görüntüleri alındı. Radyolojik işlemlerin ardından, defektleri içeren kalvaryal kemikler alındı. Yumuşak doku kalıntıları, kas ataçmanları ve periost diseke edildikten sonraki kalan kemik dokusu seyreltilmiş formalin (% 10) içerisinde fikse edildi.

3.2.3. Örneklerin incelenmesi

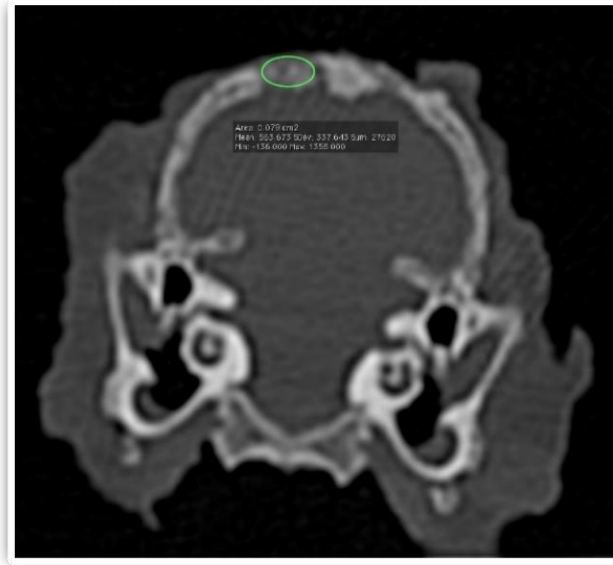
Radyolojik İnceleme

Örneklerin radyografilerinin alınması ve radyografik görüntülerin değerlendirilmesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji Anabilim Dalı'nda yapıldı. Deneklerin kafa kemiklerinin ve defektlerin yüksek çözünürlüklü bilgisayarlı tomografi görüntüsü, çok kesitli tomografi cihazında (Aquilion 16 system, Toshiba Medical Systems Corporation, Tokyo, Japan) küçük hayvan tarama protokolüne göre elde edildi. Örneklerin görüntüsü 1 mm'lik kolimasyonda, 250 mAS ve 120 kV cihaz değerlerinde, 512x512 matriks boyutunda, 0,5 mm kesit kalınlığında ve kemik algoritması baz alınarak oluşturuldu (Şekil 2.11).



Şekil 2.11 Kontrol ve PRGF gruplarında defekt bölgesindeki kemiğin bilgisayarlı tomografi görüntüleri (A) Sagittal kesit görünümü, (B) Koronal kesit görünümü (C) Aksiyal kesit görünümü

Defektlerde oluşan kemiğin yoğunluğu, Osirix 10.0 programı (Anova, Brezilya) kullanılarak Haunsfield Unit (HU) cinsinden ölçüldü (Şekil 2.12). Sonuçların güvenilirliği açısından bu işlem 2 kez tekrarladı. Elde edilen sonuçların ortalamaları nihai değerler olarak kabul edildi.



Şekil 2.12 Defektlerde kemiğin yoğunluğunun Osirix 10.0 programı (Anova, Brezilya) kullanılarak, Haunsfield Unit (HU) cinsinden ölçülmesi

Stereolojik İnceleme

Örneklerin stereolojik incelemeye hazırlanma aşamaları Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

% 10'luk formalin (% 40'luk formaldehit 1 ml, distile su 9 ml) içerisinde 10 gün boyunca fikse edilen dokular, 21 gün boyunca % 5'lik formik asit solüsyonunda dekalsifiye edildi. Dekalsifikasyon işlemi sonucunda örnekler distile su ile yıkandı. Alkol serileri ile (% 70 - % 80 - % 96 - % 100) dehidrate edilen dokulara ksilol uygulanıp saydamlığı artırıldı ve sıvı parafin (58-65 °C) içerisine yerleştirildi.

Parafin soğuduktan sonra oluşan bloklar bir mikrotoma (Leica Ultracut UCT, Leica Microsystems GmbH, Almanya) yerleştirilerek 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Alınan kesitler sıcak su banyosundan geçirildi (35-40 °C). Banyodan geçirilen doku kesitleri lam üzerine alındı ve 1 gece etüvde bekletildi. Daha sonra dokudaki parafini tamamen temizlemek ve saydamlaştırmak için ksilol ile muamele edildi. Elde edilen preparatları mikroskop altında görünür hale getirmek için Hematoksilen-Eosin ile boyandı. Son olarak boyanmış preparatlar entellan denilen özel bir madde ile kapatılarak kurumaya bırakıldı.

Örneklerin histolojik incelemesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında bulunan bilgisayar destekli stereolojik analiz sisteminde (Stereoinvestigator 9.0. MicroBrieldField; Colchester; USA) Cavalieri Hacim Hesaplama Yöntemi kullanılarak defektlerdeki kemik miktarı, bağ dokusu miktarı ve yeni damar dokusu miktarı değerlendirildi.

Cavalieri Hacim Hesaplama Yöntemi

Bu yöntem belirli kalınlıkta alınan örneklerin üzerinde yapılan ölçümler ile istenilen doku miktarının toplam hacmini belirlemeye yardımcı olur. En sık kullanılan hacim hesaplama yöntemlerinden birisidir.

İncelenecek yapıdan belirli kalınlıkta kesitler alınır. Alınan kesitlerin aynı yöne bakan yüzey alanları hesaplanır. Histolojik incelemelerde bu yöntem kullanılırken kesitin yüzey alanında belirli bir yapının hacmi hesaplanmak isteniyorsa “noktalı alan ölçüm cetveli” kullanılır. Düzgün aralıklarla yerleştirilmiş nokta ya da şekillerden oluşan bu cetvel alınan kesit görüntüsünün üzerine konur. Hacmi hesaplanmak istenen yapının üzerine isabet eden nokta sayısı sayılır, noktanın temsil ettiği alan ve belirlenen kesit

kalınlığı ile çarpılır böylece istenen yapının toplam hacmi hesaplanabilir. Cavalieri Hacim Hesaplama formülü aşağıdaki gibidir.

$$V = t \times a/p \times \sum P$$

V= hacim

t= kesit kalınlığı

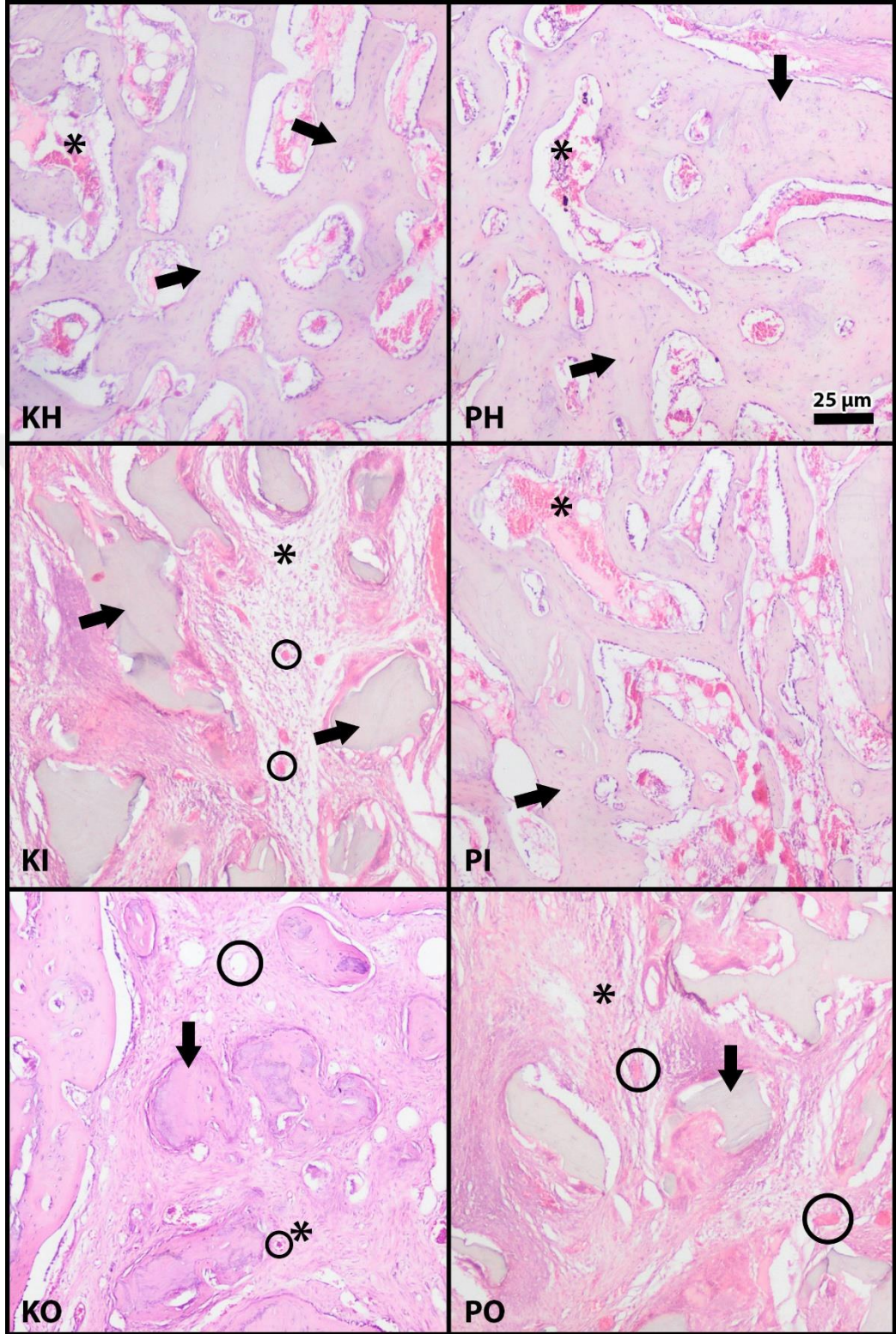
a/p= ızgarada bir noktanın temsil ettiği alan

$\sum P$ = dilimlerin yüzeylerine düşen toplam nokta

İstatistiksel Değerlendirme

Elde edilen verilerin işlenmesi için SPSS 21.0 programı (IBM Corporation, USA) kullanıldı. Gruplar arası karşılaştırmalar One Way ANOVA testi, ikili karşılaştırmalar ise Tukey-Post-Hoc testi ile değerlendirildi ve $P < 0,05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR



Şekil 3.1 Gruplara ait yeni kemik alanlarının temsili histolojik görüntüleri. Oklar yeni kemik alanlarını, yıldızlar rejenerasyon alanında yerleşik bağ doku infiltrasyonunu, yuvarlaklar ise bağ dokuda bulunan kan damarlarını göstermektedir. Hematoksilen-Eosin boyama.

4.1. Klinik Bulgular

Bu çalışmanın anestezi ve deney aşamasında herhangi bir komplikasyon gelişmedi. Postoperatif dönemde cerrahi operasyon bölgesinde inflamasyona bağlı 4-5 gün süren hafif ödem görüldü. İnsizyon hattında herhangi bir açılma, pü formasyonu ya da enfeksiyona ait bir bulgu gözlenmedi.

4.2. Stereolojik Analiz Bulguları

Çalışmamızda deney hayvanlarının bütün defektlerinden alınan örnekler defekt bölgesindeki kemik dokusu, bağ dokusu ve damar dokusu miktarları stereolojik analizler ile ölçüldü. Bu analizler için oluşturulan örneklerden bazıları Şekil 3.1’de gösterilmiştir. Elde edilen verilerin istatistiksel değerlendirme sonuçları aşağıdaki gibidir.

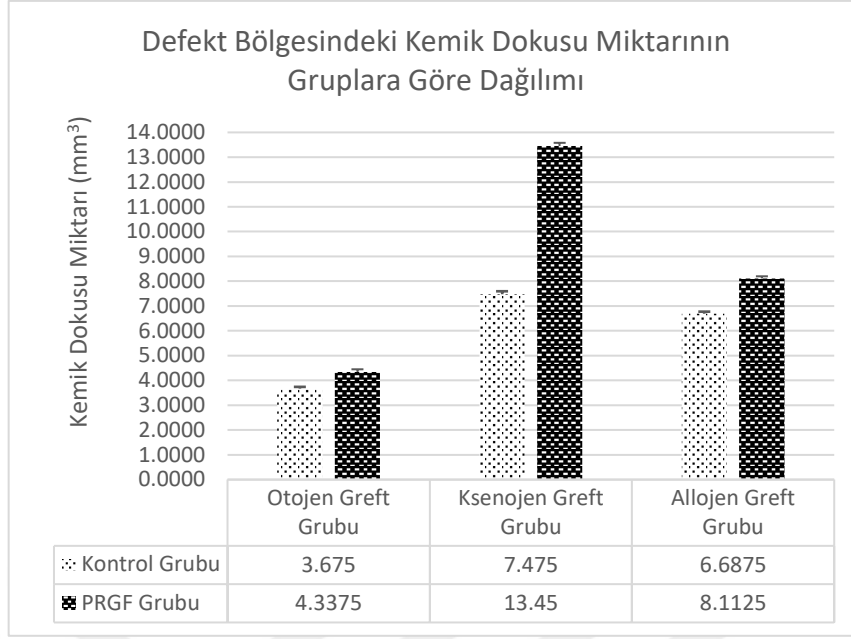
4.2.1. Defekt Bölgesindeki Kemik Dokusu Miktarının Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi

Kontrol gruplarının ve PRGF gruplarının hem kendi aralarında hem de birbirleri ile karşılaştırılmaları sonucu bulunan farklar ileri derecede anlamlıdır ($p=0,00$). Tüm gruplar arasında defekte ki kemik dokusu miktarı en yüksek bulunan PK grubuyken ($13,4500 \pm 0,12910 \text{ mm}^3$), en düşük kemik dokusu miktarına sahip grup KO grubudur ($3,6750 \pm 0,06455 \text{ mm}^3$).

Kontrol ve PRGF gruplarının kemik dokusu miktarı değerleri Şekil 3.2’de, ortalama değerleri ve standart sapma değerleri ise Tablo 3.1’de gösterildi.

Tablo 3.1 Kontrol ve PRGF gruplarında ortalama kemik dokusu miktarı değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm^3)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Kemik Dokusu Miktarı (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm^3)
KO	$3,6750 \pm 0,06455$
KK	$7,4750 \pm 0,11902$
KA	$6,6875 \pm 0,08539$
PO	$4,3375 \pm 0,11087$
PK	$13,4500 \pm 0,12910$
PA	$8,1125 \pm 0,08539$



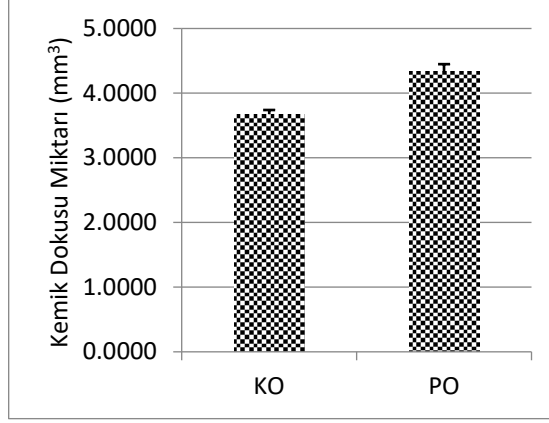
Şekil 3.2 Kontrol ve PRGF gruplarında kemik dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Kontrol gruplarının kendi aralarında karşılaştırılmasında KK grubunda kemik dokusu miktarının ($7,4750 \pm 0,11902 \text{ mm}^3$) KO ve KA gruplarına göre anlamlı derecede fazla olduğu görüldü ($p=0,00$). En düşük kemik dokusu miktarı ise KO grubunda ölçüldü ($3,6750 \pm .0,6455 \text{ mm}^3$).

PRGF gruplarındaki kemik dokusu miktarı kendi içerisinde değerlendirildiğinde PK grubunun değerleri ($13,4500 \pm 0,12910 \text{ mm}^3$) diğer PRGF gruplarına göre anlamlı derecede fazla olduğu gözlemlendi ($p=0,00$). Bu gruplar arasında en düşük kemik dokusu miktarı PO grubunda bulundu ($4,3375 \pm 0,11087 \text{ mm}^3$), (Tablo 3.1 ve Şekil 3.2).

Tablo 3.2 KO ve PO gruplarında ortalama kemik dokusu miktarı değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm³)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Kemik Dokusu Miktarı (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm ³)
KO	$3,6750 \pm 0,06455$
PO	$4,3375 \pm 0,11087$

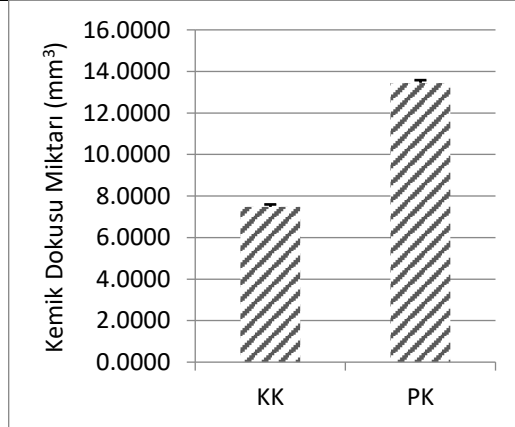


Şekil 3.3 KO ve PO gruplarında kemik dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Otojen kemik grefti kullanılan gruplar kendi içerisinde karşılaştırıldığında PO grubunda ölçülen kemik dokusu miktarı ($4,3375 \pm 0,11087 \text{ mm}^3$), KO grubuna ($3,6750 \pm 0,06455 \text{ mm}^3$) göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,00$) (Tablo 3.2 ve Şekil 3.3).

Tablo 3.3 KK ve PK gruplarında ortalama kemik dokusu miktarı değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm³)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Kemik Dokusu Miktarı (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm ³)
KK	7,4750 \pm 0,11902
PK	13,4500 \pm 0,12910

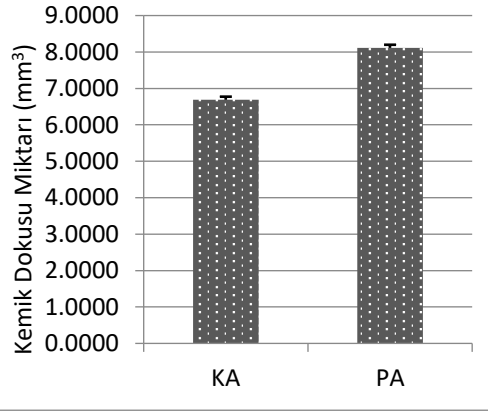


Şekil 3.4 KK ve PK gruplarında kemik dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Ksenogreft kullanılan gruplar birbirleri arasında karşılaştırıldığında PK grubunda ölçülen kemik dokusu miktarı ($13,4500 \pm 0,12910 \text{ mm}^3$), KK grubuna ($7,4750 \pm 0,11902 \text{ mm}^3$) göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,00$), (Tablo 3.3 ve Şekil 3.4).

Tablo 3.4 KA ve PA gruplarında ortalama kemik dokusu miktarı değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm³)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Kemik Dokusu Miktarı (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm ³)
KA	$6,6875 \pm 0,08539$
PA	$8,1125 \pm 0,08539$



Şekil 3.5 KA ve PA gruplarında kemik dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Allojen kemik grefti kullanılan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında PA grubunda ölçülen kemik dokusu miktarı ($8,1125 \pm 0,08539 \text{ mm}^3$), KA grubuna ($6,6875 \pm 0,08539 \text{ mm}^3$) göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,00$), (Tablo 3.4 ve Şekil 3.5).

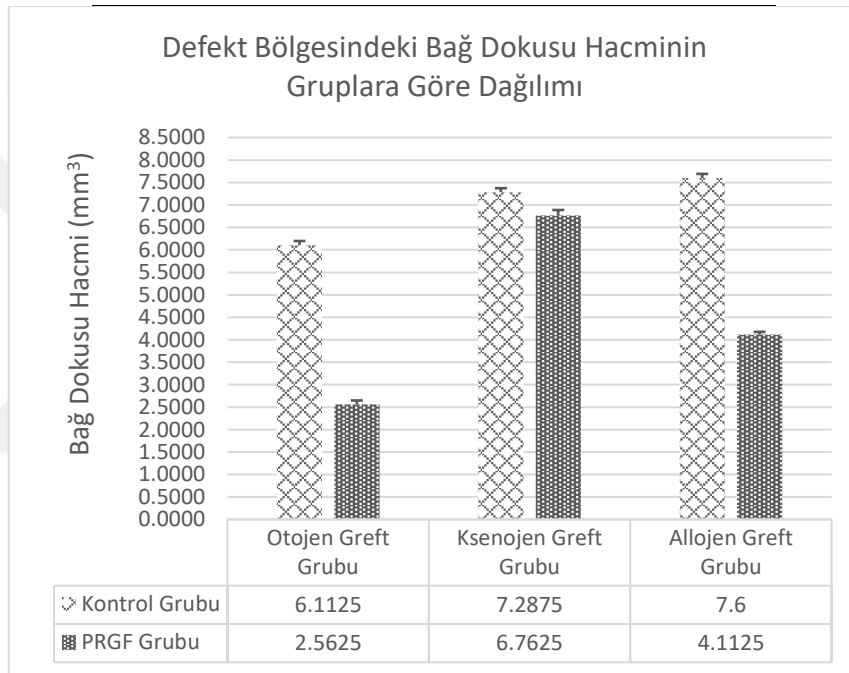
4.2.2. Defekt Bölgesindeki Bağ Dokusu Hacminin Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi

Kontrol gruplarının ve PRGF gruplarının bağ dokusu hacmi açısından hem kendi aralarında hem de birbirleri ile karşılaştırılmaları sonucu bulunan farklar ileri derecede anlamlıdır ($p=0,00$). Tüm gruplar arasında bağ dokusu hacmi en yüksek bulunan KA grubuyken ($7,6000 \pm 0,09129 \text{ mm}^3$), en düşük bağ dokusu hacmine sahip grup PO grubudur ($4,1125 \pm 0,06292 \text{ mm}^3$).

Kontrol ve PRGF gruplarının bağ dokusu hacmi değerleri Şekil 3.6'te, ortalama değerleri ve standart sapma değerleri ise Tablo 3.5'da gösterildi.

Tablo 3.5 Kontrol ve PRGF gruplarında ortalama bağ dokusu hacmi değerleri (Ortalama ± Standart Sapma) (mm³)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Bağ Dokusu Hacmi (Ortalama ± Standart Sapma) (mm ³)
KO	6,1125 ± 0,08539
KK	7,2875 ± 0,08539
KA	7,6000 ± 0,09129
PO	2,5625 ± 0,08539
PK	6,7625 ± 0,12500
PA	4,1125 ± 0,06292



Şekil 3.6 Kontrol ve PRGF gruplarında bağ dokusu hacmi değerlerinin gruplara göre dağılımı

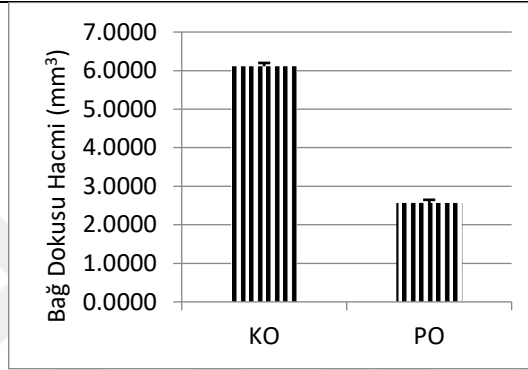
Kontrol gruplarının kendi aralarında karşılaştırılmasında KA grubunda bağ dokusu hacminin ($7,6000 \pm 0,09129 \text{ mm}^3$) KO ve KK gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu görülmüştür ($p=0,00$). Kontrol grubu içerisinde en düşük bağ dokusu hacmi ise KO grubunda ölçüldü ($3,6750 \pm .0,6455 \text{ mm}^3$).

PRGF gruplarındaki bağ dokusu hacmi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde PK grubunun değerleri ($6,7625 \pm 0,12500 \text{ mm}^3$) diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu gözlemlendi ($p=0,00$). Bu gruplar arasında en düşük kemik dokusu miktarı PO grubunda bulundu ($2,5625 \pm 0,08539 \text{ mm}^3$), (Tablo 3.5 ve Şekil 3.6).

Hem kontrol hem de PRGF'li gruplarında en düşük bağ dokusu hacmi otogreft kullanılan gruplarda görüldü.

Tablo 3.6 KO ve PO gruplarında ortalama bağ dokusu hacmi değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm³)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Bağ Dokusu Hacmi (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm ³)
KO	6,1125 \pm 0,08539
PO	2,5625 \pm 0,08539

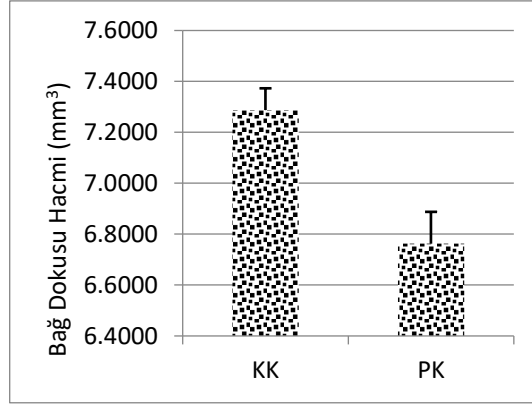


Şekil 3.7 KO ve PO gruplarında bağ dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Otojenik kemik grefti kullanılan gruplar birbirleri ile karşılaştırıldığında PO grubunda ölçülen bağ dokusu hacmi (2,5625 \pm 0,08539 mm³), KO grubuna (6,1125 \pm 0,08539 mm³) göre anlamlı derecede düşüktür (p=0,00), (Tablo 3.6 ve Şekil 3.7).

Tablo 3.7 KK ve PK gruplarında ortalama bağ dokusu hacmi değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm³)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Bağ Dokusu Hacmi (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm ³)
KK	7,2875 \pm 0,08539
PK	6,7625 \pm 0,12500

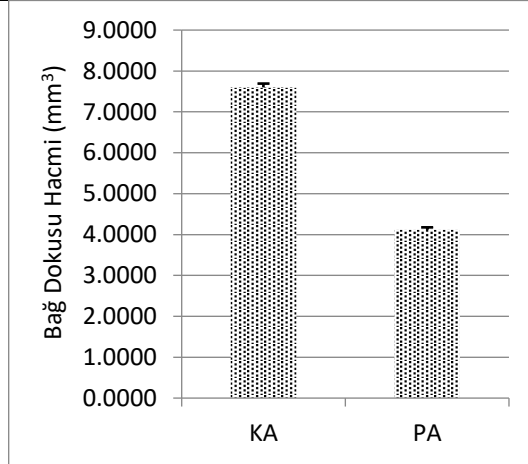


Şekil 3.8 KK ve PK gruplarında bağ dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Ksenojenik kemik grefti kullanılan gruplar birbirleri arasında karşılaştırıldığında PK grubunda ölçülen bağ dokusu hacmi ($6,7625 \pm 0,12500 \text{ mm}^3$), KK grubuna ($7,2875 \pm 0,08539 \text{ mm}^3$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p=0,00$), (Tablo 3.7 ve Şekil 3.8).

Tablo 3.8 KA ve PA gruplarında ortalama bağ dokusu hacmi değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm^3)

GRUPLAR	Defekt Bölgesindeki Bağ Dokusu Hacmi (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm^3)
KA	7,6000 \pm 0,09129
PA	4,1125 \pm 0,06292



Şekil 3.9 KA ve PA gruplarında bağ dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Allojenik kemik grefti kullanılan gruplar birbirleri arasında karşılaştırıldığında PA grubunda ölçülen bağ dokusu hacmi ($4,1125 \pm 0,06292 \text{ mm}^3$), KA grubuna ($7,6000$

$\pm 0,09129 \text{ mm}^3$) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüktür ($p=0,00$), (Tablo 3.8 ve Şekil 3.9).

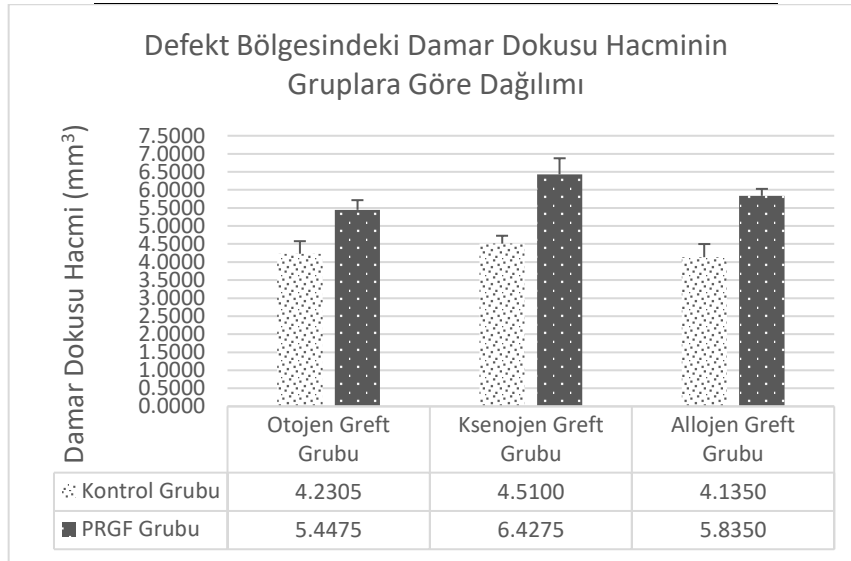
4.2.3. Defekt Bölgesindeki Damar Dokusu Hacminin Stereolojik Olarak Değerlendirilmesi

Kontrol gruplarının ve PRGF gruplarının damar dokusu hacimleri hem kendi aralarında hem de birbirleri ile karşılaştırıldı. Tüm gruplar arasında damar dokusu hacmi en yüksek bulunan PK grubuyken ($6,4275 \pm 0,44821 \text{ mm}^3$), en düşük damar dokusu hacmine sahip grup KA grubudur ($4,1350 \pm 0,36428 \text{ mm}^3$).

Kontrol ve PRGF gruplarının damar dokusu hacmi değerleri Şekil 3.10'da, ortalama değerleri ve standart sapma değerleri ise Tablo 3.9'da gösterildi.

Tablo 3.9 Kontrol ve PRGF gruplarında ortalama damar dokusu hacmi değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm^3)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Damar Dokusu Hacmi (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm^3)
KO	$4,2305 \pm 0,34743$
KK	$4,5100 \pm 0,21939$
KA	$4,1350 \pm 0,36428$
PO	$5,4475 \pm 0,26813$
PK	$6,4275 \pm 0,44821$
PA	$5,8350 \pm 0,19296$



Şekil 3.10 Kontrol ve PRGF gruplarında damar dokusu hacmi değerlerinin gruplara göre dağılımı

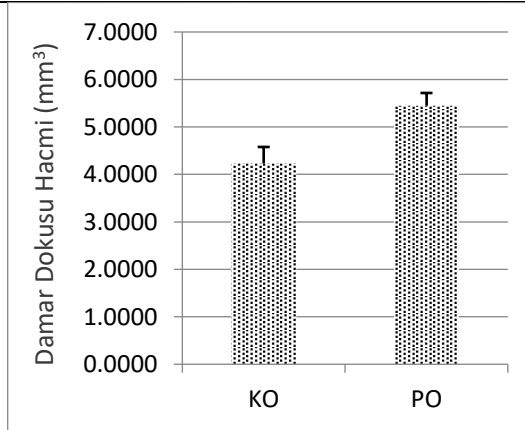
Kontrol gruplarının kendi aralarında karşılaştırıldığında KK grubunda damar dokusu hacminin ($7,6000 \pm 0,09129 \text{ mm}^3$) KO ve KA gruplarına göre fazla olduğu görülmüştür ancak aradaki fark anlamlı değildir. ($p > 0,05$). Kontrol grubu içerisinde en düşük damar dokusu hacmi ise KA grubunda ölçüldü ($4,1350 \pm 0,36428 \text{ mm}^3$).

PRGF gruplarındaki damar dokusu hacimleri değerlendirildiğinde PK grubunun değerlerinin ($6,4275 \pm 0,44821 \text{ mm}^3$) diğer gruplara göre fazla olduğu gözlemlendi ancak aradaki fark PK ile PO grupları arasında anlamlıyken ($p < 0,05$), PK ile PA grupları arasında anlamsızdır ($p > 0,05$). Bu gruplar arasında en düşük damar dokusu miktarı PO grubunda bulundu ($5,4475 \pm 0,26813 \text{ mm}^3$), (Tablo 3.9 ve Şekil 3.10).

Hem kontrol hem de PRGF'li gruplarında en yüksek damar dokusu hacmi ksenogreft kullanılan gruplarda görüldü.

Tablo 3.10 KO ve PO gruplarında ortalama damar dokusu hacmi değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm^3)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Damar Dokusu Hacmi (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm^3)
KO	$4,2305 \pm 0,34743$
PO	$5,4475 \pm 0,26813$

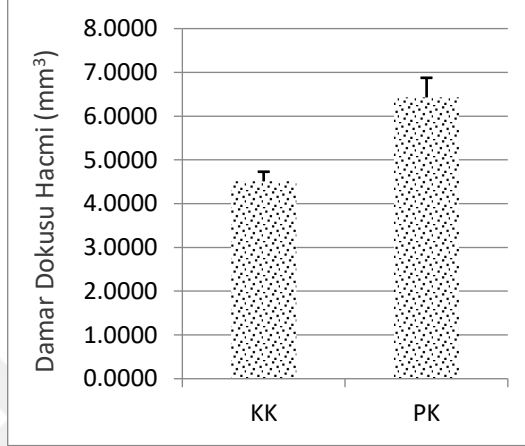


Şekil 3.11 KO ve PO gruplarında damar dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Otojenik kemik grefti kullanılan gruplar karşılaştırıldığında PO grubunda ölçülen damar dokusu hacmi ($5,4475 \pm 0,26813 \text{ mm}^3$), KO grubuna ($4,2305 \pm 0,34743 \text{ mm}^3$) göre anlamlı derecede yüksektir ($p=0,00$), (Tablo 3.10 ve Şekil 3.11).

Tablo 3.11 KK ve PK gruplarında ortalama damar dokusu hacmi değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm³)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Damar Dokusu Hacmi (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm ³)
KK	4,5100 \pm 0,21939
PK	6,4275 \pm 0,44821

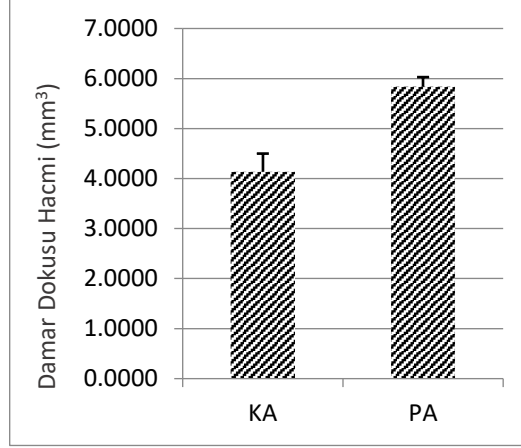


Şekil 3.12 KK ve PK gruplarında damar dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

Ksenogreft kullanılan gruplar birbirleri arasında karşılaştırıldığında PK grubunda ölçülen damar dokusu hacmi (6,4275 \pm 0,44821 mm³), KK grubuna (4,5100 \pm 0,21939 mm³) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir (p=0,00), (Tablo 3.11 ve Şekil 3.12).

Tablo 3.12 KA ve PA gruplarında ortalama damar dokusu hacmi değerleri (Ortalama \pm Standart Sapma), (mm³)

GRUPLAR	Defekt Bölgesindeki Damar Dokusu Hacmi (Ortalama \pm Standart Sapma) (mm ³)
KA	4,1350 \pm 0,36428
PA	5,8350 \pm 0,19296



Şekil 3.13 KA ve PA gruplarında damar dokusu miktarı değerlerinin gruplara göre dağılımı

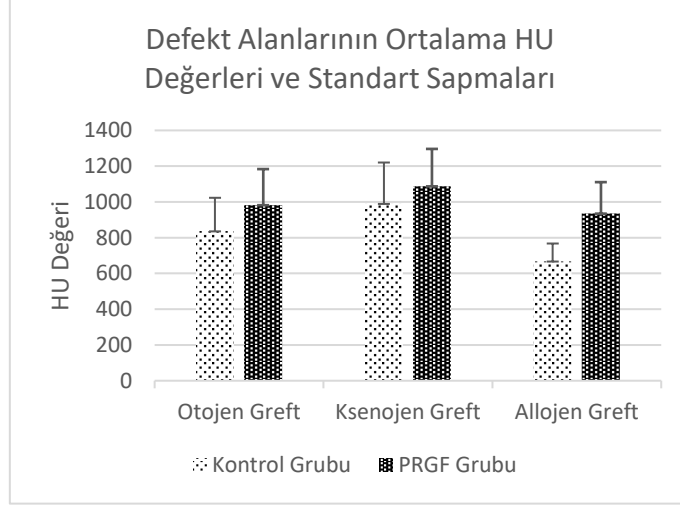
Allogreft kullanılan gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında PA grubunda ölçülen damar dokusu hacmi ($5,8350 \pm 0,19296$ mm³), KA grubuna ($4,1350 \pm 0,36428$ mm³) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($p=0,00$), (Tablo 3.12 ve Şekil 3.13).

4.3. Radyolojik Bulgular

Defekt bölgesindeki kemik yoğunluğu PA grubunda ($935,25 \pm 175,404$ HU) KA grubuna ($667,416 \pm 99,93767$ HU) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksektir ($P<0,05$). PK grubunda ($1088 \pm 208,4126$ HU) KK grubuna ($989,667 \pm 230,7554$ HU) göre ve PO grubunda ($983,5 \pm 201,1017$ HU) KO grubuna ($836,2500 \pm 186,8885$ HU) göre kemik yoğunluğu sayısal olarak yüksektir. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($P>0,05$), (Tablo 3.13 ve Şekil 3.14).

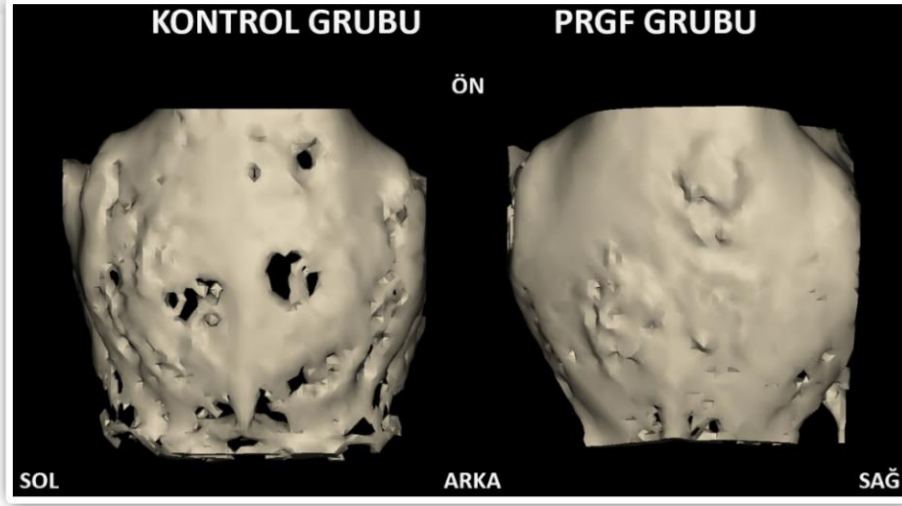
Tablo 3.13 Kontrol ve PRGF gruplarında defekt bölgesindeki kemiğin ortalama mineral yoğunluğu (Ortalama ± Standart Sapma), (HU)

Gruplar	Defekt Bölgesindeki Mineral Yoğunluğu (Ortalama ± Standart Sapma) (HU)
KO	$836,2500 \pm 186,8885$
KK	$989,667 \pm 230,7554$
KA	$667,4167 \pm 99,93767$
PO	$983,5 \pm 201,1017$
PK	$1088 \pm 208,4126$
PA	$935,25 \pm 175,404$



Şekil 3.14 Kontrol ve PRGF gruplarında defekt bölgesindeki kemiğin ortalama mineral yoğunluğunun gruplara göre dağılımı

Benzer şekilde deneklerin kalvaryalarının 3 boyutlu tomografi görüntülerini incelediğimizde defektlerde oluşan kemik miktarlarının PO grubunda KO grubuna göre PK grubunda KK grubuna göre ve PA grubunda KA grubuna göre daha fazla olduğu makroskobik olarak gözlemlendi (Şekil 3.15).



Şekil 3.15 Kontrol ve PRGF gruplarında defekte oluşan kemiğin 3 boyutlu bilgisayarlı tomografi datası ile oluşturulan sanal modellerde ki görünümü

5. TARTIŞMA

Tıp alanındaki deneysel çalışmalarda deney hayvanları sıklıkla kullanılmaktadır. Koyun, maymun, domuz, köpek vb. hayvanlar kullanılmakla birlikte üretimlerinin kolaylığı, tek seferde fazla birey elde edebilme, olgunluğa ulaşma sürelerinin nispeten kısa olması, bakım kolaylığı ve bakım maliyetlerinin düşük olması gibi avantajları nedeni ile sıçan, fare ve tavşan sıklıkla tercih edilmektedir. Tavşanlar cerrahi operasyonun ağırlığını kaldırabilme açısından sıçan ve fareye göre daha dirençlidir. Ayrıca tavşanın kemikleri sıçan ve fareye göre daha hacimli olduğundan defekt oluşturmada ve greft uygulamada güvenlik ve kolaylık sağlar (290).

Tavşanlarda osteogenesiz insanlara göre oldukça hızlıdır. Ancak temelde kemik onarım mekanizmaları benzerdir (291). Bu sebeple kemik defektlerinin iyileşmesini olumlu veya olumsuz etkileyen faktörlerin, maddelerin ve yöntemlerin incelenmesinde kullanımları uygundur (290).

Tavşanların kalvaryum kemikleri embriyolojik gelişim açısından maksillofasial kemiklerle benzerlik göstermektedir. Parietal ve frontal kemikler gibi maksillar kemik ve mandibulanın korpus kısmı da intramembranöz kemikleşmektedir. Ayrıca kalvaryal alana cerrahi ulaşım kolaydır. İnsizyon esnasında ya da flep kaldırılırken ciddi komplikasyon oluşturabilecek bir anatomik yapı yoktur. Ağızdan uzak bir bölge olduğundan bakteriyel kontaminasyon riski düşüktür ve deney hayvanının beslenmesini zorlaştırmaz. Ayrıca hayvanın göremeyeceği bir alan olması ve hayvan tarafından ulaşılması zor bir alan olması nedeni ile postoperatif dönemde cerrahi alan daha güvende olacaktır (290).

Kemik metabolizmasını inceleyen araştırmalarda tavşan tibiası da tercih edilebilmektedir. Tibia ortopedi çalışmalarına daha uygun olmakla birlikte, embriyolojik olarak endokondral kemikleştiği ve yukarıda sayılan avantajlara sahip olmaması maksillofasial araştırmalarda göz önünde bulundurulmalıdır. Ayrıca Kahraman⁽²⁹²⁾'ın yaptığı çalışmada tibiada oluşturulan defektin kırık oluşumuna neden olabildiği bildirmiştir. Kökdere⁽²⁹³⁾'nin tavşan tibiasında defekt oluşturarak yaptığı çalışmada intraoperatif herhangi bir komplikasyon olmamasına rağmen postoperatif bakım sırasında 3 hayvanda tibia kırığı oluştuğunu bildirmiştir. Molina-Minano ve ark.⁽²⁹⁴⁾'nin yaptığı çalışmada tibia kırığı oluşmasından kaçınmak için defekt çapını 4 mm ile sınırlamak zorunda kaldıklarını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda bu avantaj ve dezavantajlar göz önünde bulundurularak kalvaryal kemikler tercih edildi. Bir hayvanda daha güvenli sınırlarda daha fazla defekt oluşturuldu. Böylece hem mümkün olan en az sayıda deney hayvanı kullanıldı hem de daha büyük boyutlarda defekt oluşturuldu.

İnsizyonun boyutuna dair bir standardizasyon yoktur. Deneyin gerektirdiği koşullara göre insizyon uzunluğu belirlenmektedir. Dağ⁽²⁹⁵⁾'ın yaptığı araştırmada 11 mm' lik tek defekt için 4,5 cm uzunluğunda insizyon kullanılmıştır. Zhou ve ark.⁽²⁹⁶⁾'nın yaptığı araştırmada 5 cm, Paknejad ve ark.⁽²⁹⁷⁾'nin 10 cm uzunluğunda insizyon kullandığı bildirilmiştir. Bazı çalışmalarda (298-302) ise insizyon uzunluğu belirtilmemiştir. Çalışma planımızda belirlediğimiz parietal ve frontal kemikler ortaya çıkacak şekilde 3 cm' lik insizyon hattı oluşturduk. Çalışılan kemiğe göre flebi ekartörler ile yönlendirerek yeterli görüş alanı sağladık. Mümkün olduğunca kısa insizyon hattı kullanarak komplikasyon riskini en aza indirmiş olduk.

Klinik uygulamalarda biyolojik stabilite ve osteoindüktif özelliklerini doğrulamak amacıyla tavşan kalvaryasında oluşturulan defektler kullanılarak birçok kemik greft materyali değerlendirilmiş ve geliştirilmiştir. Bir greft materyalinin kemik oluşturma yeteneği araştırılırken, defektin kendi kendine iyileşme ihtimalini elimine etmek gerekir. Bu da ancak kritik boyutlu defekt kullanımı ile mümkündür. Defektlerin, spontan iyileşme kapasitesi açısından literatürde fikir birliği yoktur ve farklı çalışmalarda KBD' lerin 10-15 mm aralığında olması önerilmiştir (303). KBD boyutu belirlenirken iyileşme süresi de göz önünde bulundurulmalıdır. Shon ve ark.⁽³⁰³⁾'nin yaptığı çalışmada 6 mm'lik bir defekt 2 ve 4 haftada kendi kendine iyileşemezken 12 haftalık iyileşme periyodunda defekt alanının her bölgesinde yeni kemik alanı oluştuğu görülmüştür. Paknejad ve ark.⁽³⁰⁴⁾ tavşan kalvaryasında greftlerle çalışırken 4 haftalık iyileşme periyodu için 5 mm' lik çapta defektler kullanmışlardır. Paknejad ve ark.⁽¹⁰⁾ başka bir çalışmada tavşan kalvaryasında 3.3x6.6 mm boyutlarında defekt oluşturmuş 4. ve 8. haftalarda sakrifizasyon uygulamıştır. Behnia ve ark.⁽³⁰⁵⁾ 8 mm çapındaki tavşan kalvaryasındaki defektler için 6 ve 12 haftalık iyileşme periyodu planlamışlardır. Dağ⁽²⁹⁵⁾ benzer bir çalışmada 11 mm çapında defekt oluşturup iyileşme periyodunu 8 hafta olarak belirlemiştir. Bu çalışmalar iyileşme süresinin deneylerin amacına göre seçilmesi gerektiğini göstermektedir.

Ayrıca, unutulmamalıdır ki mümkün olan en küçük defekt kullanıldığında bir hayvanda birden fazla defekt oluşturarak denek sayısını düşürmek mümkün olur ve incelenen tüm materyallerin bir hayvanda testi, bireysel değişimlerin önüne geçer (303).

Tavşan modellerinde kemik metabolizması insana göre yaklaşık olarak 3 kat daha hızlıdır (306, 307). Çalışmamızda deney hayvanlarına greft uygulanmasını takiben 4 hafta sonra sakrifikasyon uygulandı. Bu bekleme süresi insanda 3 aya denk gelmektedir. Çalışmamızda greftlenen alanlardaki kemik yapımına ve olgunluğuna PRGF'nin erken dönemde bir etkisinin olup olmadığı araştırılmaktadır. Bu bilgiler dikkate alınarak 4 haftalık iyileşme periyodunun ve 6 mm' lik defekt çapının erken dönemdeki kemik iyileşmesinin değerlendirilmesi için uygun olacağını planladık.

Tavşan kalvaryalarında defekt oluşturarak iyileşme üzerine yapılan çalışmaların süreleri hakkında belirli bir görüş birliği yoktur. Torres ve ark.⁽³⁰⁸⁾ kalsiyum fosfat veya polimer greftlerin kemikleşmesi için tavşan modellerinde anjiyogenez ve kemik oluşumunu gözlemlemek için 4 haftalık bir implantasyon süresinin yeterli olduğu görüşündedirler. Pelegrine ve ark.⁽³⁰⁶⁾ tavşan modelde yaptığı çalışmada uzun dönem kemik iyileşmesini değerlendirmek için 8 hafta iyileşme periyodunu beklemiştir. Ancak bu sürede defekt bölgesinde oluşan yeni kemiğin mineral seviyesinin normal kemikten daha düşük olduğunu bildirmiştir. Bunların dışında defekt bölgelerindeki kemik iyileşmesini 3., 4., 6., 7., 8., 12. haftalarda ve 6. ayda incelemeyi uygun gören birçok yayın mevcuttur (295).

Kemik defekteri oluşturulurken round, fissür ya da trephine frezler kullanılabilir. Trephine frezler defekt standardizasyonu sağlaması açısından diğer frezlere göre avantajlıdır. Çalışmamızın dizaynı açısından trephine frez kullanılması otojen greft temini açısından da üstünlük sağlamıştır. Maksillofasial cerrahide maksillada tuber bölgesinden, mandibulada simfiz ve ramus bölgelerinden ve iliak kemikten otojen greft alımında trephine frezler sıklıkla kullanılmaktadır. Diğer frezler ile defektler aşındırma şeklinde oluşturulduğundan greft elde etmek mümkün olmamaktadır. Trephine frezler ile oluşturulan greftlerde ise blok halinde otojen kemik elde etmek mümkündür. Ayrıca trephine frezlerin kullanımının kolay olduğunu, verici sahada daha az komplikasyona neden olduğunu, defekt boyutlarını standardize ettiğini bildiren yayınlar bulunmaktadır (309, 310).

Trephine frez ile elde edilen blok greftler partiküllü hale getirilirken kemik öğütücüler, kemik değirmenleri ve kemik eziciler kullanılmaktadır (295). Çalışmamızda Şekil 2.5'te görülen pens şeklinde bir kemik ezici kullandık.

PRGF otolog kandan elde edilen bir üründür. Bu açıdan deney tasarlanırken otolog kan ihtiyacını karşılayabilecek bir deney hayvanı seçilmelidir. Vücut ağırlığı arttıkça alınabilecek kan miktarı da artmaktadır. Ağırlığı yaklaşık olarak 25 gr olan farede 2.6 ml, 250 gr olan sıçanda 28 ml, 4 kg olan tavşanda 250 ml, 10 kg olan köpekte 850ml, 30 kg olan domuzda 1950 ml ortalama toplam kan hacmi bulunmaktadır (293). Bu toplam kan hacminin % 30-40'ı veya daha fazlası alındığında hipovolemi ve kardiyovasküler yetmezlik nedeni ile ölüm gerçekleştiği, % 15-20'si alındığında arteriyel basınçta ve kalp atış hızında düşüş olduğu gözlemlenmiştir (217, 293). Eğer deney hayvanlarının vital bulguları değişmesi istenmiyorsa alınabilecek en fazla kan hacmi bu toplam kan hacminin yaklaşık olarak % 10'udur (293). Bu bilgilere bakılarak bir tavşandan fizyolojik bulgular değişmeden ortalama 25 ml kanın güvenle elde edilebileceği anlaşılmaktadır.

Paknejad ve ark.⁽¹⁰⁾ tavşan kalvaryasında 3.3 x 6.6 mm boyutlarındaki 2 defekt için 5ml otolog kandan PRGF elde ettiklerini bildirmişlerdir. Behnia ve ark.⁽³⁰⁵⁾ 8 mm çapındaki 2 adet kalvaryaya defektinde kullanacakları PRGF için 10ml otolog kan almışlardır. Bizim çalışmamızda her deney hayvanından 5ml otolog kan alındı.

Tavşanlardan kan elde edilirken santral kulak arteri ve intrakardiyak teknik kullanılabilir (293). İntrakardiyak teknikte perikardiyum ile kalp arasında gerçekleşecek bir kanama deney hayvanının ölümüne neden olabileceğinden sakıncalı bir yöntemdir. Ancak deneyin sonlandırılacağı ve/veya fazla miktarlarda kan gerektiği durumlarda önerilen bir kan alma tekniğidir (311). Buna rağmen Behnia ve ark.⁽³⁰⁵⁾ tavşan kalvaryasında oluşturdukları defektlerde PRGF kullanmak için intrakardiyak tekniği tercih etmişlerdir. Daha düşük hacimlerde kan gerektiği durumlarda santral kulak arterinin tercih edilmesi daha doğrudur (312). Ancak kulak damarlarının son derece frajil olduğu, santral arterden kan alındıktan sonra arter basıncı nedeni ile kanamayı durdurmak için iyi bir kompres gerektiği ve istenilen miktarda kan elde etmenin zor olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Çalışmamızda otolog kan elde etmek için kulak santral arteri kullanılmıştır.

Çene kemikleri, içerisinde dişleri ve periodontal dokuları içermesi, sık travmaya maruz kalması ve çok iyi bir rejenerasyon kabiliyetine sahip olması bakımından vücudun

diğer kemiklerinden ayrılmaktadır. Yüksek onarım kabiliyetine rağmen çene kemikleri de diğer kemikler gibi konjenital, gelişimsel ya da kazanılmış olarak eski hacimlerini ve formlarını kaybedebilmektedirler. Bu kayıplar alveolar krette, yaygın olarak görülebilmekte veya bölgesel olarak kalabilmektedir.

Oluşan kemik kaybının boyutuna ve bölgesine bağlı olarak estetik ve fonksiyonel problemler oluşabilmekte veya uygulanması planlanan tedaviye engel teşkil edebilmektedir. Bu nedenle alveolar kret üzerinde oluşan kayıpların en güvenilir, en hızlı, en kolay ve en az maliyetle geri kazanılması gerekmektedir. Günümüzde bu amaçla kemik greft materyalleri sıklıkla kullanılmaktadır.

Maksillofasial rekonstrüksiyon cerrahisinde kullanılan greft materyalleri, kemik dokularının başarılı bir rejenerasyonu için uygun olan fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip olmalıdır (313, 314). Bu amaçla sıklıkla; otogreftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastlar kullanılmaktadır (109, 315). Otogreftlerin ikinci bir cerrahi alana ihtiyaç duyulması ve sınırlı miktarlarda elde edilebilmesi gibi dezavantajları bulunmaktadır. İkinci cerrahi alan morbiditeyi artırmakta ve enfeksiyon riskini yükseltmektedir. Büyük defektlerde istenilen greft miktarlarını ağız içi donör sahalardan elde etmek mümkün olmayabilir. Ekstraoral verici alanlar ise işlemin karmaşıklığını artırmaktadır. Otojen kemik greftleri içerdikleri büyüme faktörleri, hormonlar ve canlı hücreler nedeniyle diğer greft materyallerine göre bir adım öndedir. Ancak bu büyüme faktörlerinin, hormonların ve canlı hücrelerin etki alanları oldukça kısıtlıdır. Hatta bazı yayınlarda otogreftin verici sahadan alıcı sahaya nakli sırasında oluşan hipoksik ortam nedeniyle kemik içerisindeki hücrelerin yaklaşık % 80'inin canlılığını yitirdiği bildirilmiştir (316-320).

Bütün dezavantajlarına rağmen otogreftler taşıdığı canlı hücreler, büyüme faktörleri ve kemik onarımını destekleyen mediyatörler ile osteogenezisi, osteoindüksiyonu ve osteokondüksiyonu sağlarlar. Osteojenik özelliği, içerdikleri osteoprojenitör hücreler sayesinde operasyondan sonra 2 hafta kadar devam eder. Osteoindüksiyon özelliği ise 2-6 hafta arasında başlayarak yaklaşık 6 ay kadar sürer (321). Bu bakımdan diğer kemik greft materyalleri arasında altın standart olarak kabul edilirler. Walsh ve ark.⁽³²²⁾ koyunun her iki taraf femurunda oluşturdukları kritik boyutlardaki defektlerin birisine otogreft koyarken diğerini boş bırakmışlardır. Boş olan tarafta fibrotik iyileşme izlenirken otogreftli tarafta normale yakın iyileşme izlenmiştir.

Allojenik ve ksenojenik kemik greftleri otoimmüniteyi uyarabilmelerine ve/veya çapraz enfeksiyona neden olabilirler. Diğer taraftan kolay ve istenilen miktarlarda elde edilebilir olmaları nedeni ile otogreftlerin ardından sıklıkla tercih edilen greft materyalleridir (323, 324).

Allojenik kemik genellikle demineralize edilmiş dondurularak kurutulmuş bir greft olarak işlenir. Bu greftin osteojenik ve osteoindüktif özelliklerin olmamasından dolayı eksik özelliklerinin kazandırılması amacıyla ya otojen greftlerle ya da bu özellikteki kan ürünleri ile karıştırılır. İki popüler allogreft formu (FDBA ve DFDBA) mevcuttur. Her ikisi de benzer hazırlama prosedürüne sahiptir; ancak DFDBA, BMP'ye maruz kaldığında osteoindüktivite kazandığı bildirilmiştir (325).

DFDBA'nın farklı ticari ürünlerini kullanan farklı çalışmalardan çeşitli sonuçlar elde edilmiştir. Temel sebep, BMP'nin farklı aşılarda aktivitesi ve konsantrasyonu olabilir ve bu da sonuçları tahmin edilemez kılar. Allogreftler genellikle kadavralardan temin edilir ve genç kadavralar daha yüksek BMP seviyesine sahiptir. Ayrıca kortikal ve membranöz kemikler sırasıyla trabeküler ve endokondral kemikten daha yüksek BMP konsantrasyonlarına sahiptir. Ek olarak, ışınlama veya etilen oksitle sterilizasyon yöntemi bile BMP ve DFDBA özelliklerinin miktarını etkiler. Bu nedenle, imalat, formülasyon ve farklı işlem adımları DFDBA'nın kalite ve osteokondüktif özelliklerinde kritik bir role sahiptir (326, 327). Çalışmamızda allogreft çeşidi olarak yaygın kullanımı ve avantajlarından dolayı DFDBA tercih edildi.

Ksenogreftler, allogreftlerden daha kolay elde edilir. Hala kullanılmakta olan ksenogreftlerin çoğu domuz ve sığır kökenlidir çünkü yapı ve kimyasal bileşim (özellikle karbonatlı hidroksiapatit ve Tip I kollajen) olarak insan kemiğine benzerlik gösterirler (328). Çalışmamızda sığır kaynaklı hidroksiapatit (BHA) kullanılmıştır. Sığır türevli hidroksiapatit hem kristalimsi hem de morfolojik yapısı bakımından insan spongios kemiğine benzer. Aynı zamanda biyolojik olarak uyumlu ve osteokondüktiftir ancak osteoindüktif özelliği yoktur. BHA'nın yaklaşık 6 aylık periyotta yeni kemik oluşumunu desteklediğini bildiren birçok yayın bulunmaktadır (329-331). Çalışmamızda BHA'nın PRGF ile kombine edilmesinin ile erken dönemde de yeni kemik oluşumuna katkı sağlayıp sağlamadığının değerlendirilmesini amaçladık.

Bununla birlikte, emiliminin hızı ve mekanizması hala belirsizdir (331). Sartori ve ark.⁽³³²⁾, 10 yıl takipli çalışmalarında, BHA'nın emiliminin yavaş ama sürekli bir süreç

olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, emilim oranının ilk 2 yıl için yıllık % 3.6 olduğunu ve ardından takip eden 8 yıl boyunca ayda ortalama % 0.58 değerinde tutarlı bir şekilde azaldığını buldular. Artzi ve ark.⁽³³³⁾ BHA'nın 6 ay sonunda tamamen rezorbe olmadığını bildirmişlerdir. Schlegel ve Donath⁽³³⁴⁾ greftleme prosedüründen 6 yıl sonra BHA'nın tam olarak rezorbe olmadığını buldular ve BHA'yı kalıcı bir greft olarak bildirdiler. BHA greft materyalinin istenmeyen erken rezorpsiyonunun önlenmesi, bu greft materyalinin ilave bir avantajı gibi görünmektedir (331).

Alloplastlar yabancı cisim reaksiyonu oluşturabilmeleri, rezorbe olmamaları ya da uzun sürede rezorbe olmaları gibi dezavantajları ve özellikle implant uygulanacak bölgelerde kullanımlarının önerilmemesi nedeni ile günümüzde diğer greftler kadar sık tercih edilmemektedirler (335). Kaya ve ark.⁽³³⁶⁾ alloplastların ksenogreftlere göre daha biyoyumlu olduğunu rapor etmiş olmalarına rağmen Ohsushi ve ark.⁽³³⁷⁾ ratlar üzerinde oluşturdukları defektlere seramik esaslı bir alloplast greft uygulamışlar ancak oluşan kemik miktarını yetersiz bulmuşlardır (338).

Greftler alıcı bölgeye blok, partikül veya her ikisinin kombinasyonu şeklinde uygulanabilmektedir. Blok kemik greftleri partiküllü greftlere göre daha minimal rezorpsiyon gösterir, alıcı bölgede daha stabil kalır, kemiğe gelen yüklerin bir kısmı greft materyali tarafından karşılanabilir ve greft yapısal bir bütünlüğe sahiptir (339). Ancak osteogenezis için son derece önemli olan yeni damarların blok kemik greftleri içerisinde oluşumu partiküllü greftlere göre oldukça zordur. Bu dezavantaj yeni kemik oluşumunu geciktirirken greftin enfekte olma riskini artırır. Partiküllü greft uygulanan bölgede yeni damarların oluşumu daha hızlıdır. Böylece yeni kemik oluşumu daha hızlı ve daha kolay gerçekleşir (154, 340). Ek olarak çalışmamızda kullanılacak olan trombosit ürünü ile karıştırılabilmesi açısından partiküllü greft kullanılması daha avantajlıdır. Bu nedenlerle çalışmamızda partiküllü otogreftlere, allogreftlere ve ksenogreftlere yer verilmiştir.

Günümüzde defekt onarımında yeni kemiğin sadece daha yoğun ve daha fazla oluşması yeterli değildir aynı zamanda daha hızlı oluşması da istenmektedir. Böylece fonksiyonun estetiğin ve fonksiyonun geri kazanımı daha kısa sürede sağlanarak hasta konforsuzluğu en aza indirilecektir. Bunların yanında operasyon alanındaki yumuşak doku iyileşmesini de destekleyerek özellikle diyabet gibi yara iyileşmesinin bozulduğu sistemik hastalıklarda veya bifosfonat kullanımı gibi kemik iyileşmesinin bozulduğu durumlarda sorunsuz bir iyileşmenin teşvik edilmesi istenmektedir. Bu şekilde cerrahi

bölgenin açılması ve greftin enfekte olması engellenerek maddi açıdan ve zaman açısından tasarruf edilir, riskler en aza indirilerek bu tip operasyonlar hem hekim hem de hasta açısından daha kabul edilebilir hale getirilmiş olur.

Ancak bu özellikleri greft materyallerinin tek başlarına gerçekleştirmeleri mümkün değildir. Bu amaçla yeni kemik oluşumunu artırıcı, hızlandırıcı ve yara iyileşmesini destekleyici bazı yöntemler kullanılmış ya da greft materyalleri birtakım maddeler ile karıştırılarak daha üstün özellikte greftleme materyalleri elde edilmek istenmiştir (4, 275, 294, 341, 342).

Güncel klinik pratiğinde yaygın bir yaklaşım, tedavi sonuçlarını geliştirmek amacıyla trombosit konsantrasyonlarının, kemik grefti materyalleriyle karıştırılmasıdır. Böylece greft materyalinin hem işleme özellikleri hem de rejenerasyon özellikleri geliştirilmiş olur (343).

Marx ve ark.⁽²⁶²⁾'na göre bunların arasında trombosit konsantrasyonları en etkilisidir, çünkü hastanın kendi kanından elde edilir. Trombosit konsantrasyonlarından enfeksiyon bulaşması riski ve immünolojik reaksiyonların oluşma riski yoktur. Ayrıca, rekombinant büyüme faktörlerine kıyasla pahalı değildir.

Birçok çalışmaya göre trombosit konsantrasyonların kemik rejenerasyonunu ve osteointegrasyonunu artırmada rol oynamaktadır (262, 342, 344, 345).

Oral ve maksillofasial cerrahide daha hızlı ve daha yoğun kemik rejenerasyonu sağlamak için mevcut greftleme tekniklerini iyileştirmeye yönelik birçok çalışma mevcuttur. Büyüme faktörleri, kemik ve yumuşak doku iyileşmesini desteklemenin doğru bir yoldur. Trombositler, VEGF'nin fizyolojik bir kaynağıdır. Trombositlerden salgılanan TGF- β 2 ve TGF- β 1'in kemik rezorpsiyonunu durdurduğu ve erken yarada kollajenin hızlı bir şekilde olgunlaşmasını tetiklediği gösterilmiştir (346). PDGF, yara iyileşmesinde görev alan hücrelerin popülasyonunu ve yara bölgesine diğer anjiyojenik büyüme faktörlerini artırır (10, 347).

Son birkaç on yılda literatürde defekt bölgesini iyileştirmeyi amaçlayan cerrahi teknikler ve greftleme materyalleri önerilmiştir. Özellikle, trombosit konsantrasyonları potansiyeli olan rejeneratif materyaller olarak kabul görmüştür. Plateletten Zengin Plazma (PRP) (262), Platelet Zengin Fibrin (PRF) (264) ve bunların farklı protokolleri dahil olmak üzere çeşitli yöntemler uygulamaya konulmuştur (343).

Zechner ve ark.⁽³⁴⁸⁾, PRP'nin iyileşmenin erken evrelerinde kemik rejenerasyonuna katkı sağladığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde Lee ve ark.⁽³⁴⁹⁾ PRP'lerin osteogenezisin ilk fazında etkili olduğunu bildirmişlerdir. Gerard ve ark.⁽³⁵⁰⁾, deneysel bir modelde, PRP'nin ilk ve ikinci aylarda kemik oluşumunu ve yeniden şekillenmesini artırdığını, ancak bu faydalı etkiler 3. aydan sonra azaldığını tespit etti. Marx ve ark.⁽²⁶²⁾ PRP ile otojen kemik grefti kullanıldıktan 4 ay sonra olgun kemik trabeküllerinde önemli bir artış olduğunu bildirmiştir. Molina-Miñano ve ark.⁽²⁹⁴⁾ PRP'nin greft ile kombine edilmesinin radyolojik ve histomorfometrik olarak istatistiksel fark oluşturduğunu bildirmiştir. Torres ve ark.⁽³⁰⁸⁾ BHA'nın PRP ile kombine edilmesi, iyileşmenin erken aşamalarında iki katı artmış kemik hacmi ile sonuçlandığını göstermiştir.

Messori ve ark.⁽³⁵¹⁾,na göre PRP ve greft kombinasyonlarının biyolojik aktivitelerini PRP'nin artırıp artırmadığı tartışmalıdır. Luaces-Rey ve ark.⁽³⁵²⁾ PRP'lerin sekonder alveolar kret greftlemesinde osteogeneze etkisi olmadığını bildirmişlerdir. Aghaloo ve ark.⁽³⁵³⁾ 2002 yılında yaptıkları bir çalışmada PRP ilavesinin kemik oluşumunda radyografik veya histomorfometrik olarak istatistiksel anlamlı bir farklılık bulamamışlardır. Raghoobar ve ark.⁽³⁵⁴⁾,nın yaptığı insan çalışmasında maksillar sinüs tabanı yükseltmesinde otojen kemikle kombinasyon halinde önemli avantajlar göstermemiştir. Lafzi ve ark.⁽³⁵⁵⁾ periodontal furkasyon defektlerinde otogreftler ve PRGF ile karıştırılmış otogreftleri denemiş her iki grupta da osteosentezin oluştuğunu görmüş ancak gruplar arasında anlamlı bir fark bulamamıştır.

Ayrıca farklı PRP üretim sistemlerini karşılaştıran bir dizi çalışmanın varlığına rağmen “trombosit konsantrasyonunun optimum değeri” konusunda fikir birliği yoktur (276, 351), PRP'de optimum trombosit konsantrasyonu belirlenememiş olsa da, Weibrich ve ark.⁽²⁷⁶⁾, 1.000.000 / µl'nin altındaki konsantrasyonlar, optimuma yakın etkiler sergilerken, daha yüksek konsantrasyonların inhibe edici etkiler gösterebileceğini öne sürmüşlerdir. Bu konudaki bir başka görüş ise, hedef dokudaki reseptör konsantrasyonunun PRP'deki büyüme faktörlerinin konsantrasyonundan daha önemli olduğunu savunmaktadır (351).

Bizim çalışmamızın sonuçları greftlere bir PRP türevi olan PRGF eklenmesi defekt bölgesindeki kemik miktarını artırdığı gösterdi.

Bazı yazarlar bir avantaj olarak PRP'nin biyomateryal rezorpsiyonu hızlandırabileceğini öne sürmüşlerdir, çünkü kemik rejenerasyonunda önemli bir husus emilim kapasitesidir. Yeni oluşturulmuş kemik içindeki rezorbe olmayan granüllerin varlığı istenmeyen bir durumdur. Çünkü elde edilen dokunun kalitesini ve özelliklerini etkiler. Bu durum, implantların osteointegrasyon kapasitesini tehlikeye atabilir (308, 356). Torres ve ark.⁽³⁰⁸⁾ biyomateryal rezorpsiyon belirtileri tespit edememiştir. Çalışmamızda da benzer şekilde PRGF'nin greft rezorpsiyonunu artırdığına dair bir bulguya rastlanmadı. Ancak 4 haftalık periyot greft rezorpsiyonunu değerlendirmek için kısa bir süre olabileceğini düşünmekteyiz.

PRGF temelinde bir PRP protokolüdür. Ancak PRP'den farklı olan ve aynı zamanda karışıklığa neden olan iki nokta vardır bunlardan birincisi PRP'ler fibrin iskelet içermezler. PRGF'de ise CaCl₂ kullanılarak bir fibrin matris yapı elde edilebilir. İkinci önemli nokta ise PRP protokolleri iki basamaklı santrifüj gerektirir. PRGF protokolünde ise santrifüj işlemi bir kez yapılır (268, 275). Bu özellikleri bakımından PRGF'nin hem PRP'nin hem de PRF'nin avantajlarına sahip olduğu söylenebilir.

PRGF, trombositleri ve plazma proteinlerini elde etmek için kullanılan yeni bir sistemdir ve zaman tasarruf sağlaması, daha az venöz kan gerektirmesi, santrifüjlemenin tek adımda gerçekleşmesi ve aktivasyon için sığır tromboplastinine ihtiyaç duymaması gibi benzersiz avantajlara sahiptir (10).

Teorik olarak, fibrin matris içinde fizyolojik sınırların üzerinde bir değerde trombosit konsantrasyonunun oluşturulması, TGF-1, PDGF, VEGF ve IGF dahil olmak üzere yüksek konsantrasyondaki büyüme faktörlerinin salgılanmasını sağlar. Bu nedenle, bu yapının lokal uygulamasının, cerrahi travma sonrası yeniden iyileşme, anjiyogenez ve hücre dışı matris oluşumunun uyarılmasıyla yara iyileşmesini artırması beklenmektedir (357).

Ek olarak, fibrin matris, fibrin membranları ve plazma gibi klinik olarak uygulanabilir PRGF ürünlerinin çeşitli formları bulunur. Bu formlar santrifüjlemeden sonra plazma kısmından oluşturulan farklı fraksiyonlarından elde edilir (358). Bu sistemin derideki yara iyileşmesi, hasarlı tendon ve kıkırdak onarımı alanlarında da tatmin edici sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Ancak PRGF ve fibrin membranı üzerine yapılan araştırmalar sınırlıdır ve bu alanda daha ileri çalışmalar gereklidir (10).

Diğer trombosit konsantrasyonlarının aksine, PRGF protokolü lokal proinflatuar etkilerin oluşumunu en aza indirmek amacıyla kasıtlı olarak lökositlerin dışlanması içerir (357). İnvitro çalışmalar, PRGF'nin hem fibroblast hem de osteoblast göçünü ve proliferasyonunu uyararak yumuşak ve sert doku rejenerasyonunu geliştirebileceğini göstermiştir (343).

Farklı tıp alanlarından yapılan klinik çalışmalar, PRGF'nin kronik ülserler, sinir rejenerasyonu ve ortopedik hastalıkların tedavisine katkıda bulunabileceğini de bildirmiştir (358, 359). Son yirmi yılda, PRGF oral cerrahi ve oral implantolojide yoğun olarak uygulanmaktadır. Ekstraksiyon soketlerinde uygulanmasının epitelizasyon, doku olgunlaşması ve kemik rejenerasyonunu hızlandırarak iyileşmeyi artırdığı savunulmuştur (275). Diyabetik hastaların ekstraksiyon soketlerinin yara iyileşmesinde ve baş ve boyun radyasyonu öyküsü olan hastalarda yararlı sonuçlar da bildirilmiştir (360-362). Ayrıca, PRGF'nin kret genişletme prosedürlerinde uygulanmasının, olumlu sonuçlarla ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır, ancak bu çalışmalar üzerinde bir kontrolün bulunmaması, etkilerinin uygun bir şekilde değerlendirilmesine izin vermez (363, 364).

PRGF'nin maksillar sinüs tabanı yükseltmesinde kullanılması, inflamasyon ve postoperatif ağrıların yanı sıra yeni kemik oluşumu miktarı açısından da olumlu sonuçlar vermiştir (227). Anitua ve ark.⁽³⁶⁵⁾ sinüs tabanı yükseltmesinde ksenogreft ile PRGF-ksenogreft karışımını karşılaştırılmış elde edilen kemik yoğunluğunun PRGF-ksenogreft karışımının olduğu örneklerde istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğunu bildirmiştir. Lopez ve ark.⁽³⁶⁶⁾ ksenogreftler ile PRGF-ksenogreft karışımını uzun dönem sonuçları açısından değerlendirmiş ve Anitua ve ark.⁽³⁶⁵⁾'nin sonuçlarına benzer sonuçlar bulmuştur. Ek olarak büyüme faktörlerinden zengin bir otojen kan türeviden oluşan birleştirilmiş partiküllü ksenogreft kullanımının, hızlandırılmış vaskülerizasyon, gelişmiş yumuşak doku iyileşmesi, daha az postoperatif morbidite sağladığı bildirilmiştir (367). Başka bir çalışmada, PRGF'nin bir beta-trikalsiyumfosfat greft ile uygulanması, kollajen membran kullanımına bakılmaksızın peri-implant kemik defektlerinde belirgin kemik rejenerasyonu ile sonuçlanmıştır (368). Molina-Minano ve ark.⁽²⁹⁴⁾ PRGF'nin Yeni Zelanda tavşanlarında oluşturulan kemik defektlerine otojen kemik ile birlikte uygulanmasının bir ay sonra radyografik kemik yoğunluğunda önemli farklılıklar oluşturduğunu kaydetmiştir. Ancak, iki ay sonraki farkların artık anlamlı olmadığını bildirmiştir. Mansori ve ark.⁽³⁶⁹⁾ biyolojik uyumluluk üzerine çalışmış ve ksenogreftlere

PRGF eklenmesinin biyoyumluluğu artırdığı ancak kontrol grubu aradaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmiştir. Bazı klinik çalışmalar ise PRGF'nin benzer uygulamalarda kullanımıyla ilişkili herhangi bir faydasının olmadığını savunmaktadır (370, 371). Torres ve ark.⁽³⁰⁸⁾ sonuçlardaki çelişkilerin cerrahi bölgenin farklı oluşuna bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir.

Eppley ve ark.⁽³⁷²⁾'na göre plazma büyüme faktörleri, canlı hücre büyümesini uyardığından, allogreftler gibi canlı hücrelerin yokluğunda, sadece çevredeki canlı kemiği stimüle edebilirler. Sonuç olarak, büyüme faktörlerine cevap allogreftlerde, otogreftlerden daha zayıf olur. Ancak bizim çalışmamızda Kontrol grubu ile PRGF grubu arasında en fazla farkı ksenogreft uygulanan örneklerde bulduk ikinci sırada yeni kemik oluşumu otogreft grubundayken en az farkı allogreft grubunda bulduk.

Çalışmamızdaki örnekler, defekt bölgesindeki kemik miktarı açısından değerlendirildiğinde bütün PRGF gruplarında, Kontrol gruplarına göre istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düzeyde fark bulundu. Ksenogreft uygulanan örneklerde, allogreft ve otogreft uygulanan örneklere göre kemik miktarının fazla çıkmasını ksenogreftin rezorpsiyon sürecinin yavaş işlemeden kaynaklandığını düşünüyoruz. Ayrıca çalışmamızda ksenogreft ve allogreft uygulanan örneklerde greft ve yeni kemik miktarı ayrı ayrı değerlendirilmemiştir, otogreft örneklerinde ise otogreft ile yeni oluşan kemiği ayırt etmek mümkün değildir. Bu nedenle ksenogreft, allogreft ve otogreft uygulanan grupların kemik miktarları açısından birbirleri ile karşılaştırılması yanlış sonuçlar doğuracaktır.

Ancak her bir defekte uygulanan greft miktarları eşit olduğu için PO ile KO, PK ile KK ve PA ile KA gruplarının arasındaki kemik miktarı farkı yeni oluşan kemikten kaynaklanmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda PRGF uygulanan gruplarda oluşan yeni kemik miktarının arttığı sonucuna varıldı.

Anjiyogenez osteogenezden önce oluşur ve hem osteogenez hem de kemik onarımı için son derece önemli bir adımdır (373). Yeni damarlar yoluyla osteojenik hücreler farklı alanlara göç ederek osteogenezi desteklerler (374).

Trombositler, VEGF, FGF, ve PDGF gibi anjiyogenezin ana düzenleyicilerinin temel kaynağıdır. Özellikle VEGF, anjiyogenez ve osteogenezin modülasyonu yoluyla kemik iyileşme sürecinde önemli bir rol oynar. Ayrıca osteoblastlar ve osteojenik hücreler üzerinde doğrudan kemotaktik ve mitojenik etkilere sahip olduğu belirtilmiştir (375).

Yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda fibrin matriks varlığında, VEGF ekspresyonunun daha uzun süreli olduğu ve fibrin matriksin greft vaskülarizasyonunu kolaylaştırdığı bildirilmiştir (375-377).

Choukroun ve ark.⁽³⁷⁸⁾, PRF'nin uzun vadede hücrel çoğalmayı arttırmadığı, ancak anjiyogenezi destekleyerek greftin revaskülarizasyonunda önemli bir rol oynayabileceğini bildirmiştir.

Zayıf kan desteği bozulmuş kemik iyileşmesi için bir risk faktörü olarak görülmektedir (373, 379). Hausman ve ark.⁽³⁸⁰⁾'nin yaptığı hayvan çalışmasında, kemik iyileşmesi sırasında ki zayıf vaskülarizasyonun, insan kemiklerinde görülen kaynamama benzeri bir iyileşmeye neden olduğu bildirilmiştir.

Zhang ve ark.⁽³⁸¹⁾ PRF'nin ksenogreftler ile kullanılmasının etkilerini araştırdıkları çalışmalarında yeni kemik oluşumunun fazla olduğu bölgelerde bağ dokusunun düşük damarlanmanın yüksek olduğunu, yeni kemik oluşumunun düşük olduğu bölgelerde ise greft partiküllerinin damarlanmadan zayıf fibröz doku ile çevrili olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda, Zhang ve ark.⁽³⁸¹⁾'nin sonuçlarına paralel bulgular elde edilmiştir. Kemik miktarının yüksek olduğu gruplar yani PRGF'li gruplarda kontrol gruplarına göre damar dokusu hacmi yüksek bağ dokusu hacmi düşük bulunmuştur. Bu açıdan çalışmamızın sonuçları kendi içerisinde tutarlılık göstermektedir.

PRGF gruplarında bağ dokusundaki anlamlı azalma kemik rejenerasyonunun tamamlanmaya yaklaştığını ve matürasyon sürecinin başladığını işaret etmektedir. Çünkü rejenerasyonun başlangıç sürecinde ilgili alana yoğun bağ doku göçü olmakta, rejenerasyonun tamamlanmasını takiben bağ doku miktarı azalmaktadır.

Maksillofasial kemiklerin incelenmesinde radyolojik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Konvansiyonel röntgenler bu amaçla kullanılan ilk yöntemler olmasına rağmen ağız bölgesine özel periapikal ve panoramik röntgenler daha sık tercih edilir olmuştur. Son gelişmelerle birlikte bilgisayarlı tomografiler kullanılmaya başlanmış, böylece kemik dokuyu 3 boyutlu olarak görebilme ve belli bir bölgedeki kemik yoğunluğunu ölçebilme imkânı doğmuştur (382). Molina-Miñano ve ark.⁽²⁹⁴⁾ cerrahi defektlere PRGF uygulamış, PRGF uygulanan defektlerin 1 aylık dönemde radyografik kemik yoğunluğu skorlarındaki farkın anlamlı olduğunu ancak 2 aydan sonra farkların anlamlı olmadığını bildirmiştir. Çalışmamızda 1 aylık iyileşme periyodundan sonra ince

kesit bilgisayarlı tomografi görüntüleri kullanılarak kemik yoğunluğunu HU değeri olarak hesapladık ve 3 boyutlu görüntüler oluşturduk. 3 boyutlu görüntüler ile de defekte oluşan kemik miktarını değerlendirdik.

Çalışmamızda kemik yoğunluğu değerleri (HU) PO grubunda KO grubuna göre PK grubunda KK grubuna göre ve PA grubunda KA grubuna göre sayısal olarak yüksektir. Ancak bu fark PA ve KA grupları arasında istatistiksel olarak anlamlıyken, diğer gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamsızdır. Deneklerin kalvaryalarının 3 boyutlu bilgisayarlı tomografi görüntülerini incelediğimizde defektlerde oluşan kemik miktarlarının PO grubunda KO grubuna göre PK grubunda KK grubuna göre ve PA grubunda KA grubuna göre daha fazla olduğunu gördük. Kemik yoğunluğunun ve miktarının PO, PK ve PA gruplarında yüksek çıkmasının, PRGF'nin erken dönemde (4 hafta) greft rezorpsiyonunu azaltmasından ve yeni kemik yapımını artırmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Pryor ve ark.⁽³⁸³⁾ radyografik skorlama mineral yoğunluğunu ayırt edebilmesine rağmen sonuçların yeterli güvenilirlikte olmadığını ve histolojik doğrulamanın gerekli olduğunu bildirmiştir. Çalışmamızda kullanılan greftin mineral yoğunluğunun radyolojik görüntüyü ve HU değerinin etkilediği hatalı pozitif ya da negatif sonuçlar elde edilebileceği anlaşılmıştır dolayısıyla Pryor ve ark.⁽³⁸³⁾'nin görüşüne katılmaktayız.

Literatürde PRGF'nin farklı greft materyalleri üzerindeki etkilerini araştıran insan ve hayvan deneyleri bulunmaktadır. PRGF'nin greft materyalinin kemikleşmesi üzerine olumsuz bir etkisinin olduğunu bildiren herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Erken dönem kemikleşmeye faydalı olduğunu bildiren yayınlar çoğunlukta anamlı fark bulamayan çalışmalar da bulunmaktadır. Uzun dönem çalışmalarda ise PRGF'nin bu alanda herhangi bir etkisinin olmadığını bildiren çalışmalar çoğunlukta tersini bildiren araştırmalar da bulunmaktadır.

Bu çalışmada radyolojik ve stereolojik bulgular birbirlerini desteklemektedir. PRGF sert doku greftlerinin iyileşmesine erken dönemde katkı sağlamaktadır. Ancak kemik iyileşmesini destekleyici materyallerle, yöntemlerle ya da trombosit konsantrasyonlarının diğer protokolleriyle karşılaştırıldığında üstünlüğünün olup olmadığını belirleyebilmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Otojen kemik greftlerinin PRGF ile birlikte kullanılmasının otogreftlerin tek başlarına kullanılmasına göre erken dönem (4 hafta) kemik iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bulunmuştur.
- Allojenik kemik greftlerinin PRGF ile birlikte kullanılmasının allogreftlerin tek başlarına kullanılmasına göre erken dönem (4 hafta) kemik iyileşmesini artırdığı bulunmuştur.
- Ksenojenik kemik greftlerinin PRGF ile birlikte kullanılmasının ksenogreftlerin tek başlarına kullanılmasına göre erken dönem (4 hafta) kemik iyileşmesini desteklediği bulunmuştur.
- PRGF kullanılan gruplardaki bağ dokusu hacminin kontrol gruplarına göre daha az olması, bu gruplarda kemik iyileşmesinin daha hızlı olduğunun bir göstergesidir.
- Damar dokusu hacminin PRGF'li gruplarda kontrol gruplarına göre daha yüksek bulunması, bu gruplarda kemik iyileşmesinin daha hızlı olduğunun ve PRGF'nin kemik iyileşmesini neoanjiyogenezisi uyararak gerçekleştirdiğinin bir kanıtıdır.
- Radyolojik inceleme sonuçları stereolojik inceleme sonuçlarını desteklemiştir. PRGF kullanılan gruplar kontrol gruplarına göre daha yüksek mineralizasyon göstermişlerdir. Ancak bu mineralizasyon farkı allogreft kullanılan gruplar dışında anlamlı değildir.
- Kemik mineral yoğunluğunun değerlendirildiği ileri radyolojik görüntüleme yöntemlerinin (mikro CT) kullanıldığı çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Trombosit konsantreleri ile ilgili birçok protokol bulunmaktadır. Ancak PRGF'nin diğer trombosit konsantreleri ile karşılaştırıldığı yeterli sayıda çalışma bulunmamaktadır. Bu konudaki araştırmalar bilime katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

1. Bae S-Y, Park J-C, Shin H-S, Lee Y-K, Choi S-H, Jung U-W. Tomographic and histometric analysis of autogenous bone block and synthetic hydroxyapatite block grafts without rigid fixation on rabbit calvaria. *Journal of periodontal & implant science*. 2014;44(5):251-8.
2. Beltrán V, Engelke W, Dias FJ, Leiva C, Fuentes R, Borie E. Occlusive barriers in combination with particulate Bio-Oss® graft: a pilot study on rabbit calvaria. *International journal of clinical and experimental medicine*. 2014;7(7):1714.
3. Doksöz O. Sentetik ve allojen greft materyalleri uygulanan kritik boyut kemik defektlerinde Sistemik ve lokal simvastatin uygulamasının karşılaştırılması olarak incelenmesi. 2016.
4. Arpağ OF, Damlar I, Altan A, Tatlı U, Günay A. To what extent does hyaluronic acid affect healing of xenografts? A histomorphometric study in a rabbit model. *Journal of Applied Oral Science*. 2018;26.
5. Zimmermann A, Pelegrine AA, Peruzzo D, Martinez EF, Aloise AC, Ferreira LM. Adipose mesenchymal stem cells associated with xenograft in a guided bone regeneration model: a histomorphometric study in rabbit calvaria. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2015;30(6).
6. Shakir S, Maclsaac ZM, Naran S, Smith DM, Bykowski MR, Cray JJ, et al. Transforming growth factor beta 1 augments calvarial defect healing and promotes suture regeneration. *Tissue Engineering Part A*. 2015;21(5-6):939-47.
7. Şimşek A, Çakmak G, Cila E. Kemik greftleri ve kemik greftlerinin yerini tutabilecek maddeler. *Totbid Dergisi*. 2004;3:1-11.
8. Khouly I, Pardinás Lopez S, Aliaga I, Froum SJ. Long-term implant survival after 100 maxillary sinus augmentations using plasma rich in growth factors. *Implant dentistry*. 2017;26(2):199-208.
9. Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends in biotechnology*. 2006;24(5):227-34.
10. Paknejad M, Shayesteh YS, Yaghobee S, Shariat S, Dehghan M, Motahari P. Evaluation of the effect of plasma rich in growth factors (PRGF) on bone regeneration. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. 2012;9(1):59.
11. Kim TG, Shin H, Lim DW. Biomimetic scaffolds for tissue engineering. *Advanced Functional Materials*. 2012;22(12):2446-68.
12. Efeoğlu CG. Kemik defektlerinin iyileşmesinde hyalüronik asit ve/veya kemik greftlerinin etkinliğinin karşılaştırılması: SDÜ Tıp Fakültesi; 2015.

13. Kaya A. Kemik defektlerinin iyileşmesinde rifamisin ile allojenik alloplastik ve heterojen kemik greftlerinin etkilerinin histopatolojik olarak incelenmesi. 2014.
14. Buckwalter J, Glimcher M, Cooper R, Recker R. Bone biology. J Bone Joint Surg Am. 1995;77(8):1256-75.
15. Yüceer Çetiner E. Diş Çekimi soketlerine Uygulanan Dentin Greftinin Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi [Uzmanlık Tezi]: Ondokuz Mayıs Üniversitesi; 2018.
16. Mescher A. AL Mescher Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 14th ed, Mc Graw Hill, New York, Chicago, San Francisco. 2016:138-60.
17. Grivas KN. Numerical Modelling of The Ultrasound Effect on Bone Fracture Healing [Doctoral Thesis]: University of Patras; 2016.
18. Kierszenbaum A. Histoloji ve Hücre Hücre Biyolojisi-Patolojiye Giriş. Palme Yayıncılık, Çev. Ed: Prof. Dr. Ramazan Demir. Mosby Inc., 618s; 2006.
19. Junqueira LC, Mescher AL. Junqueira's basic histology: text & atlas/Anthony L. Mescher: New York [etc.]: McGraw-Hill Medical; 2013.
20. Ruimerman R. Modeling and remodeling in bone tissue: Technische Universiteit Eindhoven Eindhoven; 2005.
21. Kroese-Deutman H. Closing capacity of bone defects, scaffolds, porosity and growth factors updated: [SI: sn]; 2009.
22. Papageorgiou P. Accelerated bone healing by tissue progenitor recruitment inducing hydrogels: University of Zurich; 2017.
23. Aydın BK. Pentoksifilin kullanımının kırık iyileşmesi üzerine etkisinin ratlarda incelenmesi. T.C. Sağlık Bakanlığı Baltalimanı Metin Sabancı Kemik Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Ortopedi ve Travmatoloji Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul, (Tez Danışmanı: Doç. Dr. Vedat Şahin). 2007:2-36.
24. Hata K, Takahata Y, Murakami T, Nishimura R. Transcriptional network controlling endochondral ossification. Journal of bone metabolism. 2017;24(2):75-82.
25. Barrientos S, Stojadinovic O, Golinko MS, Brem H, Tomic-Canic M. Growth factors and cytokines in wound healing. Wound repair and regeneration. 2008;16(5):585-601.
26. Cervantes-Diaz F, Contreras P, Marcellini S. Evolutionary origin of endochondral ossification: the transdifferentiation hypothesis. Development genes and evolution. 2017;227(2):121-7.
27. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. BioMed research international. 2015;2015.
28. Kierszenbaum AL, Demir R. Histoloji Ve Hücrebiyolojisi: Patolojiye Giriş: Palme Yayıncılık; 2006.

29. Junqueira L, Carneiro J, Kelley R. Basic Histology. McGraw-Hill, New York, pp. 141-159.: New York: McGraw-Hill; 2003.
30. Pilitsis JG, Lucas DR, Rengachary SR. Bone healing and spinal fusion. Neurosurgical focus. 2002;13(6):1-6.
31. Sharma RR, Pollock K, Hubel A, McKenna D. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices. Transfusion. 2014;54(5):1418-37.
32. Li Y, Yu X, Lin S, Li X, Zhang S, Song Y-H. Insulin-like growth factor 1 enhances the migratory capacity of mesenchymal stem cells. Biochemical and biophysical research communications. 2007;356(3):780-4.
33. James AW. Review of signaling pathways governing MSC osteogenic and adipogenic differentiation. Scientifica. 2013;2013.
34. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. Macromolecular bioscience. 2004;4(8):743-65.
35. Glorieux FH. Pediatric bone: biology & diseases 2nd ed.: Elsevier; 2003. 1-28 p.
36. Recker RR, Barger-Lux J. Embryology, anatomy, and microstructure of bone. Disorders of bone and mineral metabolism New York: Raven. 1992;219.
37. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders. 2001;2(1):81-94.
38. Sodek J, Mckee MD. Molecular and cellular biology of alveolar bone. Periodontology 2000. 2000;24(1):99-126.
39. Manolagas SC. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocrine reviews. 2000;21(2):115-37.
40. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of alkaline phosphatase in health and disease. Journal of Nippon Medical School. 2010;77(1):4-12.
41. Boyce B. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. Journal of dental research. 2013;92(10):860-7.
42. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists. 2006;235(1):176-90.
43. Bonewald LF. The amazing osteocyte. Journal of bone and mineral research. 2011;26(2):229-38.
44. Verborgt O, Gibson GJ, Schaffler MB. Loss of osteocyte integrity in association with microdamage and bone remodeling after fatigue in vivo. Journal of bone and mineral research. 2000;15(1):60-7.

45. Mohamed AM. An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation. *The Malaysian journal of medical sciences: MJMS*. 2008;15(1):4.
46. Zhou L, Somasundaram R, Nederhof RF, Dijkstra G, Faber KN, Peppelenbosch MP, et al. Impact of human granulocyte and monocyte isolation procedures on functional studies. *Clin Vaccine Immunol*. 2012;19(7):1065-74.
47. Italiani P, Boraschi D. From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation. *Frontiers in immunology*. 2014;5:514.
48. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nature reviews immunology*. 2011;11(11):762.
49. Wu AC, Raggatt LJ, Alexander KA, Pettit AR. Unraveling macrophage contributions to bone repair. *BoneKey reports*. 2013;2.
50. Brodbeck WG, Anderson JM. Giant cell formation and function. *Current opinion in hematology*. 2009;16(1):53.
51. Thomsen P, Gretzer C. Macrophage interactions with modified material surfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2001;5(2-3):163-76.
52. Xia Z, Triffitt JT. A review on macrophage responses to biomaterials. *Biomedical materials*. 2006;1(1):R1.
53. Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science*. 2000;289(5484):1504-8.
54. Holtrop ME, King GJ. The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications. *Clinical orthopaedics and related research*. 1977(123):177-96.
55. Saftig P, Hunziker E, Wehmeyer O, Jones S, Boyde A, Rommerskirch W, et al. Impaired osteoclastic bone resorption leads to osteopetrosis in cathepsin-K-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(23):13453-8.
56. Li X, Qin L, Bergenstock M, Bevelock LM, Novack DV, Partridge NC. Parathyroid hormone stimulates osteoblastic expression of MCP-1 to recruit and increase the fusion of pre/osteoclasts. *Journal of biological chemistry*. 2007;282(45):33098-106.
57. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) recruits osteoclast precursors by inducing chemotaxis, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity, and collagen transmigration. *Journal of bone and mineral research*. 2003;18(8):1404-18.
58. Kikuta J, Ishii M. Osteoclast migration, differentiation and function: novel therapeutic targets for rheumatic diseases. *Rheumatology*. 2012;52(2):226-34.
59. Fuller K, Murphy C, Kirstein B, Fox SW, Chambers TJ. TNF α potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology*. 2002;143(3):1108-18.

60. Axmann R, Böhm C, Krönke G, Zwerina J, Smolen J, Schett G. Inhibition of interleukin-6 receptor directly blocks osteoclast formation in vitro and in vivo. *Arthritis & rheumatism*. 2009;60(9):2747-56.
61. Brodsky B, Persikov AV. Molecular structure of the collagen triple helix. *Advances in protein chemistry*. 70: Elsevier; 2005. p. 301-39.
62. Brodsky B, Ramshaw JA. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biology*. 1997;15(8-9):545-54.
63. Knott L, Bailey AJ. Collagen cross-links in mineralizing tissues: a review of their chemistry, function, and clinical relevance. *Bone*. 1998;22(3):181-7.
64. Fuchs RK, Thompson WR, Warden SJ. Bone biology. *Bone Repair Biomaterials*: Elsevier; 2019. p. 15-52.
65. Seeman E, Delmas PD. Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility. *New England journal of medicine*. 2006;354(21):2250-61.
66. Martin E, Shapiro JR. Osteogenesis imperfecta: epidemiology and pathophysiology. *Current osteoporosis reports*. 2007;5(3):91-7.
67. Vashishth D, Gibson G, Khoury J, Schaffler M, Kimura J, Fyhrie DP. Influence of nonenzymatic glycation on biomechanical properties of cortical bone. *Bone*. 2001;28(2):195-201.
68. Landis WJ, Hodgens KJ, Arena J, Song MJ, McEwen BF. Structural relations between collagen and mineral in bone as determined by high voltage electron microscopic tomography. *Microscopy research and technique*. 1996;33(2):192-202.
69. Landis WJ, Hodgens KJ, Song MJ, Arena J, Kiyonaga S, Marko M, et al. Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. *Journal of structural biology*. 1996;117(1):24-35.
70. Jee W. Integrated bone tissue physiology: anatomy and physiology. *Bone mechanics handbook*. 2001.
71. Taylor J. The periosteum and bone growth. *Bone*. 1992;6:21-52.
72. Hohmann EL, Elde RP, Rysavy JA, Einzig S, Gebhard RL. Innervation of periosteum and bone by sympathetic vasoactive intestinal peptide-containing nerve fibers. *Science*. 1986;232(4752):868-71.
73. Ito Y, Fitzsimmons J, Sanyal A, Mello M, Mukherjee N, O'driscoll S. Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis and Cartilage*. 2001;9(3):215-23.
74. Nakahara H, Bruder SP, Goldberg VM, Caplan AI. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum. *Clinical orthopaedics and related research*. 1990(259):223-32.

75. Nakahara H, Bruder S, Haynesworth S, Holecek J, Baber M, Goldberg V, et al. Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone*. 1990;11(3):181-8.
76. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone*. 2004;35(5):1003-12.
77. Islam A, Glomski C, Henderson ES. Bone lining (endosteal) cells and hematopoiesis: A light microscopic study of normal and pathologic human bone marrow in plastic-embedded sections. *The Anatomical Record*. 1990;227(3):300-6.
78. Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature*. 2014;505(7483):327.
79. Oryan A, Monazzah S, Bigham-Sadegh A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomedical and environmental sciences*. 2015;28(1):57-71.
80. Doblaré M, Garcia J, Gómez M. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*. 2004;71(13-14):1809-40.
81. Isaksson H, Comas O, van Donkelaar CC, Mediavilla J, Wilson W, Huiskes R, et al. Bone regeneration during distraction osteogenesis: mechano-regulation by shear strain and fluid velocity. *Journal of biomechanics*. 2007;40(9):2002-11.
82. Ferguson C, Alpern E, Miclau T, Helms JA. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mechanisms of development*. 1999;87(1-2):57-66.
83. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, Cox K, Kakar S, Gerstenfeld L, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature genetics*. 2006;38(12):1424.
84. Sakou T. Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches. *Bone (New York, NY)*. 1998;22(6):591-603.
85. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater*. 2008;15(53):e76.
86. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 1998;355:S7-S21.
87. Kini U, Nandeesh B. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. *Radionuclide and hybrid bone imaging: Springer*; 2012. p. 29-57.
88. Mackie E, Ahmed Y, Tatarczuch L, Chen K-S, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2008;40(1):46-62.
89. Goldring MB, Tsuchimochi K, Ijiri K. The control of chondrogenesis. *Journal of cellular biochemistry*. 2006;97(1):33-44.

90. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A. Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard tissue*. 2013;2(2):1-12.
91. Uchida S, Sakai A, Kudo H, Otomo H, Watanuki M, Tanaka M, et al. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone*. 2003;32(5):491-501.
92. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36(12):1392-404.
93. Massague J, Attisano L, Wrana JL. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends in cell biology*. 1994;4(5):172-8.
94. Cheng H, Jiang W, Phillips FM, Haydon RC, Peng Y, Zhou L, et al. Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs). *JBJS*. 2003;85(8):1544-52.
95. Chen G, Deng C, Li Y-P. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. *International journal of biological sciences*. 2012;8(2):272.
96. Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, et al. Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(39):33132-40.
97. Zernik J, Twarog K, Upholt WB. Regulation of alkaline phosphatase and alpha2 (I) procollagen synthesis during early intramembranous bone formation in the rat mandible. *Differentiation*. 1990;44(3):207-15.
98. Rucci N. Molecular biology of bone remodelling. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*. 2008;5(1):49.
99. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(33):25103-8.
100. Cowin SC, Moss-Salentijn L, Moss ML. Candidates for the mechanosensory system in bone. *Journal of biomechanical engineering*. 1991;113(2):191-7.
101. Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *BoneKEy reports*. 2014;3.
102. Hollinger JO, Kleinschmidt JC. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery*. 1990;1(1):60-8.
103. Abrahamsson P, Wälivaara DÅ, Anderud J, Jimbo R. Vertical bone augmentation with titanium granule blocks in rabbit calvaria. *Clinical and experimental dental research*. 2017;3(3):100-6.
104. Doğan E, Okumuş Z. Farklı kemik greftlerinin kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin klinik, radyolojik, biyokimyasal ve histolojik olarak araştırılması. 2012.
105. Lane JM, Sandhu H. Current approaches to experimental bone grafting. *The Orthopedic clinics of North America*. 1987;18(2):213-25.

106. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA. Alternatives to autogenous bone graft: efficacy and indications. *JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*. 1995;3(1):1-8.
107. Shors EC. Coralline bone graft substitutes. *Orthopedic Clinics*. 1999;30(4):599-613.
108. Reddi A, Wientroub S, Muthukumaran N. Biologic principles of bone induction. *The Orthopedic Clinics of North America*. 1987;18(2):207-12.
109. Bernard G. Healing and repair of osseous defects. *Dental Clinics of North America*. 1991;35(3):469-77.
110. Aybar B. Oral cerrahide kemik defektlerinin onarımı. *İstanbul Tıp Fakültesi Dergisi; Cilt 63, Sayı 3 (2000)*. 2011.
111. Keller EE, Triplett WW. Iliac bone grafting: review of 160 consecutive cases. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1987;45(1):11-4.
112. Ripamonti U. The induction of bone in osteogenic composites of bone matrix and porous hydroxyapatite replicas: an experimental study on the baboon (*Papio ursinus*). *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 1991;49(8):817-30.
113. Horowitz R, Leventis M, D Rohrer M, S Prasad H. Bone grafting: History, rationale, and selection of materials and techniques2014. 1-6;quiz7 p.
114. Tuskan C, Yaltırık M. Oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanılan biyomateryaller. *Ü Basım ve Yayınevi Müdürlüğü, İstanbul*. 2002:19-26.
115. Dinopoulos H, Dimitriou R, Giannoudis PV. RETRACTED: Bone graft substitutes: What are the options? : Elsevier; 2012.
116. Tanrıku S, Gönen E. Kırık iyileşmesi. *Türk Ortopedi ve Travmatoloji Birliği Derneği Dergisi*. 2017;16:455-75.
117. Burchardt H. The biology of bone graft repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1983(174):28-42.
118. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes. Expert review of medical devices. 2006;3(1):49-57.
119. Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965;150(3698):893-9.
120. Vandrovcová M, Bacakova L. Adhesion, growth and differentiation of osteoblasts on surface-modified materials developed for bone implants. *Physiological Research*. 2011;60(3):403.
121. Thorwarth M, Wehrhan F, Srouf S, Schultze-Mosgau S, Felszeghy E, Bader R, et al. Evaluation of substitutes for bone: comparison of microradiographic and histological assessments. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2007;45(1):41-7.

122. Boyan B, Schwartz Z, Lohmann C, Sylvia V, Cochran D, Dean D, et al. Pretreatment of bone with osteoclasts affects phenotypic expression of osteoblast-like cells. *Journal of orthopaedic research*. 2003;21(4):638-47.
123. Bielby R, Jones E, McGonagle D. The role of mesenchymal stem cells in maintenance and repair of bone. *Injury*. 2007;38(1):S26-S32.
124. Fleming JE, Cornell CN, Muschler GF. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthopedic Clinics*. 2000;31(3):357-74.
125. Chesmel KD, Branger J, Wertheim H, Scarborough N. Healing response to various forms of human demineralized bone matrix in athymic rat cranial defects. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 1998;56(7):857-63.
126. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ journal of surgery*. 2001;71(6):354-61.
127. Cypher TJ, Grossman JP. Biological principles of bone graft healing. *The Journal of foot and ankle surgery*. 1996;35(5):413-7.
128. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials: an overview of the basic science. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2000;371:10-27.
129. Kumar P, Vinitha B, Fathima G. Bone grafts in dentistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2013;5(Suppl 1):S125-S7.
130. Bohner M, Galea L, Doebelin N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. *Journal of the european ceramic society*. 2012;32(11):2663-71.
131. Cavalier S. *New Strategies for Bone Graft Materials*: McGill University Libraries; 2016.
132. Prolo DJ, Rodrigo JJ. Contemporary bone graft physiology and surgery. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 1985;200:322-42.
133. Zipfel GJ, Guiot BH, Fessler RG. Bone grafting. *Neurosurgical focus*. 2003;14(2):1-8.
134. Burwell RG. Osteogenesis in cancellous bone grafts: considered in terms of cellular changes, basic mechanisms and the perspective of growth-control and its possible aberrations. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 1965;40:35-47.
135. Enneking WF, Burchardt H, Puhl JJ, Piotrowski G. Physical and biological aspects of repair in dog cortical-bone transplants. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1975;57(2):237-52.
136. Zucman J, Maurer P, Berbesson C. The effect of autografts of bone and periosteum in recent diaphysial fractures: An experimental study in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1968;50(2):409-22.
137. Siffert RS. Experimental bone transplants. *JBS*. 1955;37(4):742-58.

138. Bridges J, Pritchard J. Bone and cartilage induction in the rabbit. *Journal of anatomy*. 1958;92(Pt 1):28.
139. Jensen SS. Bone grafting materials in bone repair: Experimental studies 2017.
140. Ozkan E, Bereket MC, Onger ME, Polat AV. The Effect of Unfocused Extracorporeal Shock Wave Therapy on Bone Defect Healing in Diabetics. *The Journal of craniofacial surgery*. 2018;29(4):1081-6.
141. Keating J, McQueen M. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2001;83(1):3-8.
142. Laursen M, Christensen F, Bünger C, Lind M. Optimal handling of fresh cancellous bone graft different peroperative storing techniques evaluated by in vitro osteoblast-like cell metabolism. *Acta Orthopaedica Scandinavica*. 2003;74(4):490-6.
143. Rocha FS, Batista JD, Zanetta-Barbosa D, Dechichi P. Effect of different storage media on the regenerative potential of autogenous bone grafts: a histomorphometrical analysis in rabbits. *Journal of Oral Implantology*. 2013;39(6):635-42.
144. Tomin E, Beksaç B, Lane M. Amerika Birleşik Devletlerinde Ortopedik Girişimlerinde Ototogreftlerin Yerine Kullanılan Materyallere Toplu Bakış. Derleme. *Journal of Arthroplasty&Arthroscopic Surgery*. 2002;13(2):114-29.
145. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma*. 1989;3(3):192-5.
146. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *JBJS*. 2002;84(3):454-64.
147. Boskey AL, Coleman R. Aging and bone. *Journal of dental research*. 2010;89(12):1333-48.
148. Seeman E. Bone quality: the material and structural basis of bone strength. *Journal of bone and mineral metabolism*. 2008;26(1):1-8.
149. Suttapreyasri S, Koontongkaew S, Phongdara A, Leggat U. Expression of bone morphogenetic proteins in normal human intramembranous and endochondral bones. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2006;35(5):444-52.
150. Kochanowska I, Chaberek S, Wojtowicz A, Marczyński B, Włodarski K, Dytko M, et al. Expression of genes for bone morphogenetic proteins BMP-2, BMP-4 and BMP-6 in various parts of the human skeleton. *BMC musculoskeletal disorders*. 2007;8(1):128.
151. Nkenke E, Neukam FW. Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol*. 2014;7(Suppl 2):S203-S17.
152. Ozaki W, Buchman SR. Volume maintenance of onlay bone grafts in the craniofacial skeleton: micro-architecture versus embryologic origin. *Plastic and reconstructive surgery*. 1998;102(2):291-9.

153. Ozaki W, Buchman SR, Goldstein SA, Fyhrie DP. A comparative analysis of the microarchitecture of cortical membranous and cortical endochondral onlay bone grafts in the craniofacial skeleton. *Plastic and reconstructive surgery*. 1999;104(1):139-47.
154. Garg AK. Bone biology, harvesting, and grafting for dental implants: rationale and clinical applications. 2004.
155. Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg*. 2001;71(6):354-61.
156. Silva RV, Camilli JA, Bertran CA, Moreira NH. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005;34(2):178-84.
157. İpekoğlu M, Gören Ş, İpek M, Gümüşpala S, Altıntaş S. Hidroksiapatit üretiminde farklı yöntemlerin karşılaştırılması. *BİYOMUT 2004 Biyomedikal Mühendisliği Ulusal Toplantısı*. 2004:78-83.
158. Kim YS, Kang YH, Kim JK, Park JB. Effect of bone mineral particles on the porosity of bone cement. *Bio-medical materials and engineering*. 1994;4(1):37-46.
159. Papadimitriou DE, Schmidt EC, Caton JG, Romanos GE. Morphology of bone particles after harvesting with 4 different devices. *Implant dentistry*. 2013;22(2):187-92.
160. Miron R, Hedbom E, Saulacic N, Zhang Y, Sculean A, Bosshardt D, et al. Osteogenic potential of autogenous bone grafts harvested with four different surgical techniques. *Journal of dental research*. 2011;90(12):1428-33.
161. Von See C, Rücker M, Kampmann A, Kokemüller H, Bormann K-H, Gellrich N-C. Comparison of different harvesting methods from the flat and long bones of rats. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2010;48(8):607-12.
162. Springer IN, Terheyden H, Geiß S, Härle F, Hedderich J, Açil Y. Particulated bone grafts—effectiveness of bone cell supply. *Clinical Oral Implants Research*. 2004;15(2):205-12.
163. Saulacic N, Bosshardt DD, Jensen SS, Miron RJ, Gruber R, Buser D. Impact of bone graft harvesting techniques on bone formation and graft resorption: a histomorphometric study in the mandibles of minipigs. *Clinical oral implants research*. 2015;26(4):383-91.
164. Pradel W, Tenbrieg P, Lauer G. Influence of harvesting technique and donor site location on in vitro growth of osteoblastlike cells from facial bone. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2005;20(6).
165. Rocchietta I, Simion M, Hoffmann M, Trisciuglio D, Benigni M, Dahlin C. Vertical bone augmentation with an autogenous block or particles in combination with guided bone regeneration: A clinical and histological preliminary study in humans. *Clinical implant dentistry and related research*. 2016;18(1):19-29.
166. Jensen SS, Terheyden H. 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.

167. Erpenstein H, Diedrich P, Borchard R. Preparation of autogenous bone grafts in two different bone mills. *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. 2001;21(6).
168. Chiriac G, Herten M, Schwarz F, Rothamel D, Becker J. Autogenous bone chips: influence of a new piezoelectric device (Piezosurgery®) on chip morphology, cell viability and differentiation. *Journal of clinical periodontology*. 2005;32(9):994-9.
169. Gruber R, Baron M, Busenlechner D, Kandler B, Fuerst G, Watzek G. Proliferation and osteogenic differentiation of cells from cortical bone cylinders, bone particles from mill, and drilling dust. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2005;63(2):238-43.
170. Blay A, Tunchel S, Sendyk WR. Viability of autogenous bone grafts obtained by using bone collectors: histological and microbiological study. *Pesquisa Odontológica Brasileira*. 2003;17(3):234-40.
171. Jensen SS. *Bone Grafting Materials in Bone Repair: Experimental Studies [Doctoral Thesis]*: Copenhagen University; 2016.
172. Karaismailoğlu T, Tomak Y, Andaç A, Ergün E. Comparison of autograft, coralline graft, and xenograft in promoting posterior spinal fusion. *Acta orthopaedica et traumatologica turcica*. 2002;36(2):147-54.
173. Ferguson J. Fracture of the humerus after cancellous bone graft harvesting in a dog. *Journal of small animal practice*. 1996;37(5):232-4.
174. Wilson J, Rhinelander F, Stewart C. Vascularization of cancellous chip bone grafts. *American journal of veterinary research*. 1985;46(8):1691-9.
175. Hierholzer C, Sama D, Toro JB, Peterson M, Helfet DL. Plate fixation of ununited humeral shaft fractures: effect of type of bone graft on healing. *JBJS*. 2006;88(7):1442-7.
176. Bostrom M, Yang X, Kennan M, Sandhu H, Dicarolo E, Lane J. An unexpected outcome during testing of commercially available demineralized bone graft materials: how safe are the nonallograft components? *Spine*. 2001;26(13):1425-8.
177. Pelker RR, Friedlaender GE. Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *The Orthopedic clinics of North America*. 1987;18(2):235-9.
178. Burwell RG. Studies in the transplantation of bone VII. The Fresh Composite Homograft-Autograft of Cancellous Bone. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1964;46(1):110-40.
179. Virolainen P, Perälä M, Vuorio E, Aro HT. Expression of matrix genes during incorporation of cancellous bone allografts and autografts. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995(317):263-72.
180. Doi K, Tominaga S, Shibata T. Bone grafts with microvascular anastomoses of vascular pedicles: an experimental study in dogs. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1977;59(6):809-15.

181. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *JBJS*. 1998;80(7):985-96.
182. Nade S. Osteogenesis after Bone and Bone Marrow Transplantation: II. The Initial Cellular Events Following Transplantation of Decalcified Allografts of Cancellous Bone. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 1977;48(6):572-9.
183. Connolly JF. Injectable bone marrow preparations to stimulate osteogenic repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1995(313):8-18.
184. Shegarfi H, Reikeras O. Bone transplantation and immune response. *Journal of Orthopaedic Surgery*. 2009;17(2):206-11.
185. Amler MH. Osteogenic potential of nonvital tissues and synthetic implant materials. *Journal of periodontology*. 1987;58(11):758-61.
186. Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury*. 2011;42:S16-S21.
187. Stevenson S, Li XQ, Martin B. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1991;73(8):1143-56.
188. Burwell RG, Gowland G, Dexter F. Studies in the transplantation of bone VI. Further observations concerning the antigenicity of homologous cortical and cancellous bone. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1963;45(3):597-608.
189. Schwartz Z, Mellonig J, Carnes D, De La Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, et al. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *Journal of periodontology*. 1996;67(9):918-26.
190. Sanrı M. Cerrahi Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinde Sığır Kaynaklı Anorganik Kemik Grefti ve Kanama Durdurucu Bitki Ekstresinin Kombine Kullanımının Kemik Rejenerasyonuna Etkisi: Doktora Tezi, Çukurova Üni. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana-2013.
191. Voggenreiter G, Ascherl R, Blümel G, Schmit-Neuerburg K. Effects of preservation and sterilization on cortical bone grafts. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 1994;113(5):294-6.
192. Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ. Effects of freezing and freeze-drying on the biomechanical properties of rat bone. *Journal of Orthopaedic Research*. 1983;1(4):405-11.
193. Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC. Biomechanical properties of bone allografts. *Clinical orthopaedics and related research*. 1983(174):54-7.
194. Schlee M, Rothamel D. Ridge augmentation using customized allogenic bone blocks: proof of concept and histological findings. *Implant dentistry*. 2013;22(3):212-8.

195. Baldini N, De Sanctis M, Ferrari M. Deproteinized bovine bone in periodontal and implant surgery. *Dental materials*. 2011;27(1):61-70.
196. Esposito M, Felice P, Worthington HV. Interventions for replacing missing teeth: augmentation procedures of the maxillary sinus. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2014(5).
197. Handschel J, Simonowska M, Naujoks C, Depprich RA, Ommerborn MA, Meyer U, et al. A histomorphometric meta-analysis of sinus elevation with various grafting materials. *Head & face medicine*. 2009;5(1):12.
198. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft in animals: a systematic review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2012;41(1):114-20.
199. Jensen T, Schou S, Stavropoulos A, Terheyden H, Holmstrup P. Maxillary sinus floor augmentation with Bio-Oss or Bio-Oss mixed with autogenous bone as graft: a systematic review. *Clinical oral implants research*. 2012;23(3):263-73.
200. Demers C, Hamdy CR, Corsi K, Chellat F, Tabrizian M, Yahia LH. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Bio-medical materials and engineering*. 2002;12(1):15-35.
201. Christian S, Doris M, Alexis S, Georgios L, Else S, Franz K, et al. The fluorohydroxyapatite (FHA) FRIOS® Algipore® is a suitable biomaterial for the reconstruction of severely atrophic human maxillae. *Clinical oral implants research*. 2003;14(6):743-9.
202. Turhani D, Cvikl B, Watzinger E, Weißenböck M, Yerit K, Thurnher D, et al. In vitro growth and differentiation of osteoblast-like cells on hydroxyapatite ceramic granule calcified from red algae. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2005;63(6):793-9.
203. Habal MB, Reddi AH. *Bone grafts & bone substitutes*: Saunders; 1992.
204. Will R, Ironside J, Zeidler M, Estibeiro K, Cousens S, Smith P, et al. A new variant of Creutzfeldt-Jakob disease in the UK. *The Lancet*. 1996;347(9006):921-5.
205. Nienhuijs ME, Walboomers XF, Merckx MA, Stoelinga PJ, Jansen JA. Bone-like tissue formation using an equine COLLOSS® E-filled titanium scaffolding material. *Biomaterials*. 2006;27(16):3109-14.
206. Efeoğlu A. Periodontal tedavide kemik greftleri. *Akademik Dental Dişhekimliği Dergisi*. 2002;4(1):1-13.
207. Rekow D. Informatics challenges in tissue engineering and biomaterials. *Advances in dental research*. 2003;17(1):49-54.
208. Revell PA. *Pathology of bone*: Springer Science & Business Media; 2012.
209. Arinze TL, Tran T, Mcalary J, Daculsi G. A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation. *Biomaterials*. 2005;26(17):3631-8.

210. Tomin E, Beksaç B, Joseph M. Amerika birleşik devletlerinde ortopedik girişimlerde otogreftlerin yerine kullanılan materyallere toplu bakış. *Journal Of Arthroplasty & Arthroscopic Surgery*. 2002;13(2):114-29.
211. Gupta D, Khanna S, Tuli S. Bridging large bone defects with a xenograft composited with autologous bone marrow. *International orthopaedics*. 1982;6(2):79-85.
212. Horowitz I, Bodner L. Use of xenograft bone with aspirated bone marrow for treatment of cystic defect of the jaws. *Head & neck*. 1989;11(6):516-23.
213. Yuceer E, Ozkan N, Emin Onger M. Socket preservation using autogenous particulated dentin graft—a clinical study. *Clinical Oral Implants Research*. 2018;29:431-.
214. Dallari D, Savarino L, Stagni C, Cenni E, Cenacchi A, Fornasari P, et al. Enhanced tibial osteotomy healing with use of bone grafts supplemented with platelet gel or platelet gel and bone marrow stromal cells. *JBJS*. 2007;89(11):2413-20.
215. Lind M, Büngrer C. Factors stimulating bone formation. *European Spine Journal*. 2001;10(2):S102-S9.
216. Chen Y. Orthopedic applications of gene therapy. *Journal of orthopaedic science*. 2001;6(2):199-207.
217. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e37-e44.
218. Spotnitz WD, Burks S. Hemostats, sealants, and adhesives: components of the surgical toolbox. *Transfusion*. 2008;48(7):1502-16.
219. Arnoczky SP, Delos D, Rodeo SA. What is platelet-rich plasma? *Operative Techniques in Sports Medicine*. 2011;19(3):142-8.
220. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thrombosis and haemostasis*. 2004;91(01):4-15.
221. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):e45-e50.
222. Kiran N, Mukunda K, Tilak Raj T. Platelet concentrates: A promising innovation in dentistry. *J Dent Sci Res*. 2011;2(1):50-61.
223. Italiano JE, Lecine P, Shivdasani RA, Hartwig JH. Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes. *The Journal of cell biology*. 1999;147(6):1299-312.
224. Welsh WJ. Autologous platelet gel: clinical function and usage in plastic surgery. *Cosmetic Derm*. 2000;11:13.

225. Heijnen HF, Debili N, Vainchencker W, Breton-Gorius J, Geuze HJ, Sixma JJ. Multivesicular bodies are an intermediate stage in the formation of platelet α -granules. *Blood*. 1998;91(7):2313-25.
226. McFadyen JD, Kaplan ZS. Platelets are not just for clots. *Transfusion Medicine Reviews*. 2015;29(2):110-9.
227. Anitua E, Prado R, Sánchez M, Orive G. Platelet-rich plasma: preparation and formulation. *Operative techniques in orthopaedics*. 2012;22(1):25-32.
228. Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proceedings of the national academy of sciences*. 1974;71(4):1207-10.
229. Niessen FB, Andriessen MP, Schalkwijk J, Visser L, Timens W. Keratinocyte-derived growth factors play a role in the formation of hypertrophic scars. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2001;194(2):207-16.
230. Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome biology*. 2001;2(3):reviews3005.1.
231. Abraham JA, Klagsbrun M. Modulation of wound repair by members of the fibroblast growth factor family. *The molecular and cellular biology of wound repair*: Springer; 1988. p. 195-248.
232. Werner S. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine & growth factor reviews*. 1998;9(2):153-65.
233. Wong RWC, Guillaud L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. *Cytokine & growth factor reviews*. 2004;15(2-3):147-56.
234. Greenhalgh DG. The role of growth factors in wound healing. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*. 1996;41(1):159-67.
235. Melincovici CS, Bosca AB, Susman S, Marginean M, Mihu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*. 2018;59(2):455-67.
236. Clark D, Wang X, Chang S, Czajka-Jakubowska A, Clarkson B, Liu J. VEGF promotes osteogenic differentiation of ASCs on ordered fluorapatite surfaces. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015;103(2):639-45.
237. Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding proteins and their role in controlling IGF actions. *Cytokine & growth factor reviews*. 1997;8(1):45-62.
238. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN. Growth factors in wound healing. Single and synergistic effects on partial thickness porcine skin wounds. *The Journal of clinical investigation*. 1989;84(2):640-6.

239. Li A, Koroly MJ, Schattenkerk ME, Malt RA, Young M. Nerve growth factor: acceleration of the rate of wound healing in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(7):4379-81.
240. Matsuda H, Koyama H, Sato H, Sawada J, Itakura A, Tanaka A, et al. Role of nerve growth factor in cutaneous wound healing: accelerating effects in normal and healing-impaired diabetic mice. *Journal of Experimental Medicine*. 1998;187(3):297-306.
241. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annual review of cell biology*. 1990;6(1):597-641.
242. Lichtman MK, Otero-Vinas M, Falanga V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis. *Wound Repair and Regeneration*. 2016;24(2):215-22.
243. Massagué J. TGF- β signal transduction. *Annual Reviews* 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 1998.
244. Kubota S, Kawata K, Yanagita T, Doi H, Kitoh T, Takigawa M. Abundant retention and release of connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) by platelets. *Journal of biochemistry*. 2004;136(3):279-82.
245. Maurer A-M, Zhou B, Han ZC. Roles of platelet factor 4 in hematopoiesis and angiogenesis. *Growth Factors*. 2006;24(4):242-52.
246. Komura M, Komura H, Konishi K, Ishimaru T, Hoshi K, Takato T, et al. Promotion of tracheal cartilage growth by intra-tracheal injection of basic fibroblast growth factor (b-FGF). *Journal of pediatric surgery*. 2014;49(2):296-300.
247. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002;99(15):9656-61.
248. Jingushi S, Heydemann A, Kana S, Macey L, Bolander M. Acidic fibroblast growth factor (aFGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research*. 1990;8(3):364-71.
249. Weisel JW, Litvinov RI. Fibrin formation, structure and properties. *Fibrous Proteins: Structures and Mechanisms*: Springer; 2017. p. 405-56.
250. Kumar RV, Shubhashini N. Platelet rich fibrin: a new paradigm in periodontal regeneration. *Cell and tissue banking*. 2013;14(3):453-63.
251. Kingsley C. Blood coagulation: evidence of an antagonist to factor VI in platelet-rich human plasma. *Nature*. 1954;173(4407):723.
252. Grey E. Fibrin as a hemostatic in cerebral surgery. *Surg Gynecol Obstet*. 1915;21(3):452-8.
253. Young J, Medawar P. Fibrin suture of peripheral nerves: measurement of the rate of regeneration. *The Lancet*. 1940;236(6101):126-8.

254. Tidrick R, Warner E. Fibrin fixation of skin transplants. *Surgery*. 1944;15(1):90-5.
255. Matras H, Dinges H, Lassmann H, Mamoli B. Suture-free interfascicular nerve transplantation in animal experiments. *Wiener medizinische Wochenschrift* (1946). 1972;122(37):517-23.
256. Dresdale A, Rose E, Jeevanandam V, Reemtsma K, Bowman F, Malm J. Preparation of fibrin glue from single-donor fresh-frozen plasma. *Surgery*. 1985;97(6):750-5.
257. Whitman DH, Berry RL, Green DM. Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 1997;55(11):1294-9.
258. Valbonesi M. Fibrin glues of human origin. *Best Practice & Research Clinical Haematology*. 2006;19(1):191-203.
259. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Austin LL, Butler EL. Classification and treatment of chronic nonhealing wounds. Successful treatment with autologous platelet-derived wound healing factors (PDWHF). *Annals of surgery*. 1986;204(3):322.
260. Martinowitz U, Saltz R. Fibrin sealant. *Current opinion in hematology*. 1996;3(5):395-402.
261. Dunn CJ, Goa KL. Fibrin sealant. *Drugs*. 1999;58(5):863-86.
262. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR. Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1998;85(6):638-46.
263. Marx RE. Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant dentistry*. 2001;10(4):225-8.
264. Choukroun J, Adda F, Schoeffler C, Vervelle A. Une opportunité en paro-implantologie: le PRF. *Implantodontie*. 2001;42(55):e62.
265. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, 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):e51-e5.
266. M Dohan Ehrenfest D, Bielecki T, Mishra A, Borzini P, Inchingolo F, Sammartino G, et al. In search of a consensus terminology in the field of platelet concentrates for surgical use: platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), fibrin gel polymerization and leukocytes. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2012;13(7):1131-7.
267. Ehrenfest DMD, Andia I, Zumstein MA, Zhang C-Q, Pinto NR, Bielecki T. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscles, ligaments and tendons journal*. 2014;4(1):3.

268. Ehrenfest DMD, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in biotechnology*. 2009;27(3):158-67.
269. Ehrenfest DMD, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *Journal of periodontology*. 2010;81(4):546-55.
270. Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso MD, Kang B-S, et al. The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets*. 2018;29(2):171-84.
271. Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized platelet-rich fibrin with the low-speed concept: growth factor release, biocompatibility, and cellular response. *Journal of periodontology*. 2017;88(1):112-21.
272. Miron RJ, Fujioka-Kobayashi M, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Ghanaati S, et al. Injectable platelet rich fibrin (i-PRF): opportunities in regenerative dentistry? *Clinical oral investigations*. 2017;21(8):2619-27.
273. Sacco L. Lecture, International academy of implant prosthesis and osteoconnection. *Lecture*. 2006;12:4.
274. Tunalı M, Özdemir H, Küçükodacı Z, Akman S, Fıratlı E. In vivo evaluation of titanium-prepared platelet-rich fibrin (T-PRF): a new platelet concentrate. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2013;51(5):438-43.
275. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *International journal of Oral and maxillofacial Implants*. 1999;14(4):529-35.
276. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler W. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*. 2004;34(4):665-71.
277. Anitua E, Sánchez M, Zalduendo M, De La Fuente M, Prado R, Orive G, et al. Fibroblastic response to treatment with different preparations rich in growth factors. *Cell proliferation*. 2009;42(2):162-70.
278. Kuralay F, Çavdar Z. İnflamatuar medyatörlere toplu bir bakış. *Genel Tıp Derg*. 2006;16(3):143-52.
279. Weibrich G, Kleis WK, Hitzler WE, Hafner G. Comparison of the platelet concentrate collection system with the plasma-rich-in-growth-factors kit to produce platelet-rich plasma: a technical report. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2005;20(1).
280. Anitua E, de la Fuente M, Ferrando M, Quintana F, Larreategui Z, Matorras R, et al. Biological effects of plasma rich in growth factors (PRGF) on human endometrial fibroblasts. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*. 2016;206:125-30.

281. Anitua E, Andí I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zalduendo M, de la Fuente M, et al. Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon cells in culture. *Journal of Orthopaedic Research*. 2005;23(2):281-6.
282. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, et al. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2006;77(2):285-93.
283. Fernández-Barbero JE, Galindo-Moreno P, Ávila-Ortiz G, Caba O, Sánchez-Fernández E, Wang HL. Flow cytometric and morphological characterization of platelet-rich plasma gel. *Clinical Oral Implants Research*. 2006;17(6):687-93.
284. Anitua E, Prado R, Troya M, Zalduendo M, de la Fuente M, Pino A, et al. Implementation of a more physiological plasma rich in growth factor (PRGF) protocol: Anticoagulant removal and reduction in activator concentration. *Platelets*. 2016;27(5):459-66.
285. Bielecki T, Gazdzik T, Arendt J, Szczepanski T, Krol W, Wielkoszynski T. Antibacterial effect of autologous platelet gel enriched with growth factors and other active substances: an in vitro study. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2007;89(3):417-20.
286. El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M, et al. Platelet-rich plasma: growth factors and pro-and anti-inflammatory properties. *Journal of periodontology*. 2007;78(4):661-9.
287. Lesurtel M, Graf R, Aleil B, Walther DJ, Tian Y, Jochum W, et al. Platelet-derived serotonin mediates liver regeneration. *Science*. 2006;312(5770):104-7.
288. Anitua E, Pelacho B, Prado R, Aguirre JJ, Sánchez M, Padilla S, et al. Infiltration of plasma rich in growth factors enhances in vivo angiogenesis and improves reperfusion and tissue remodeling after severe hind limb ischemia. *Journal of controlled release*. 2015;202:31-9.
289. Anitua E, Prado R, Orive G, Tejero R. Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2015;103(3):969-80.
290. Namlı H. Kemik iliği kaynaklı kök hücre kullanımının onlay augmentasyonda etkinliği ve otojen greftleme ile karşılaştırılması [Doktora tezi]: Çukurova Üniversitesi; 2015.
291. Majzoub Z, Berengo M, Giardino R, Aldini NN, Cordioli G. Role of intramarrow penetration in osseous repair: A pilot study in the rabbit calvaria. *Journal of periodontology*. 1999;70(12):1501-10.
292. Kahraman H. Trombositten Zengin Plazma Kullanımının Monoblok İnley Otogreft İyileşmesi Üzerine Etkisinin İncelenmesi [Doktora Tezi]: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2010.

293. Kökdere NN. Kemik defektlerinin iyileşmesinde Trombositten Zengin Fibrin (Tzf)'in etkilerinin deneysel olarak araştırılması; Histomorfometrik Değerlendirme [Doktora tezi]: Süleyman Demirel Üniversitesi; 2012.
294. Molina-Miñano F, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Vicente-Ortega V. Plasma rich in growth factors and bone formation: a radiological and histomorphometric study in New Zealand rabbits. *Brazilian oral research*. 2009;23(3):275-80.
295. Dağ M. Kemik Defektlerinin Onarımında Otojen Greft Kombinasyonlarının Etkinliklerinin Tavşan Kafatası Modelinde Karşılaştırılması [Doktora Tezi]: Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 2015.
296. Zhou AJ-J, Clokie CML, Peel SAF. Bone formation in algae-derived and synthetic calcium phosphates with or without poloxamer. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2013;24(2):354-9.
297. Paknejad M, Rokn AR, Yaghobee S, Moradinejad P, Heidari M, Mehrfard A. Effects of two types of anorganic bovine bone on bone regeneration: A histological and histomorphometric study of rabbit calvaria. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. 2014;11(6):687.
298. Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S. Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2009;38(4):356-62.
299. Yip I, Ma L, Mattheos N, Dard M, Lang NP. Defect healing with various bone substitutes. *Clinical oral implants research*. 2015;26(5):606-14.
300. Tovar N, Jimbo R, Gangolli R, Perez L, Manne L, Yoo D, et al. Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2014;43(2):251-60.
301. Hwang JW, Park JS, Lee JS, Jung UW, Kim CS, Cho KS, et al. Comparative evaluation of three calcium phosphate synthetic block bone graft materials for bone regeneration in rabbit calvaria. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2012;100(8):2044-52.
302. Maté-Sánchez de Val JE, Mazon P, Calvo-Guirado JL, Ruiz RAD, Ramírez Fernández MP, Negri B, et al. Comparison of three hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate/collagen ceramic scaffolds: An in vivo study. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2014;102(4):1037-46.
303. Sohn J-Y, Park J-C, Um Y-J, Jung U-W, Kim C-S, Cho K-S, et al. Spontaneous healing capacity of rabbit cranial defects of various sizes. *Journal of periodontal & implant science*. 2010;40(4):180-7.
304. Paknejad M, Rokn A, Rouzmeh N, Heidari M, Titidej A, Kharazifard MJ, et al. Histologic evaluation of bone healing capacity following application of inorganic bovine bone and a new allograft material in rabbit calvaria. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. 2015;12(1):31.
305. Behnia H, Khojasteh A, Kiani MT, Khoshzaban A, Abbas FM, Bashtar M, et al. Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet-rich

growth factor, and mesenchymal stem cells: a histologic study in rabbit calvaria. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2013;115(2):e7-e15.

306. Pelegrine AA, Aloise AC, Zimmermann A, de Mello e Oliveira R, Ferreira LM. Repair of critical-size bone defects using bone marrow stromal cells: a histomorphometric study in rabbit calvaria. Part I: Use of fresh bone marrow or bone marrow mononuclear fraction. *Clinical Oral Implants Research*. 2014;25(5):567-72.

307. Roberts WE, Simmons KE, Garetto LP, DeCastro R. Bone physiology and metabolism in dental implantology: risk factors for osteoporosis and other metabolic bone diseases. *Implant dentistry*. 1992;1(1):11-21.

308. Torres J, Tamimi F, Tresguerres IF, Alkhraisat MH, Khraisat A, Blanco L, et al. Effect of combining platelet-rich plasma with anorganic bovine bone on vertical bone regeneration: early healing assessment in rabbit calvariae. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2010;25(1).

309. Raghoobar GM, Louwse C, Kalk WW, Vissink A. Morbidity of chin bone harvesting. *Clinical oral implants research*. 2001;12(5):503-7.

310. Hernandez-Alfaro F, Garcia E, Corchero G, Arranz C. Palatal core graft for alveolar reconstruction: a new donor site. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2005;20(5).

311. Morton DB. Advances in refinement in animal experimentation over the past 25 years. *Alternatives to laboratory animals: ATLA*. 1995.

312. Graham J. Common procedures in rabbits. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*. 2006;9(2):367-88.

313. Hutmacher DW. Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues—state of the art and future perspectives. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2001;12(1):107-24.

314. Laurencin CT, Ambrosio A, Borden M, Cooper Jr J. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annual review of biomedical engineering*. 1999;1(1):19-46.

315. Costantino PD, Friedman CD. Soft-tissue augmentation and replacement in the head and neck. General considerations. *Otolaryngologic clinics of North America*. 1994;27(1):1-12.

316. Zins JE, Whitaker LA. Membranous versus endochondral bone: implications for craniofacial reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*. 1983;72(6):778-85.

317. Dzedzic-Goclawska A, Emerich J, Grzesik W, Stachowicz W, Michalik J, Ostrowski K. Differences in the kinetics of the mineralization process in endochondral and intramembranous osteogenesis in human fetal development. *Journal of Bone and Mineral Research*. 1988;3(5):533-9.

318. Fujii T, Ueno T, Kagawa T, Sakata Y, Sugahara T. Comparison of bone formation ingrafted periosteum harvested from tibia and calvaria. *Microscopy research and technique*. 2006;69(7):580-4.

319. Akintoye SO, Lam T, Shi S, Brahim J, Collins MT, Robey PG. Skeletal site-specific characterization of orofacial and iliac crest human bone marrow stromal cells in same individuals. *Bone*. 2006;38(6):758-68.
320. Smith JD, Abramson M. Membranous vs endochondral bone autografts. *Archives of Otolaryngology*. 1974;99(3):203-5.
321. Misch CE, Dietsch F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant dentistry*. 1993;2(3):158-67.
322. Walsh W, Morberg P, Yu Y, Yang JL, Haggard W, Sheath P, et al. Response of a calcium sulfate bone graft substitute in a confined cancellous defect. *Clinical Orthopaedics and Related Research*®. 2003;406(1):228-36.
323. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. Bone substitutes: an update. *Injury*. 2005;36(3):S20-S7.
324. Silva R, Camilli J, Bertran C, Moreira N. The use of hydroxyapatite and autogenous cancellous bone grafts to repair bone defects in rats. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2005;34(2):178-84.
325. Page RC. Periodontal therapy: Prospects for the future. *Journal of periodontology*. 1993;64:744-53.
326. Misch CE. *Contemporary implant dentistry; Soft and hard tissue rehabilitation*, 3rd edition. St. Louis, Mosby; 2008:208-19.
327. Lynch SE, Marx RE, Nevins M, Lynch LAW. *Tissue engineering: Application in oral and maxillofacial surgery and periodontics*. 2nd edition; Quintessence Publishing; 2008:165-66.
328. Figueiredo M, Henriques J, Martins G, Guerra F, Judas F, Figueiredo H. Physicochemical characterization of biomaterials commonly used in dentistry as bone substitutes—comparison with human bone. *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*. 2010;92(2):409-19.
329. Piattelli M, Favero GA, Scarano A, Orsini G, Piattelli A. Bone reactions to anorganic bovine bone (Bio-Oss) used in sinus augmentation procedures: a histologic long-term report of 20 cases in humans. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 1999;14(6):835-40.
330. Simunek A, Kopecka D, Somanathan RV, Pilathadka S, Brazda T. Deproteinized Bovine Bone Versus-Tricalcium Phosphate in Sinus Augmentation Surgery: A Comparative Histologic and Histomorphometric Study. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2008;23(5).
331. Kurkcu M, Benlidayi ME, Cam B, Sertdemir Y. Anorganic bovine-derived hydroxyapatite vs β -tricalcium phosphate in sinus augmentation: a comparative histomorphometric study. *Journal of Oral Implantology*. 2012;38(S1):519-26.

332. Sartori S, Silvestri M, Forni F, Icaro Cornaglia A, Tesei P, Cattaneo V. Ten-year follow-up in a maxillary sinus augmentation using anorganic bovine bone (Bio-Oss). A case report with histomorphometric evaluation. *Clinical oral implants research*. 2003;14(3):369-72.
333. Artzi Z, Weinreb M, Givol N, Rohrer MD, Nemcovsky CE, Prasad HS, et al. Biomaterial Resorption Rate and Healing Site Morphology of Inorganic Bovine Bone and β -Tricalcium Phosphate in the Canine: A 24-month Longitudinal Histologic Study and Morphometric Analysis. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2004;19(3).
334. Schlegel AK, Donath K. BIO-OSS--a resorbable bone substitute? *Journal of long-term effects of medical implants*. 1998;8(3-4):201-9.
335. Rachmiel A, Srouji S, Peled M. Alveolar ridge augmentation by distraction osteogenesis. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2001;30(6):510-7.
336. Kaya B. ÜG. Kistektomi ve apikal rezeksiyon operasyonlarındaki kemik defektlerinde sentetik alloplastlar ile ksenojenik greftlerin uygulanması *Dicle Tıp Dergisi*.1999; 26 (4):103-116.
337. Ohsushi H. Repair of bone defects with marrow and porous ceramic. *Acta Orhtop Scand*. 1989;60:334-9.
338. Ulukaradağ G. Tavşan kalvaryumunda mezenşimal kök hücre transplantasyonu ile yönlendirilmiş kemik ogmentasyonunda elde edilen yeni kemiğin histolojik olarak değerlendirilmesi [Doktora Tezi]: Gülhane Askeri Tıp Akademisi; 2007.
339. Lundgren A, Sennerby L, Lundgren D. An experimental rabbit model for jaw-bone healing. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 1997;26(6):461-4.
340. Felice P, Iezzi G, Lizio G, Piattelli A, Marchetti C. Reconstruction of atrophied posterior mandible with inlay technique and mandibular ramus block graft for implant prosthetic rehabilitation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2009;67(2):372-80.
341. Çakır M. Tavşan kafataslarına uygulanan sentetik kemik greftinin iyileşmesinde kanama durdurucu preparatın (Ankaferd) ve trombositten zengin fibrinin etkilerinin histolojik ve radyolojik olarak incelenmesi [Doktora Tezi]: Selçuk Üniversitesi; 2015.
342. Khosropanah H, Shahidi S, Basri A, Houshyar M. Treatment of intrabony defects by DFDBA alone or in combination with PRP: a split-mouth randomized clinical and three-dimensional radiographic trial. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. 2015;12(10):764.
343. Dragonas P, Schiavo JH, Avila-Ortiz G, Palaiologou A, Katsaros T. Plasma rich in growth factors (PRGF) in intraoral bone grafting procedures: a systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2019.
344. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *Journal of periodontology*. 2000;71(10):1654-61.

345. Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *Journal of oral and maxillofacial surgery*. 2003;61(2):157-63.
346. Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 1998;275(3):H1054-H61.
347. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue engineering: applications in maxillofacial surgery and periodontics*: Quintessence Publishing (IL); 1999.
348. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, et al. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants*. 2003;18(1).
349. Lee C, Nishihara K, Okawachi T, Iwashita Y, Majima HJ, Nakamura N. A quantitative radiological assessment of outcomes of autogenous bone graft combined with platelet-rich plasma in the alveolar cleft. *International journal of oral and maxillofacial surgery*. 2009;38(2):117-25.
350. Gerard D, Carlson ER, Gotcher JE, Jacobs M. Effects of platelet-rich plasma on the healing of autologous bone grafted mandibular defects in dogs. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2006;64(3):443-51.
351. Messoria M, Nagata MJH, Dornelles RCM, Bomfim SRM, Furlaneto F, De Melo L, et al. Bone healing in critical-size defects treated with platelet-rich plasma activated by two different methods. A histologic and histometric study in rat calvaria. *Journal of periodontal research*. 2008;43(6):723-9.
352. Luaces-Rey R, Arenaz-Búa J, López-Cedrún-Cembranos J-L, Herrero-Patiño S, Sironvalle-Soliva S, Iglesias-Candal E, et al. Is PRP useful in alveolar cleft reconstruction? Platelet-rich plasma in secondary alveoloplasty. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(4):e619-23.
353. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: a pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2002;60(10):1176-81.
354. Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RS, Ruben JL, Van Der Wal JE, Vissink A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clinical Oral Implants Research*. 2005;16(3):349-56.
355. Lafzi A, Shirmohammadi A, Faramarzi M, Jabali S, Shayan A. Clinical comparison of autogenous bone graft with and without plasma rich in growth factors in the treatment of grade II furcation involvement of mandibular molars. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*. 2013;7(1):22.
356. Kovács K, Velich N, Huszar T, Szabó G, Semjen G, Reiczigel J, et al. Comparative study of β -tricalcium phosphate mixed with platelet-rich plasma versus β -tricalcium phosphate, a bone substitute material in dentistry. *Acta Veterinaria Hungarica*. 2003;51(4):475-84.
357. Anitua E, Aguirre JJ, Algorta J, Ayerdi E, Cabezas AI, Orive G, et al. Effectiveness of autologous preparation rich in growth factors for the treatment of chronic cutaneous ulcers.

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. 2008;84(2):415-21.

358. Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials*. 2007;28(31):4551-60.
359. Torul D, Bereket MC, Onger ME, Altun G. Comparison of the regenerative effects of platelet-rich fibrin and plasma rich in growth factors on injured peripheral nerve: An experimental study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2018;76(8):1823. e1-. e12.
360. Mozzati M, Gallesio G, di Romana S, Bergamasco L, Pol R. Efficacy of plasma-rich growth factor in the healing of postextraction sockets in patients affected by insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2014;72(3):456-62.
361. Mozzati M, Gallesio G, Gassino G, Palomba A, Bergamasco L. Can plasma rich in growth factors improve healing in patients who underwent radiotherapy for head and neck cancer? A split-mouth study. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2014;25(3):938-43.
362. Al Nashar A, Yakoob H, Eizouki A, Khilily H. Evaluation of the Use of Plasma Rich in Growth Factors with Immediate Implant Placement into Fresh Extraction Sockets: A Controlled Prospective Study. *Dental Med Sci*. 2016;15:55-60.
363. Anitua E, Begoña L, Orive G. Two-stage split-crest technique with ultrasonic bone surgery for controlled ridge expansion: a novel modified technique. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;112(6):708-10.
364. Anitua E, Murias-Freijo A, Alkhraisat MH, Orive G. Clinical, radiographical, and histological outcomes of plasma rich in growth factors in extraction socket: a randomized controlled clinical trial. *Clinical oral investigations*. 2015;19(3):589-600.
365. Anitua E, Prado R, Orive G. Bilateral sinus elevation evaluating plasma rich in growth factors technology: a report of five cases. *Clinical implant dentistry and related research*. 2012;14(1):51-60.
366. López SP, Froum S, Khoully I. Histomorphometric analysis of a biopsy harvested 10 years after maxillary sinus augmentation with anorganic bovine bone matrix and plasma rich in growth factors: a case report. *Implant dentistry*. 2015;24(4):480-6.
367. Boyapati L, Wang H-L. The role of platelet-rich plasma in sinus augmentation: a critical review. *Implant dentistry*. 2006;15(2):160-70.
368. Batas L, Stavropoulos A, Papadimitriou S, Nyengaard JR, Konstantinidis A. Evaluation of autogenous PRGF+ β -TCP with or without a collagen membrane on bone formation and implant osseointegration in large size bone defects. A preclinical in vivo study. *Clinical oral implants research*. 2016;27(8):981-7.
369. Mansouri SS, Ghasemi M, Darmian SS, Pourseyediyan T. Treatment of mandibular molar class II furcation defects in humans with bovine porous bone mineral in combination with plasma rich in growth factors. *Journal of dentistry (Tehran, Iran)*. 2012;9(1):41.

370. Farina R, Bressan E, Taut A, Cucchi A, Trombelli L. Plasma rich in growth factors in human extraction sockets: a radiographic and histomorphometric study on early bone deposition. *Clinical oral implants research*. 2013;24(12):1360-8.
371. Taschieri S, Testori T, Corbella S, Weinstein R, Francetti L, Di Giancamillo A, et al. Platelet-rich plasma and deproteinized bovine bone matrix in maxillary sinus lift surgery: a split-mouth histomorphometric evaluation. *Implant dentistry*. 2015;24(5):592-7.
372. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton MW. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *Journal of craniofacial surgery*. 2005;16(6):981-9.
373. Glowacki J. Angiogenesis in fracture repair. *Clinical Orthopaedics and Related Research*[®]. 1998;355:S82-S9.
374. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug discovery today*. 2003;8(21):980-9.
375. Martínez CE, Smith PC, Palma Alvarado VA. The influence of platelet-derived products on angiogenesis and tissue repair: a concise update. *Frontiers in physiology*. 2015;6:290.
376. van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P. Role of fibrin matrix in angiogenesis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2001;936:426-37.
377. M Dohan Ehrenfest D, Bielecki T, Jimbo R, Barbe G, Del Corso M, Inchingolo F, 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):1145-52.
378. Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, et al. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;101(3):299-303.
379. Einhorn TA. Enhancement of fracture-healing. *JBJS*. 1995;77(6):940-56.
380. Hausman M, Schaffler M, Majeska R. Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis. *Bone*. 2001;29(6):560-4.
381. Zhang Y, Tangl S, Huber CD, Lin Y, Qiu L, Rausch-Fan X. Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on bone regeneration in combination with deproteinized bovine bone mineral in maxillary sinus augmentation: a histological and histomorphometric study. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. 2012;40(4):321-8.
382. Torres-del-Pliego E, Vilaplana L, Güerri-Fernández R, Diez-Pérez A. Measuring bone quality. *Current rheumatology reports*. 2013;15(11):373.
383. Pryor ME, Susin C, Wikesjö UM. Validity of radiographic evaluations of bone formation in a rat calvaria osteotomy defect model. *Journal of clinical periodontology*. 2006;33(6):455-60.

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel Bilgiler

Adı –Soyadı: Metehan KESKİN

Doğum yeri ve tarihi: Ardanuç/ARTVİN, 21.05.1991

Uyruğu: Türkiye Cumhuriyeti

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Askerlik hizmetini yerine getirmiştir.

İletişim adresi ve telefonu: Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı Atakum/

SAMSUN, +90 (0362) 312 19 19

E-posta: dt.metehankeskin@gmail.com

Yabancı dili: İngilizce

II-Eğitimi

Derece	Okul	Yıl
İlköğrenim	Torbalı Birleştirilmiş Sınıflı İlköğretim Okulu Ardanuç/ARTVİN	1997-2002
Ortaöğrenim	Atatürk İlköğretim Okulu Ardanuç/ARTVİN	2002-2005
Lise	Artvin Anadolu Lisesi	2005-2009
Lisans/Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	2009-2014
Uzmanlık	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı	2016-2020

III-Mesleki Deneyimi

Görev Ünvanı	Görev Yeri	Yılı
Diş Hekimi	Artvin Ağız ve Diş Sağlığı Merkezi	2015-2016
Araştırma Görevlisi	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Anabilim Dalı	2016-2020