



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

**TİDEGLUSİB İLE KARIŞTIRILAN KEMİK GREFTİN YENİ
KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN
DEĞERLENDİRİLMESİ**

Berrin İYİLİKÇİ

**NİSAN 2020
DENİZLİ**

T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**TİDEGLUSİB İLE KARIŞTIRILAN KEMİK GREFTİN YENİ KEMİK
OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**AĞIZ, DİŞ VE ÇENE CERRAHİSİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

Berrin İYİLİKCI

Tez Danışmanı: Dr. Öğretim Üyesi Osman Ufuk TAŞDEMİR

Denizli, 2020

PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
UZMANLIK TEZİ ONAY FORMU

Dr. Berrin İYİLİKÇİ tarafından Dr. Öğr. Üyesi Osman Ufuk TAŞDEMİR yönetiminde hazırlanan "Tideglusib ile Karıştırılan Kemik Greftin Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi" başlıklı tez, tarafımızdan okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı : Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Burcu
GÜRSOYTAŞ

Tez Danışmanı : Pamukkale Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Osman Ufuk
TAŞDEMİR

Üye : Aydın Adnan Menderes
Üniversitesi

Dr. Öğr. Üyesi Hasan Onur
SİMŞEK

Pamukkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Yönetim Kurulu'nun 23/06/2020 tarih ve 75/4... sayılı kararıyla onaylanmıştır.


Prof. Dr. Hayati Murat AKGÜL
Dekan

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

Öğrenci Adı Soyadı : Berrin İYİLİKCI

İmza :



ÖZET

TİDEGLUSİB İLE KARIŞTIRILAN KEMİK GREFTİNİN YENİ KEMİK OLUŞUMU ÜZERİNE ETKİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Berrin İYİLİKCI

Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi, Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi AD.
Tez Yöneticisi: Dr.Öğr.Üyesi O.Ufuk TAŞDEMİR

Nisan 2020, 77 Sayfa

Bu çalışmada tideglusib ve kemik greft karışımının kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Tideglusib; Alzheimer gibi çeşitli nörolojik bozuklukların tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Literatürde yapılan bir çalışmada tideglusibin dentin dokusunun rejenerasyonu üzerine olumlu etkisi gösterilmiştir. Çalışmada bu etkinin kemik rejenerasyonunda görev alan yolaklardan bir tanesi olan Wnt yolağı ile gerçekleştiği gösterilmiştir. Dentin ve kemik dokusu yapısal olarak birbirine benzemektedir. Dolayısıyla iyileşme mekanizmaları da benzerlik göstermektedir. İşte bu nedenle tideglusibin benzer etkiyi kemik dokusunda da gösterebileceğini düşünmekteyiz. Kemik greft materyalleri oral ve maksillofasiyal cerrahide, periodontal cerrahide, implant cerrahisinde ve diğer alanlarda sert ve yumuşak doku iyileşmesini hızlandırmak amacıyla kullanılmaktadır. Kemik greft materyalleri kaynaklarına göre dörde ayrılmaktadır. Bunlar; otojen, allojen, ksenojen ve alloplastik greft materyalleridir. Bu greft materyalleri çeşitli avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle araştırmalar alternatif materyal ve uygulamalar üzerinde yoğunlaşarak devam etmektedir. Çalışmamız biri kontrol grubu olmak üzere beş gruptan oluşmaktadır. Çalışmada toplam 40 adet Wistar albino rat kullanılmıştır. Genel anestezi altında ratların mandibulalarında 5 mm çapında defekt oluşturulmuştur. Çalışmada gruplar şu şekildedir; Grup 1: Kontrol (Defekt alanı boş bırakılmıştır) Grup 2: Defekt alanına sadece ksenogreft uygulanmıştır. Grup 3: Defekt alanına ksenogreft ile birlikte tideglusib uygulanmıştır. Grup 4: Defekt alanına sadece otojen greft uygulanmıştır. Grup 5: Defekt alanına otojen greft ile birlikte tideglusib uygulanmıştır. Ratlar işlem sonrası 28. günde sakrifiye edilmiştir. Elde edilen örneklerde yeni kemik oluşumu histomorfometrik ve immunohistokimyasal analiz ile değerlendirilmiştir. Çalışmamızın sonuçları tideglusibin ve karıştırıldığı kemik greftlerin, kemik rejenerasyonunu ve yeni kemik formasyonunu artırdığını göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kemik İyileşmesi, Tideglusib, Ksenogreft, Otojen Kemik Grefti

Bu çalışma, PAÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir (Proje No: 2018DİŞF011)

ABSTRACT

THE EFFECT OF TIDEGLUSIB AND BONE GRAFT COMBINATION ON NEW BONE FORMATION

İYİLİKÇİ Berrin

Speciality Thesis in Oral and Maxillofacial Surgery
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Osman Ufuk TAŞDEMİR

April 2020, 77 Pages

The aim of this study is that to be evaluated the effect of tideglusib and bone graft mixture on the bone healing. Tideglusib is a drug which is used for some neurological diseases such as alzheimer. According to the conducted literature review tideglusib's positive impact on dentin tissue has been found. At this study it's been indicated that tideglusib fulfills this effect via various mechanisms and Wnt- β catenin pathway is one of them these mechanisms. Dentin and bone tissue have similar structure and healing mechanism. For this reason, we think that tideglusib may effect bone metabolism like this. In the dentistry, bone graft materials are used for accelerate the soft and hard tissue healing in oral and maxillofacial surgery, implant surgery, periodontal surgery and other areas. Graft materials are divided into four categories according to sources; autologous, allogenic, xenogenic, alloplastic. There are several advantages and disadvantages of these materials For this reason, researchers are focused the alternative biomaterials and applications. Our study consist of five groups; one of control and four of test. 40 Wistar albino rats used in this study. Under the general anesthesia, bone defects which were 5 mm in diameter applied the mandibula of each rats. In this study, groups were created as follows; Group 1: Control (Defects were empty), group 2: Xenograft was applied the defect area, group 3: Xenograft and tideglusib were applied defect area, group 4: Autogenous graft were applied defect area, group 5: Autogenous graft and tideglusib were applied defect area. Rats were sacrificed in 28 day after operation. New bone formed of the samples were analyzed by histomorphometrically and immunohistochemically. According to the our study's results, tideglusib and greft mixture enhanced new bone formation and bone regeneration.

Keywords: Bone healing, Tideglusib, Xenograft, Autogenous Bone Graft

This study was supported by the PAU Scientific Research Projects Coordination Unit (Project number: 2018DISF011).

TEŞEKKÜR

Uzmanlık tez çalışmamın her aşamasında ilgi ve desteğini benden esirgemeyen eğitim hayatım boyunca beni destekleyen ve her konuda yardımcı olan, çalışkanlığını, tevazusunu, özverisini örnek aldığım sevgili tez danışman hocam **Dr. Öğr.Üyesi Osman Ufuk TAŞDEMİR' e**,

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Sayın Dr. Öğr. Üyesi Alper KIZILDAĞ' a,

İstatistiksel analizlerin gerçekleştirilmesinde yardımcı olan Sayın Öğr. Gör. Hande ŞENOL' a,

Uzmanlık eğitimim boyunca yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli asistan arkadaşlarıma ve anabilim dalımızın diğer çalışanlarına,

Her zaman olduğu gibi uzmanlık hayatımda da beni her konuda karşılıksız destekleyip, yanımda bulunan canım aileme ve kardeşim Mehmet GÜRDAL' a,

Tanıştığım ilk günden beri her konuda yanımda olan sabrını ve sevgisini benden esirgemeyen, sevgili eşim Emin İYİLİKCİ' ye ve canım oğlum **Kıvanç İYİLİKCİ' ye** teşekkürlerimi borç bilirim.

TABLolar DİZİNİ

Tablo 3.1 Kontrol ve deney gruplarındaki hayvan sayıları	20
Tablo 4.2 İmmunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları analiz sonuçları ..	36



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Alınan Kemik Greft Bölgesinin Şematize Görüntüsü	21
Şekil 3.2 Rat mandibulasında 5 mm çapında defekt oluşturulması	22
Şekil 3.3 Rat mandibulasında 5 mm çapındaki defektin görüntüsü	22
Şekil 3.4 Rat mandibulasından elde edilmiş olan otojen kemik grefti	23
Şekil 3.5 Otojen kemik greftin partikül haline getirilmesi	23
Şekil 3.6 Otojen greftin defekt bölgesine uygulanması	24
Şekil 3.7 Mandibulada oluşturulan defekte tideglusibin uygulanması.....	24
Şekil 4.2 Kontrol grubundaki bir başka ratın defekt bölgesinin değişik büyütmelerdeki görünümü	29
Şekil 4.3 Ksenogreft Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinin Görünümü	30
Şekil 4.4 Ksenogreft grubundaki başka bir ratın defekt bölgesinin değişik büyütmelerdeki görünümü	30
Şekil 4.5 Ksenogreft-Tideglusib Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinin Görünümü..	31
Şekil 4.6 Ksenogreft- Tideglusib Grubundaki Bir Başka Ratın Defekt Bölgesinin Değişik Büyütmelerdeki Görünümü	31
Şekil 4.7 Otojen Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinin Görünümü.....	32
Şekil 4.8 Otojen Grubundaki Bir Başka Ratın Defekt Bölgesinin Değişik Büyütmelerdeki Görünümü	32
Şekil 4.9 Otojen Tideglusib Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinin Görünümü.....	33
Şekil 4.10 Otojen-Tideglusib Grubundaki Bir Başka Ratın Defekt Bölgesinin Değişik Büyütmelerdeki Görünümü	33
Şekil 4.11 Kontrol Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Hafif Şiddette Pozitif İmmunreaksiyonu	37
Şekil 4.12 Ksenogreft Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Orta Şiddette Pozitif VEGF İmmunreaksiyonu.....	37
Şekil 4.13 Ksenogreft-Tideglusib Grubunda Bir Ratın Defekt Bölgesinde Orta Şiddette Pozitif VEGF İmmunreaksiyonu	38
Şekil 4.14 Otojen Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Orta Şiddette Pozitif VEGF İmmunreaksiyonu	38
Şekil 4.15 Otojen-Tideglusib Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Orta Şiddette Pozitif VEGF İmmunreaksiyonu	39
Şekil 4.16 Kontrol Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Hafif Şiddette Pozitif BMP-2 İmmunreaksiyonu	39

Şekil 4.17 Ksenogreft Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Hafif BMP-2 Pozitif İmmunreaksiyonu	40
Şekil 4.18 Ksenogreft-Tideglusib Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Orta Şiddette BMP-2 Pozitif İmmunreaksiyonu	40
Şekil 4.19 Otojen Grubundaki Bir Ratın Defekt Bölgesinde Orta Şiddette BMP-2 Pozitif İmmunreaksiyon	41
Şekil 4.20 Otojen-tideglusib Grubunda Bir Ratın Defekt Bölgesinde Şiddetli BMP-2 Pozitif İmmunreaksiyon.....	41



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CK1	: Casein Kinase 1
DDM	: Demineralize Dentin Matriksi
DKM	: Demineralize Kemik Matriksi
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FGF	: Fibroblast Growth Factor
GSK-3 β	: Glikojen Sentaz Kinaz -3 Beta
HA	: Hidroksiapatit
BMP	: Bone Morphogenetic Protein
OPG	: Osteoprotegerin
RANKL	: Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand
rhBMP-2	: Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2
RunX2	: Run Domain Factor 2
SS	: Standart Sapma
TCP	: Tricalciumphosphate
TGF- β	: Trombosit Growth Factor-Beta
VEGF	: Vascular Endotelial Growth Factor
VEGFR	: Vascular Endotelial Growth Factor Receptor
Wnt/ β	: Wingless Int-1 geni β

İÇİNDEKİLER

ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
İÇİNDEKİLER	xii
1. GİRİŞ	1
1.1 Amaç	3
2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI	5
2.1. Kritik Boyutlu Kemik Defekti	5
2.2. Bone Morphogenetic Protein (BMP)	5
2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	8
2.4 Otojen Kemik Greftler	10
2.4.1 Otojen Kemik Greftlerin Avantaj ve Dezavantajları.....	11
2.4.2 Otojen Kemik Greft Komplikasyonları	11
2.4.3 Otojen Kemik Greft Donör Bölgeleri.....	11
2.5 Otojen Kemik Greftte Yeni Kemik Oluşum Mekanizmaları	11
2.5.1 Direkt Osteogenez	12
2.5.2 Osteokondüksiyon	12
2.5.3 Osteoindüksiyon	12
2.5.4 Otojen Kemik Greft Uygulamalarında Yeni Kemik Oluşumu.....	12
2.6 Ksenogreftler	14
2.6.1 Mercan Kaynaklı Kalsiyum Karbonatlar	15
2.6.2 Sığır/At Kaynaklı Hidroksiapatitler.....	16
2.7 WNT/ β Catenin Yolağının Kemik Oluşumu Üzerine Etkileri	16
2.8 Tideglusib	17
2.9 Hipotez.....	18
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	19
3.1. Etik Kurul Onayı.....	19
3.2 Deney Hayvanı Sayısı ve Deney Grupları.....	20
3.2 Cerrahi Prosedür	20

3.3 Ratların Bakımı ve Deneyin Sonlandırılması.....	25
3.4 Histopatolojik Değerlendirme	26
3.5 İmmünohistokimyasal Değerlendirme	27
3.6 İstatistiksel Analiz	27
4. BULGULAR	28
4.1 Klinik Bulgular.....	28
4.2 Histomorfometrik Bulgular.....	28
4.2.1 Osteoblastların Değerlendirilmesi	35
4.2.2 Osteoklastların Değerlendirilmesi	35
4.2.3 Yeni Kemik Alanının Değerlendirilmesi	36
4.3 İmmünohistokimyasal Bulgular	36
4.3.1 AntiVEGF ile Boyanan Hücre Sayısı	36
4.3.2 AntiBMP-2 ile Boyanan Hücre Sayısı.....	39
5. TARTIŞMA.....	42
6. SONUÇLAR	51
7. KAYNAKLAR.....	52
8.EKLER	63
9.ÖZGEÇMİŞ	64

1. GİRİŞ

Kritik boyutlu defekt, bir hayvanda herhangi bir kemik oluşumunu destekleyici bir materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlanmaktadır (Şimşek 2004). Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibroz bağ dokusu dolumu ile iyileşme eğilimi göstermektedirler. Ağız ve çene bölgesinde; konjenital olarak veya hastalık nedeniyle ya da bu hastalıkların tedavisine yönelik cerrahi girişimler sonucu estetik, fonksiyon ve fonasyonu etkileyen çeşitli defektler oluşabilmektedir. Bir kemik defektinde gerçekleşecek iyileşme miktarı, çoğunlukla defektin büyüklüğü ile doğru orantılıdır. Bu nedenle iyileşmenin değerlendirilmesi için kullanılan deneysel kemik yarası, spontan iyileşme gerçekleşemeyecek kadar büyük olmalıdır. Kemik greft materyallerinin iyileşmesinde osteogenezis, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon gibi mekanizmalar rol oynamaktadır. *Osteogenezis*: Greft materyali içindeki hücresel yapıların, alıcı alana nakli sonrası canlı kalarak, bölgede yeni kemik oluşturabilmesidir. *Osteokondüktif etki*; greft materyalinin osteogenezise rehberlik ettiği, iskeletsel bir çatı oluşturduğu etki tipidir. Konak dokusu damarsal ve hücresel olarak greft materyaline invazyon gösterir. Invazyon greftteki kanalların sayısı ve büyüklüğüne göre değişkenlik gösterir. *Osteoindüktif etki* ise; greftin içerdiği matriks proteinleri aracılığıyla, yerleştirildiği kemik dokuda veya kemik olmayan alanda osteogenezisi stimüle etmesidir.

Canlı organizmada travma, enfeksiyon gibi herhangi bir etken sonucu meydana gelen eksikliğin giderilmesine ve organın fonksiyona dönebilmesine veya bu eksikliğin organizma tarafından düzenli ve hızlı bir şekilde tamamlanmasına yardımcı olan tüm maddelere biyomateryaller denir. Biyomateryallerin dış hekimliğinde kullanım amaçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

- a. Kist, benign veya malign defekt operasyonları sonrası oluşan geniş kemik defektlerini düzeltmek amacıyla,
- b. Kemik oluşumu için yapı iskelesi oluşturmak için,
- c. Travma, dental hastalık veya cerrahi sonrası oluşan kemik defektlerini düzeltmek için,

- d. Çekim boşluğunu doldurup alveol kemik yükseklik ve genişliğini artırma amaçlı,
- e. Alveol kreti düzeltip yeniden şekillendirmek için,
- f. Yarık damak operasyonlarında, fasiyal deformitelerin giderilmesi için kullanılır.

Bu tip rekonstrüksiyonlarda otojen kemik greftlerin kullanımı en sık tercih edilen yöntemdir. Otojen kemik greftleri aynı canlıdan alınan dokulardır. Hem osteojenik, hem hümorale faktörlere, hem de canlı hücrelere sahiptir. Bu sebeple osteojenik olarak kabul edilirler (Türker M 1997). Otojen kemik greftleri erken revaskülarizasyon, osteoindüktif özellik, hızlı osteojenik potansiyel, düşük maliyet, antijenik etkilerinin olmaması gibi avantajlara sahiptir. Bununla beraber, otojen kemik greftlerinin istenilen miktarlarda elde edilememesi, şekil verme zorunluluğunun olması, donör saha morbiditesi ve ikinci bir cerrahi işleme ihtiyaç göstermesi gibi dezavantajları vardır. Ayrıca ikinci bir cerrahi işlem, kanama, enfeksiyon, hematoma, ağrı, his kaybı ve yara iyileşme problemleri gibi riskleri de beraberinde getirmektedir. Otojen kemik greftlerinin bu olumsuz yanları araştırmacıları başka materyaller bulmaya yöneltmiştir (Gazdag ve Lane 1995). Bu sebeplerden dolayı, allojenik, ksenojenik ve alloplastik kemik greftleri tedavide kullanılmaktadır (Akal 1995).

Ksenogreft, farklı tür vericiden alınan grefte denir (Feighan vd. 1995). Günümüzde sıklıkla doğal mercan ve sığır kemiğinden elde edilen greftler kullanılmaktadır. Ksenojenik kemik greftleri çenelerdeki küçük defektleri doldurmak için önerilmiş ve birçok araştırmacı bu materyallerin herhangi bir osteojenik potansiyel sağlamadıklarını, bunun yerine yeni kemik oluşumu için iskeletsel bir çatı oluşturduklarını belirtmişlerdir (Feighan vd. 1995). Ayrıca ksenogreftler kuvvetli bir immün cevaba sebep olabilmektedir (Golberg 1993). Dondurup kurutma işlemi, kemik greftine karşı oluşan immün yanıtı önemli oranda azaltmasına rağmen, greftin mekanik özelliklerini azaltabilmektedir. Bu sebeptir ki ksenogreftlerin iyileşmesinde osteokondüksiyon gözlenirken osteoindüksiyon görülmemektedir. Allogreftler; genetik olarak farklı, aynı canlı türünden elde edilen greft tipidir. Antijenik özelliklerinin fazla olması en büyük dezavantajlarıdır. Bu nedenle liyofilizasyon (dondurup-kurutma), radyasyon uygulanması, demineralizasyon, deproteinizasyon gibi işlemler uygulanarak antijenik özellikleri azaltılmaya çalışılmıştır. Bu çalışmalar bir miktar başarılı olmuş ancak yine de greftlerin konak tarafından reddini ve hastalık taşıma risklerini tamamen ortadan kaldırmamıştır.

Alloplastik greftler canlı doku içerisine yerleştirilen sentetik inert yapıda materyallerdir. Alloplastların avantajları; kullanıma hazır olmaları, alıcı alan

gerektirmemesi, istenilen boyutlarda elde edilebilme imkanı ve operasyon zamanının kısalığıdır. Yabancı maddeye karşı gelişen inflamatuvar reaksiyonlar, enkapsülasyon, otojen materyallere göre yüksek enfeksiyon sıklığı, uygulama bölgesinde kemik rezorpsiyonu olasılığı alloplastların dezavantajlarıdır. Alloplastik materyallerin de osteoindüktif özelliği bulunmamaktadır (Ekelund 1996).

Büyüme faktörleri yara iyileşmesinde rol oynayan, yara bölgesindeki hücrel ve kimyasal olaylardan sorumlu protein yapıdaki moleküllerdir. TGF (Transforming Growth Factor) (Hemmerich vd. 2006) , FGF (Fibroblast Growth Factor) (Ornitz ve Marie 2002), BMP (Bone Morphogenetic Protein) gibi büyüme faktörleri kemik iyileşmesinde rol almaktadır. Büyüme faktörleri etkilerini spesifik reseptörlere bağlanarak ve hücre içi bazı özel biyokimyasal yolları aktive ederek gerçekleştirmektedir. Bu mekanizmalar hedgehog proteinleri (Hooper ve Scott 2005), Wnt (Bergwitz et al. 2001; Fischer et al. 2002), Notch sinyal yollarını (Schnabel vd. 2002) içermektedir. Bu yollardan biri olan Wnt sinyal mekanizması, pro-osteojenik cevapta anahtar role sahip olduğu için kemik iliği kavitesinde kemik oluşumu için gereklidir.

Yapılan literatür taramasına göre tideglusibin dentin dokusu üzerine pozitif etkisini gösteren bir çalışmaya rastlanılmıştır (Duan ve Bonewald 2016). Yapılan çalışmada tideglusibin bu etkisini çeşitli mekanizmalarla gerçekleştirdiği gösterilmekte ve Wnt/ β katenin yolağının bu mekanizmalardan bir tanesi olduğu rapor edilmektedir (Duan and Bonewald 2016). Wnt/ β katenin yolağı iskelet formasyonu ve gelişimi için gereklidir.

Dentin ve kemik dokusu benzer kimyasal içeriğe sahip mineralize dokulardır. Demineralize dentin matriksi (DDM) fibröz bağlantılar açısından baskın olarak tip 1 kolajen (%90), geri kalanını da non kollajenöz protein kalıntıları(%10) (osteokalsin, osteonektin, sialoprotein ve fosfoprotein) ile az miktarda büyüme faktörleri içerir (Jin vd. 2017). Benzer şekilde ve demineralize kemik matriksi (DKM) de %90-95 oranında tip I kolajen içerir. Non-kollajenöz kısmını da kondroitin sülfat, keratan sülfat, hiyaluronik asit gibi glikozaminoglikanlar; osteonektin, osteokalsin, osteopontin, kemik sialoproteini gibi glikoproteinler; interlökin 1 ve 6 gibi sitokinler ile büyüme faktörleri oluşturur (İnsal ve Pişkin 2017).

1.1 Amaç

Dentin ve kemik dokusunun yapısal olarak benzerliği sebebiyle tideglusibin kemik doku üzerinde de benzer etki yaratabileceğini düşünmekteyiz. Dolayısıyla bu

Çalışmanın amacı tideglusib ile karıştılan kemik greftlerin yeni kemik formasyonuna olan etkisini incelemektir.



2.KURAMSAL BİLGİLER VE LİTERATÜR TARAMASI

2.1. Kritik Boyutlu Kemik Defekti

Günümüzde kraniyofasiyal alanda çeşitli kemik greftleri ve implant tipleri kullanılmaktadır. Rekonstrüktif cerrahide greft ve implantlar gibi değişik osteokondüktif ajanlar kullanılarak kemik yapımı veya defektin doldurulması gereksinimi duyulmaktadır. Her ne kadar farklı tip ve çalışma şekilleriyle bu implant ve greftler deney hayvanlarında denenmiş olsa da uygun bir hayvan modeli tanımlamada farklı görüşler mevcuttur (Schmitz vd. 1990)(Cutting ve McCarthy 1984). Çalışmalarda kontrol amacıyla seçilen defektler genellikle spontan olarak iyileşebilmektedir. Genç hayvanlarda bu iyileşme yaşlılara oranla daha iyi olduğu için genellikle genç hayvanlar tercih edilmektedir (Prolo vd. 1982). Bir kemik defektindeki iyileşmenin miktarı genellikle defektin büyüklüğüne bağlıdır. O nedenle iyileşmeyi gözlemlemek için defekt büyüklüğü spontan olarak iyileşen defekt boyutundan büyük olmalıdır. Kritik boyutlu defekt, bir hayvanda herhangi bir osteopromotif bir materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik yapımı ile iyileşme gösteremeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlanmaktadır. Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibroz bağ dokusuyla dolun ve iyileşme eğilimi göstermektedirler (Rowe 1969)(Frame 1980).

2.2. Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Bone Morphogenetic Protein (BMP) veya "Osteojenik Proteinler" Marshall Urist tarafından ilk kez 1965 yılında tanımlanmış, 1979 yılında izole edilmiştir (Granjeiro vd. 2005). 1988 yılından beri Wozney'in, DNA (Deoksiribonükleik asit) zincirlerini kopyalaması ile rekombinant olarak istenilen miktarlarda üretilmektedirler (Wozney vd. 1988). Otokrin veya parakrin mekanizmalarla hücre yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve spesifik fenotip salınımı üzerinde etkili olacak kompleks kaskatı başlatırlar (Hallman

2008). BMP, hem embriyolojik hem de kırık tamiri aşamasında osteogenesizin potansiyel indükleyicisidir (Rauch vd. 2000). BMP'ler 7 adet disülfid bağ ile bağlanmış dimerler içerirler. BMP'ler iki benzer zincir içeren homodimer olarak veya farklı zincirler içeren heterodimer olarak iki şekilde de aktiftir. Bu güne kadar 30 tip BMP tanımlanmıştır. BMP-1 dışındaki tüm BMP'ler, TGF- β ailesinin bir üyesi olup; kemik yapımı, onarımı ve devamlılığının düzenlenmesinde önemli role sahiptirler. BMP ailesi içerisinde özellikle BMP-2, BMP-4 ve BMP-7' nin iyileşmenin erken safhalarında, kırık kallusunun içinde osteoblastlar, osteoklastlar ve primitif mezenkimal hücrelerden salındıkları gösterilmiştir (Rauch 2000; Özeç ve Yeler 2003). Bu proteinler arasında BMP-2' nin osteoindüktif özelliği en fazla olan protein olduğu görülmüştür. (Boyne vd. 1997; Kusumoto vd 1997; Kubler vd. 1998; Groeneveld ve Burger 2000)

Araştırmalar, erken morfogenezis sırasında, BMP' lerin birçok doku ve organın oluşumunda, epitelyal mezenşimal etkileşimlerde morfogenler olarak rol oynadıklarını göstermiştir. BMP-2' nin gelişmekte olan diş germelerinde, çene kemiğinde, çizgili ve düz kaslarda, spinal kord, nazal epitel, trakeal epitel ve özefagal epitelde lokalize olduğu görülmüştür. Embriyojenik hücrelerin BMP' lere cevap vererek kartilaj ve kemik hücrelerine farklılaşmış olmaları da, BMP' lerin embriyojenik iskelet sisteminin oluşmasında rol aldıklarını göstermektedir. BMP' nin osteojenik etkisi direkt olarak olgun olmayan, primitif hücreler üzerinedir. Olgun osteoblastların BMP' ye cevap verme yeteneğini kayb ettikleri tespit edilmiştir (Groeneveld ve Burger 2000).

BMP-2' nin mandibular kapalı kırıklarda iyileşme üzerinde düzenleyici etkileri olduğu gösterilmiştir (Rasubala vd. 2003). BMP-2 ve 7'nin kritik çaplı kemik defektlerinin iyileşmesinde, osteogenezi artırdığı bildirilmiştir (Wikesjö vd. 2009). Campisi ve ark. (Campisi vd. 2003), BMP-2, 4 ve 7' nin mandibular distraksiyon süresince mekanik uyarılara karşı biyolojik yanıtlarla olaya katıldıklarını göstermişler; distraksiyon sürecini hızlandırmak için dışarıdan BMP verilmesi konusunda çalışmalar yapılması gerektiğini vurgulamışlardır. Yapılan çalışmalarla, rhBMP-2 ve 7'nin, kemik defektlerinde kemik rejenerasyonunu ve restorasyonunu gerçekleştirdikleri ve kemik kırık risklerini azalttıkları ortaya konulmuştur (Carstens vd. 2005). Kritik boyutlarda mandibular defektlerde adenoviral taşıyıcılarla BMP-2 ve 9 kullanılarak yapılan tedavi ile normal yapıda kemik oluşumu ve iyileşme sağlanmış (Alden vd. 2000), konjenital olarak eksik kemiklerin yeniden yapılanmasının da mümkün olduğu bildirilmiştir (Carstens vd. 2005).

Demineralize kemiğin osteogenetik potansiyelinin temelinde de BMP yer almaktadır. Demineralize kemik bütün BMP türlerini çeşitli oranda içerisinde bulundurmaktadır. Bu kemiğin indüksiyon aşaması üzerinde çok sayıda çalışma yapılmıştır. Histolojik ve biyokimyasal analizler ile demineralize kemik matriksin

implantasyonundan 5-10 gün sonra kartilaj dokunun oluşmaya başladığı ve 7-14 günlük sürede bu kartilajın mineralize olmasını takiben yerini kemiğin aldığı belirlenmiştir (Omura vd. 1998; Groeneveld ve Burger 2000).

Son zamanlarda kemik yapıcı kök hücrelerinin, yeni osteoindüktif biyomateryallerin ve bazı büyüme faktörlerinin etkinliğini değerlendirmek için ektopik kemik modellerin hayvan çalışmalarında kullanımı artmıştır. Çeşitli ektopik uygulama yöntemleri mevcut olup bunlar; subkutan, intramuskuler ve karaciğer kapsül transplantasyonudur. Subkutanöz uygulama en basit olan yöntemdir. Ama bu yöntemle diğer yöntemlere nazaran daha az kemik oluşumu gözlenmektedir. İntramuskuler implantasyon tekniği daha çok kullanılmakta ve yine basit bir uygulama olup bununla birlikte iskelet kaslarının progenitör uydu hücrelerini açığa çıkarır. Bu yüzden osteogenezisin konak kaynaklı mı yoksa uygulanan materyal kaynaklı mı olduğunun anlaşılmasında zorluk yaratır. Karaciğer kapsül tekniği ise teknik gerektiren bir uygulama olması sebebiyle kullanımı kısıtlıdır (Scott vd. 2012).

BMP-2 ve diğer BMP'lerin ektopik uygulamaları son zamanlarda yaygınlaşmıştır. BMP' nin intramuskuler olarak uygulanması osteojenik farklılaşmayı artırır ve doğal iskeletsel kasların uydu hücrelerini aktive eder. Lee ve ark. (Lee vd. 2015) yaptıkları bir çalışmada farelerin sırtına subkutan olarak rekombinant BMP-2 (rhBMP-2) yerleştirmişler ve ektopik kemik oluşumunu incelemişlerdir. Çalışmalarının sonucuna göre BMP-2' nin ektopik kemik oluşumunda önemli derecede rolü olduğunu rapor etmişlerdir.

Warnke ve ark.(Warnke vd. 2004) insanda intramusküler olarak BMP-7 ve otojen kemik iliği ile mandibulanın onarımını sağlamışlardır. Heliotis ve ark. (Heliotis vd. 2006) kemik iliğine gerek duyulmaksızın BMP-7 ve hidroksiapatitin insan mandibulası oluşturmada etkin olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan başka bir çalışmada 0,5-115 µg rhBMP-2 ektopik implantasyonunun 7 günde kartilaj formasyonu ve 14 günde kemik formasyonu oluşturduğu görülmüştür. rhBMP-2 dozuna bağımlı olarak kemik indüksiyonunda artış olduğu tespit edilmiştir (Kusumoto vd 1997; Zellin ve Linde 1999). rhBMP-2' nin optimal konsantrasyonu uygulanacak olan bölgeye ve deneğin cinsine göre farklılık göstermektedir (Marukawa vd. 2001).

2.3 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Anjiyogenez, kemik iyileşmesi ve yeni kemik oluşumunda en önemli unsurlardan bir tanesidir. Çünkü ilgili dokunun yaşamını sürdürebilmesi için damarlanmaya ihtiyacı vardır. Anjiyogenez iyileşen ya da oluşan yeni dokuya beslenmesini sağlayacak yeni damarların oluşturulmasıdır. Bu prosedür VEGF ve anjiyopoetin olarak adlandırılan iki ana hormonal yol ile kontrol edilmektedir. VEGF damar endotel hücrelerine özgü homodimerik glikoprotein yapısında heparin bağlayan büyüme faktörüdür. VEGF geni kromozom 6p21.3 üzerinde yer alır. (Vincenti vd. 1996) 45 KD büyüklüğündedir. VEGF ilk kez Senger ve ark. (Senger vd. 1983) tarafından 1983 yılında deride damar geçirgenliğini arttıran tümör vasküler permeabilite faktörü olarak tanımlanmıştır. Ferrara ve ark. (Ferrara ve Henzel 1989), 1989'da endotel hücre mitojeni olarak tanımladıkları bu faktörü VEGF olarak isimlendirmişlerdir. VEGF vasküler endotel hücreler için spesifik, mitojenik bir faktördür (Şencan vd. 2007). Anjiyogenezin ve vaskülogenezin doku gelişimi ve organ tamir işlemlerinde yer alır (Ferrara vd. 2003). Başka bir deyişle VEGF, endotel hücrelerinin hayatta kalması için önemli bir faktördür. Damarsal geçirgenliği artırır, güçlü bir vazodilatördür (Hedgepeth vd. 1997; Wirostko vd. 2008).

VEGF gen ailesi içinde 7 VEGF üyesi tanımlanmıştır. Bunlar; VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, Plasental büyüme faktörü, VEGF-E ve VEGF-F (Marie vd. 2007). Temel olarak anjiogenez, lenfanjiogenez ve damar geçirgenliğini düzenleyen bu faktörlerin tanımlanan VEGF reseptörlerine bağlanma özellikleri farklıdır. VEGF-A anjiogenezle en güçlü ilişkisi olan ve üzerinde en çok çalışma yapılan faktördür, anti-VEGF tedavilerin çoğu bu faktör üzerinde yoğunlaşmaktadır (Bhisitkul 2006). Genellikle VEGF diye kısaca ifade edilen faktör aslında VEGF-A'dır. VEGF-A; VEGFR1 ve VEGFR2 yoluyla etki eder ve hipoksi ile aktive olduğu gösterilen tek VEGF üyesidir (Neufeld vd. 1999; Wirostko vd. 2008) (Wirostko vd. 2008). Aminoasit sayılarına göre VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 ve VEGF206 gibi izoformları bulunur (Turgut 2007; Mohammad vd. 2008). VEGF reseptörlerinin aktivasyonu bir dizi hücre içi sinyal iletim proteinlerini fosforile ederek endotel hücrelerinin proliferasyon, migrasyon ve diferansiyasyonunu sağlar (Turgut 2007).

VEGF; endotel hücreler, kondrositler (Gerber vd. 1999), trombositler, megakaryositler, lenfositler ve plazma hücrelerinden salınır. Hedef hücreleri osteoblastlar ve endotel hücrelerdir. Biyolojik fonksiyonları ise anjiyogenez (Maloney

vd. 1998; Street vd. 2002), neovaskülarizasyon, kartilaj ve kemik büyümesi ve tamiridir (Banks et al. 1998). Endotelial hücrelerin mitojenik aktivitesi ile vasküler geçirgenlik ve doku oksijenasyonu artırılmaktadır (Theiss vd. 2000). VEGF' nin kritik kemik defektlerinin tedavisinde önemli olabileceği ve osteoprogenitör hücrelere direkt etkisi olabileceği, osteoblast farklılaşmasını destekleyebileceği ve rejenere olmuş kemiğin mineralizasyonunu artırabileceği belirtilmektedir. (Keramaris vd. 2008). VEGF vasküler endotelial hücrelerin gelişmesine öncülük etmekte ve bu hücrelerin arter, ven ve lenfatik damarlara dönüşmesini sağlamaktadır (Giannoudis vd. 2006).

Endokondral kemikleşmede, avasküler kartilaj doku vaskularize osseöz dokuya dönüşmekte olduğu için anjiyogenez kemik oluşumu ve tamirinde meydana gelen en önemli basamaklardan biridir. Sonrasında epifizyel büyüme plaklarının içindeki hipertrofik kondrositler VEGF salınımını sağlamakta, metafizyel damarların kartilaja invazyonuna öncülük etmekte ve bu süreç yeni kemik formasyonu ile sonuçlanmaktadır (Gerber vd. 1999).

Yapılan başka çalışmalarda ise VEGF'nin sadece endokondral kemikleşmede değil, aynı zamanda intramembranöz kemikleşmede de önemli olduğu (Dimitriou vd. 2006) ve hipertrofik kartilaj henüz görülmezken bile VEGF'nin salgılandığı rapor edilmektedir. Buna dayanarak VEGF' nin kırık bölgesindeki hematoma alanında var olabileceği belirtilmektedir. (Peng vd. 2005) Aynı şekilde bir başka çalışmada VEGF' nin, olgunlaşmamış kemikte osteoblastların yanında görüldüğü ve anjiyogenezin osteogenezden önce indüklendiği gözlemlenmiştir. (Sojo vd. 2005)

VEGF' nin kemik oluşumu ve tamiri üzerine etkileri günümüzde ilgi odağı haline gelmiştir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar VEGF' nin kemik hücreleri üzerine etkisi üzerinedir. Bu çalışmalarda VEGF' nin osteoblast farklılaşması üzerinde direkt otokrin etkisi olduğu ve VEGF inhibisyonu ile kortikal kemik defektlerinde iyileşmenin olumsuz etkilendiği (Street vd. 2002), VEGF' nin kemik mineralizasyondaki ve kemik yoğunluğundaki artışa öncülük ettiği bildirilmiştir (Murphy vd. 2004; Geiger vd. 2005; Kleinheinz vd. 2005; Leach vd. 2006). Ayrıca VEGF' nin azalmasıyla kemik mineral içeriği ve yoğunluğunda azalma olabileceği, VEGF' nin endotelial hücrelerin osteojenik faktörleri sentezlemesini stimüle ederek indirekt olarak kemik formasyonuna katkıda bulunabileceği rapor edilmektedir (Wang vd. 1997).

Yapılan bir başka çalışmada ise VEGF' nin endokondral kemik formasyonunun erken döneminde kemik oluşumu ve tamirinde, mezenşimal kök hücreleri üzerinde BMP-2 ve BMP-4 gibi diğer büyüme ve diferansiyasyon faktörleri ile sinerjistik etki gösterdiği rapor edilmektedir (Vaibhav vd. 2007).

Ayrıca bir başka çalışmada BMP ve VEGF arasında kırık iyileşme mekanizmalarında bir denge olduğu ve bu mekanizmalarda değişik faktörlerin

etkileşimi olduğu vurgulanmaktadır (Carson ve Bostrom 2007). BMP-2 osteoblast apoptozisini stimule ederken (Levin 2007), VEGF inhibe etmekte (Clarke vd. 2007) ancak her iki faktör osteoblast farklılaşmasını stimule etmektedir. Her iki faktörün eksojen olarak kullanıldığı çalışmada kemik oluşumunu ve indüksiyonunu yalnız kullanımlarına göre daha fazla artırdıkları gözlemlenmektedir (Patel vd. 2008).

2.4 Otojen Kemik Greftler

Otojen kemik grefti, aynı kişide bir bölgeden alınarak başka bir bölgeye transfer edilen kemik dokusuna denir. Çene ve yüz cerrahisindeki kist ve tümör ameliyatlarında, konjenital alveol defektlerinde, implant uygulamalarında, alveoler yetersizlik durumlarında ve kanser cerrahisi sonrası oluşan kemik defektlerinin onarımında en sık otojen kemik greftleri kullanılmaktadır ve 'altın standart' teknik olarak tanımlanmaktadır (Misch 2008). Çünkü otojen kemik greftlerdeki kemik oluşum hızı, kemik kalitesi ve iyileşme kullanılan diğer rekonstrüksiyon materyallerine göre daha iyidir. İçerdiği kemik tipine göre otojen kemik greftleri kortikal, kansellöz ve kortiko-kansellöz olmak üzere üç tiptir. Otojen kemik materyalinin en etkili formu kemik hücrelerini içinde çok yoğun olarak bulunduran kansellöz kemiktir. Yeni kemik, greftle birlikte transfer edilen endosteal osteoblastlar ve kemik iliği kök hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. Otojen kemiğin hücre canlılığını kaybetmemesi için ya alındığı anda kullanılması gerekir ya da steril salin ya da laktat ringer solüsyonunda bekletilmesi gereklidir. Distile suda veya hasta kanınında bekletilerek kullanılması kontraendikedir. Distile su ortamında hücre içi konsantrasyon hücre dışı ortama göre fazla olduğu için hücre zarının ortamdaki suyu geçirmesi nedeniyle hücreler ölecektir. Kan ortamında ise kırmızı kan hücrelerinin ortaya çıkardığı birçok sitotoksik ürünler yine hücrelerin ölmesine yol açacaktır (Misch 2008).

Otojen kemik greft tipi yapılacak rekonstrüktif işlem açısından önemlidir; çünkü bazı işlemlerde stabilizasyon ve temel desteklik görevi en önemli unsur iken bazı işlemlerde kemik oluşum hızı, miktarı ve kalitesi önemli olabilmektedir. Alınacak kemik greftinin tipini; rekonstrüksiyon yapılacak alan, oluşan defektin büyüklüğü, kemik greftin rezorbsiyon miktarı, greft alınacak bölgenin durumu ve bölgedeki önemli anatomik oluşumlar, hasta morbidite ve mortalitesi etkilemektedir (Thorwarth vd. 2005).

Kortikal kemikler, form sağlayıp dayanıklı ve sert bir yapı oluştururken osteogenezi artırıcı yetenekleri yoktur (Aktaş 2010). Kansellöz kemik ve kemik iliğinin primer avantajı, belirgin bir şekilde osteogenezi artırma yetenekleridir (Aktaş 2010). Bu

yetenekleri, osteojeniteyi indükleme kapasitelerinin olması kadar, osteoblastlara dönüşebilen canlı hücrelere sahip olmalarına da bağlıdır. Bu greftlerin bilinen tek dezavantajı; mekanik sağlamlığı sağlayamamalarıdır (Aktaş 2010).

Kortikal ve kansellöz kemik greftlerde kemik oluşumu ve vaskülarizasyon açısından farklılıklar mevcuttur. Bu farklar bu greftlerin sahip olduğu hücrelerden ve yapısal farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Kortikal greftler kansellöz greftlere göre daha az canlı osteojenik hücre içermektedir. Ayrıca kortikal greftlerde vaskülarizasyon kansellöz kemiklere göre daha geç olmaktadır. Kansellöz greftlerde önce osteoblastik aktivite daha sonra osteoklastik aktivite meydana gelirken kortikal greftlerde ise önce osteoklastik aktivite daha sonra osteoblastik aktivite meydana gelmektedir (Marx 2007).

2.4.1 Otojen Kemik Greftlerin Avantaj ve Dezavantajları

Otojen kemik greftlerinin en büyük avantajı sahip olduğu canlı osteoblastlar ve kemik iliğindeki osteoprogenitör hücreler ile direkt osteogenez, sahip olduğu hidroksiapatit kolajen matrisi ile osteokondüksiyon ve sahip oldukları BMP gibi büyüme faktörleriyle osteoindüksiyon yapabilmeleridir (Tomlin vd. 2002). Ayrıca kısa sürede mükemmel damarlanma, primer kallus oluşumu, immünolojik reaksiyona sebep olmama (minimal antikor cevabı), çapraz enfeksiyon riskinin olmaması ve maliyetlerinin diğer greft türlerine göre ucuz olması gibi avantajlarını sayabiliriz (Kökden ve Turker 1999).

Otojen kemik greftleri en iyi seçenek olarak kabul edilmesine rağmen bazı dezavantajları da mevcuttur. Bu dezavantajlar; verici bölgede ikinci bir operasyona ihtiyaç olması, bazen genel anesteziye ihtiyaç duyulması, kemik alınan bölgede postoperatif komplikasyonların oluşabilmesi, elde edilen kemik boyutlarının sınırlı olması, büyük defektlerin onarımında yetersiz kalabilmesi, uzun süreli postoperatif ağrı ve hareket kısıtlılığının görülebilmesi ve postoperatif bakım süresinin uzamasıdır (Kökden ve Turker 1999).

2.4.2 Otojen Kemik Greft Komplikasyonları

Otojen kemik grefti alınırken operasyon sırasında ve operasyon sonrasında bazı komplikasyonlar meydana gelebilmektedir. Bu komplikasyonlar otojen iliak kemik greft operasyonlarında süperfisiyal ve derin infeksiyonlara, hematomlara, damarsal ve sinirsel yaralanmalara, iliak kemik kanat kırıklarına, abdominal herniye, kronik ağrıya, skar dokusu oluşumuna ve postoperatif deformitelere, kostal greft operasyonlarında kontur defektine, plevral yırtılmaya ve uzun süreli ağrılara; kalvarial greft

operasyonlarında ise dural yırtılmalara, intrakranial yaralanmalara ve skar dokusu oluşumuna neden olabilmektedir. Ayrıca kemik grefti alınması kan kaybını ve postoperatif infeksiyon riskini artırmakta ve operasyon zamanının uzamasına neden olmaktadır (Ma vd. 2000).

2.4.3 Otojen Kemik Greft Donör Bölgeleri

Otojen kemik greftleri vücuttaki belli bazı verici bölgelerden alınarak kullanılabilir. Bu alınan bölgeler:

1. Kranium
2. Tibia
3. Fibula
4. İliak krest
5. Kaburga
6. Mandibula simfiz
7. Mandibula korpus
8. Maksilla tüber bölgesinden blok şekilde elde edilebilmektedir (Kökden ve Turker 1999).

2.5 Otojen Kemik Greftte Yeni Kemik Oluşum Mekanizmaları

Kemik dokusu, tamir olayları sırasında skar dokusu oluşumundan çok, yeniden yapılanma ve yer değiştirme olaylarının rol oynadığı tek dokudur. Otojen kemik greftte yeni kemik oluşumu ve rejenerasyonu üç önemli etki mekanizması ile oluşmaktadır. Bunlar: direkt osteogenez, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon etki mekanizmalarıdır (Marx 2007).

2.5.1 Direkt Osteogenez

Osteogenez greft içine transfer edilen canlı hücrelerden kemik oluşumunu ifade eder. Otojen greftler osteojenik özelliklere sahip olan tek greft materyalleridir. Trabeküler kemikten elde edilen otojen greftler, kortikal kemikten elde edilenlerle kıyaslandıklarında daha fazla osteoblast hücrelerine sahiptirler. Yeni kemik greft içerisinde transfer edilen endosteal osteoblastlardan ve kemik iliği hücrelerinden gelişebilir. Greftin içinde hazır olarak bulunan osteoprogenitör hücreler çoğalarak

osteoblastlara dönüşür ve yeni kemik yapımına katkıda bulunurlar (Albrektsson ve Johansson 2001).

2.5.2 Osteokondüksiyon

Greft materyalinin rezorbe olarak yeni kemik oluşumunda çatı görevi üstlenmesi ve bu rezorpsiyon aşamasında defekt kenarında yeni kemiğin şekillenmesidir. Yani greft materyali defekte fiziksel destek sağlarken, aynı zamanda tamir sürecinde kanlanmayı ve havers kanallarının oluşmasını yönlendiren bir matriks oluşturmaktır (Albrektsson ve Johansson 2001). Osteokondüktif mekanizmada kemik ve greft materyali sahip olduğu hidroksiapatitin inorganik matriksi ile osteogeneze rehberlik etmekte, yönlendirmekte ve matriks görevi görmektedir (Marx 2007). Bu matriks hücre adezyon molekülleri olan fibrin, fibronektin ve vitronektine ya da onun kollajen içeren şekline bağlanmalıdır. Diş çekim socketinin iyileşmesi osteokondüksiyona iyi bir örnektir (Marx 2007).

2.5.3 Osteoindüksiyon

Kemik matriksinden gelen indüksiyon ajanlarından bir veya birden çoğunun etkisi altında primitif mezenkimal hücrelerden türeyen osteoprogenitör hücreler tarafından başlatılan yeni kemik yapımını ifade eder. Greft materyalinin uyarısı ile çevre dokulardaki osteoprogenitör hücreler, osteogenezisi başlatır. Osteoindüktif etki sadece kök hücrelerini etkilemeyip, bununla beraber kemik yenilenmesinin ve onarımının değişik aşamalarını uyaran faktörleri de içermektedir. Kas gibi heterotropik bir bölgeye yerleştirilen bir greft materyalinin etrafında kemik oluşumu gözlenirse, bu materyal osteoindüktif olarak kabul edilir (Albrektsson ve Johansson 2001).

2.5.4 Otojen Kemik Greft Uygulamalarında Yeni Kemik Oluşumu

Otojen kemik greft osteogenez, osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon mekanizmalarının birini, ikisini ya da her üçünü de değişik derecelerde içerebilmektedir (Marx 2007). Bu oluşum safhaları birbirlerinden kesin sınırlarla ayıramamakla birlikte birbirleriyle iç içe geçmiş bir şekilde kemik oluşumunu sağlamaktadır. Özellikle greftin kansellöz bölümünde bulunan transplante edilmiş canlı hücreler ilk 3-4 gün içinde çevredeki vasküler dokulardan sağlanan beslenmeyle yaşamlarını devam ettirirler. Trasplantasyon işleminden sonra kemik trabekülünde canlı olarak kalan osteositler yeni osteoid dokunun oluşmasını ve çoğalmasını sağlarlar. Faz 1 olarak nitelendirilen

bu osteojenik safhada transplante edilen hücre sayısı çok önemlidir. Çünkü orijinal boyuttan farklı olarak oluşacak yeni kemik miktarının belirlenmesinde hücre sayısı belirleyici bir rol üstlenmektedir. Hücre sayısı ise transplante edilen hücrelerin yoğunluğuyla doğru orantılıdır. Bu nedenle elde edilen greft materyalinin tamamı bir şırıngaya aktarılarak sıkıştırılırsa bölge başına düşen hücre miktarının da artırılması mümkün olur. Taze otojen kansellöz kemik, maksimum miktarda transplante edilmiş kemik hücresinin ve farklılaşmamış hücrelerin canlılığını korumasını sağlar. Buna rağmen sadece kanlanmanın 300µm yakınında bulunan osteositler ilk 1-2 haftada canlı olarak kalır ve diğer hücrelerin hepsi difüzyon yoluyla yeterli derecede beslenemeyerek ölürlür. Kan damarları fibröz dokuyla ortalama aynı hızda greft materyalinin içine doğru büyümektedir ve bu hızda ortalama günde 1mm'ye denk gelmektedir. Bu nedenle greftin başarısı erken vaskülarizasyona bağlıdır. Sonuçta bu tek taraflı safha 4 hafta içinde tamamlanır. Transplante edilen hücrelerin ölmesini takiben, konak dokudaki kemik hücreleri grefti rezorbe ederek remodelling işlemini tamamlarlar. İndüktif proteinlerin ve büyüme faktörlerinin transplante kemikten salgılanmasıyla Faz 2 olarak adlandırılan osteoindüktif safha başlamış olur. Böylece Faz 2' de, Faz 1'de oluşan kemik rezorbe olduktan sonra 1:1 oranında yeni kemik oluşacaktır. Bu faz yaklaşık 6 hafta sonra başlar ve 6 ay kadar sürer. Bu morfojenik proteinlerin primer kaynağı kortikal kemiktir. Yeni kemik oluşumu sırasında otojen greftin iskeletini oluşturan hidroksiapatitin inorganik matriksi, osteokondüktif etkiye sahiptir. Bu olay ise yeni kemik oluşumunun 3. fazı olarak değerlendirilir. Ayrıca greft üzerindeki kalın kortikal tabaka yönlendirilmiş kemik rejenerasyonunda kullanılan bariyer membranlara benzer özellik göstermektedir. Çünkü epitel ve bağ dokusunun greft bölgesine infiltrasyonunu engellemektedir (Misch 2008).

2.6 Ksenogreftler

Ksenogreft terimi yunanca kelime "xeno(s)" (=yabancı)' dan gelmektedir ve bunun anlamı bir türden alınan greft dokusunun, başka bir türe aktarılmasıdır. Geçmişte bu terim "heterogreft" olarak literatürde yer almaktaydı. İlk başarılı ksenogreft uygulaması 1668 yılında cerrah Job Janszoon van Meekeren tarafından gerçekleştirilmiştir (Stavropoulos 2008). Ksenogreftler, insan dışında, hayvanlardan elde edilen kemiğin inorganik kısmından üretilirler ve osteokondüktiftirler. Günümüzde kullanılmakta olan iki tip ksenogreft vardır (Nasr vd. 1999).

- a. Mercan kaynaklı kalsiyum karbonatlar
- b. Sığır/at kaynaklı hidroksiapatitler

2.6.1 Mercan Kaynaklı Kalsiyum Karbonatlar

Mercan kaynaklı greftler ortopedik, kraniofasyal, oral ve periodontal cerrahide kemik defektlerinin tedavisinde kullanılmaktadır. Biyouyumunun çok iyi olması, osteokondüktif özelliği, kolay hazırlanması, kolay şekillenmesi ve maliyetinin düşük olması bu türün avantajlarıdır. Mercan, kemiğe yapısal olarak yakınlığı ve biyolojik olarak da inert bir madde olması nedeni ile ideal bir greft materyalidir (Wiltfang vd. 2004).

Mercanlar yumuşak ve sert formlarda bulunur. Sert mercanlar kemik ogmentasyonu için tek uygun mercan tipidir. Kalsiyum fosfat ve kalsiyum karbonat kaynaklıdır. Materyal çoğunlukla poröz kalsiyum karbonattan oluşurken tüm iç ve dış yüzeyler çoğunlukla hidroksiapatit olan ince kalsiyum fosfat tabakasıyla kaplıdır. Bu kalınlık değiştirilerek değişik rezorpsiyon hızları olan başka bir grup oluşturulabilir (Kömürcü vd. 2011).

Mercan kaynaklı hidroksiapatitin yavaş emilmesi birçok klinik uygulamada dezavantaj olarak görülmektedir. Emilim hızını artırmak için mercan kaynaklı greftlerin hazırlanmasında bazı değişiklikler yapılmıştır. Bu gelişmelerden biri hidroksiapatitin, kalsiyum karbonat ile birleştirilmesidir. Bu kompozit birleşik, kalsiyum karbonatın hidrotermal yolla kısmi olarak hidroksiapatite çevrilmesiyle elde edilir. Bu işlem sonucu üstü ince bir tabaka hidroksiapatit kaplı bir kalsiyum karbonat ana yapısı ortaya çıkar. Sonuç olarak bu kompozit implantın erken dönemdeki biyolojik davranışı, saf bir mercan kaynaklı hidroksiapatit implantı gibidir. Birkaç ay içinde hidroksiapatit tabakası erir, kalsiyum karbonat yapı açığa çıkar ve kısa zamanda rezorbe edilerek, yerini yeni oluşan kemiğe bırakır (Thorwarth vd. 2005).

Biocoral (Inoteb, Saint Gonnery, Fransa) piyasa adıyla mercan kaynaklı greft piyasada mevcuttur. %97-98 oranında kalsiyum karbonattan oluşur ayrıca stronsiyum, florim, magnezyum, sodyum ve potasyum içerir (Wikesjö vd. 2003). Porozite oranı %45' den fazladır ve 250µm (150-400 arasında) çapında porlara sahiptir bu yapı spongiyöz kemiği taklit eder. Bu madde yüksek osteokondüktif potansiyele sahiptir çünkü herhangi bir fibröz enkapsülasyon rapor edilmemiştir. Kısmen rezorbe olabilmektedir fakat rezorpsiyon yılı 5-7 yıl civarındadır (Misch 2008). Literatürde diğer greft materyalleri ile karşılaştırılabilecek olumlu sonuçları mevcuttur.

2.6.2 Sığır/At Kaynaklı Hidroksiapatitler

Piyasada bulunan sığır kemiği materyalleri doğal kemik minerali ve azaltılmış organik komponent şeklinde üretilmektedir. Biyokimyasal, histokimyasal ve biyofiziksel analizler sonucu, sığır kaynaklı ksenogreftte kollajen ya da herhangi başka bir protein varlığına rastlanılmamıştır. Kimyasal tepkimelerle tüm organik yapı arındırılır ancak mikro yapı korunur. Bu yapı doğal kemikteki poröz yapıyı taklit etmesi sayesinde yeni kemik oluşumu için iskelet görevi görür (Benke ve Olah 2001). Bu materyalin avantajı, insan kemiğinin yapısına yakın olması ve sentetik kemik materyallerinden daha fazla osteokondüktif özelliğe sahip olmasıdır (Nasr vd. 1999).

Şu an piyasada bulunan sığır kaynaklı hidroksiapatit deproteinize, hücre aracılı rezorpsiyona uğrayan doğal mikroporöz yapıdadır ki bu yapı yeni kemikle yer değiştirmeyi sağlamaktadır. Bu greftlerin artırılmış yüzey yapıları, osteokondüktif bir çatı oluşturur, poröziteleri ve mineral yapıları da insan kemiği ile kıyaslanabilecek ölçüdedir.

Biodegradasyon olarak adlandırılan rezorpsiyon kemik greftinin başarısını etkileyen önemli bir faktördür. İyileşme sürecinde rezorbe olan greft materyalinin yerini yeni oluşan kemiğe bırakırken greft materyali bütünlüğünün kaybolmaması istenmektedir (Murat Yildirim vd. 2000). Sığır kaynaklı ksenogreftin yavaş rezorbe olduğu ve enkapsüle olduğu bazı çalışmalarca gösterilmiştir (Murat Yildirim vd. 2000).

2.7 Wnt/ β Katenin Yolağının Kemik Oluşumu Üzerine Etkileri

β catenin proteini Wnt / β katenin yolağının esas hedefi ve gerekli komponentidir. Bu sinyal yolağının hücre proliferasyonu, sağ kalım, kendi kendini yenileme ve farklılaşma gibi pek çok hücreyel süreçte önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Bu yolak hücre ölümü, polaritesi, farklılaşması, migrasyonu, çoğalması ve fonksiyonları gibi organ ve dokulardaki büyüme ve gelişmenin çok sayıda aşamasında yer alır. Örneğin Wnt/ β catenin yolağı embriyolojik gelişim sırasında vücut aksinin oluşumunda ve doku ve organ gelişiminde rol alır. Bu yolak sadece büyüme ve gelişim aşamasında değil aynı zamanda matur iskeletin sürdürülmesinde de kritik bir role sahiptir.

Wnt, kondrogenesis ile uzuvların oluşumu, ve osteoblastlar aracılığıyla kemik matriksinin sentezi, farklılaşması, çoğalması, osteoklastların fonksiyonları gibi iskeletsel oluşum ve gelişimin birçok evresinde önemli bir yere sahiptir.

Kırık iyileşmesinin erken evrelerinde β katenin pluripotent mezanşimal hücrelerin osteoblast veya kondrositlere ve geç evrelerde de preosteoblastların osteoblastlara dönüşmesi için gereklidir.

Lityum, β katenini aktive ederek kemik oluşumunu artırır ve bu sebeple kırık iyileşmesinde faydalı olabileceği düşünülmektedir (Chen vd. 2007). Halen geliştirilmekte olan anti-sklerositin antibody gibi bazı ilaçların da kemik oluşumunu artırmakla kalmayıp osteoporoz sebebiyle kayba uğrayan kemiğin geri döndürülmesinde de etkili olabileceği düşünülmektedir (Clarke 2014).

β katenin artmış kemik rezorpsiyonu esnasında osteoblastlardan bağımsız olarak osteoklastları negatif olarak etkiler (Albers vd. 2013). β kateninin osteoklastlar üzerine etkisini anlamak için RANKL çalışmalarına yoğunlaşmıştır. Bir çalışmaya göre β kateninin RANKL reseptör aktivatörü üzerinde etkisi görülmezken (Sapir-Koren vd Livshits 2014), bir başka çalışmada β kateninin RANKL reseptörlerinin sklerositin aracılığıyla arttığını gözlemlemişlerdir (Wijenayaka vd. 2011). Özetle β kateninin osteoklastlar üzerindeki etkisi henüz netleştirilememiştir.

β katenin osteoblastlar üzerindeki mezanşimal prekürsör hücrelerin farklılaşması (Day vd. 2005) ve osteoblastların yaşamını sürdürebilmesi için gereklidir (Glass ve Karsenty 2006). β katenin osteosit canlılığını koruyarak kemik homeostasisi ve mekanotransdüksiyonunda etkili olan ana moleküldür (Kramer vd. 2010)

2.8 Tideglusib

Tideglusib, öncelikle Alzheimer hastalığı ve progresif supranükleer palsinin tedavisi için geliştirilmiş bir ilaçtır (Martinez vd. 2011). Alzheimer hastalığı demansın en sık rastlanılan formudur. En kabul görmüş hipotez bu hastalığın trigger kaskatındaki Tau proteinini değiştiren, sinaptik disfonksiyona ve nöral ölüme neden olan amiloid β varlığında geliştiğini açıklar (Domínguez vd. 2012). Tideglusib Wnt/ β katenin yolağında kritik regülatör olan GSK-3 β aktivitesini suprese etmektedir (Duan ve Bonewald 2016; Li vd. 2017). Tideglusib kullanımı sonrasında glikojen sentaz kinaz 3 β (GSK-3 β)'nin beyinde ciddi derecede yükselmesi Alzheimer hastalarında etkili olabileceği izlenimi yaratmıştır. Hücre canlılığını sürdüren genlerin transkripsiyonlarını önleyen β -katenin yolağını baskılaması da ayrıca önemlidir. Bütün bu faktörler bu kinazın Alzheimer için potansiyel ilaç olduğuna işaret eder

GSK-3 β doku iyileşmesi yolağında da önemli bir role sahiptir. Bu yüzden, ilaçla ilgili olarak derin dentin çürüğünün tamiri konusunda çalışmalar yeni başlamıştır. Yapılan literatür taramasına göre tideglusibin dentin dokusu üzerine pozitif etkisini

gösteren bir çalışmaya rastlanılmıştır (Neves vd. 2017). Yapılan çalışmada tideglusibin bu etkisini çeşitli mekanizmalarla gerçekleştirdiği gösterilmekte ve Wnt/ β katenin yolağının bu mekanizmalardan bir tanesi olduğu rapor edilmektedir (Neves vd. 2017). Özellikle Wnt/ β katenin yolağı iskelet formasyonu ve gelişimi için gerekli bir yoldur. (Jin vd. 2017).

Dentin ve kemik doku yapısal olarak ve iyileşme mekanizması açısından benzerlik göstermektedir. Dentinin ağırlığının %70' i mineral matriks, %20'si organik matrix, %10' u sudan oluşurken; alveolar kemiğin ağırlığının % 65' i mineral matriks, %25'i organik matriks, %10'u sudan oluşur (Gual-Vaqués vd. 2018). Bu benzerlikten yola çıkarak biz de tideglusibin aynı etki mekanizmasıyla kemik dokusuna etki edebileceğini düşünmekteyiz. Ancak kemik dokusu üzerine ya da greft türleriyle birlikte uygulanmasına yönelik henüz bir çalışmaya rastlanamamıştır. Bu çalışmada Tideglusib ile deminarize kurutulmuş kemik greft ve otojen kemik greftin karıştırılmasıyla kemik iyileşmesi üzerine etkilerinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2.9 Hipotez

Çalışmamızın hipotezi, "Tideglusib ile karıştırılan kemik greftin yeni kemik oluşumu üzerine etkisi vardır/yoktur." şeklinde kurulmuştur.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Etik Kurul Onayı

Pamukkale Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (PAÜBAP) tarafından desteklenen 2018DİŞF011 kodlu bu çalışma, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda ve Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Çalışmamızın yürütülebilmesi için Pamukkale Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul Başkanlığı'ndan 21.03.2018 tarihli ve 2018/03 sayılı karar ile etik kurul onayı alınmıştır (Ek-1a). Bu karar sonucunda PAUHADYEK-2018/05 no'lu çalışmamızda "Hayvan Deneyleri Etiği"ne uygun olarak çalışılmıştır.

3.2 Deneysel Hayvan Sayısı ve Deneysel Grupları

Çalışmanın deneysel kısmı Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmamız kapsamına alınacak deneysel hayvanı sayısını belirlemek amacıyla elde edilebilecek olan farklılığın etki büyüklüğünün oldukça kuvvetli ($d=1.7$) olabileceği düşünülerek yapılan güç analizi sonucunda çalışmaya en az 30 rat alındığında (her grup için en az 6 rat) %95 güven düzeyinde %80 güç elde edilebileceği hesaplanmıştır. Bu analiz ışığında çalışmamız veteriner kontrolü ile sağlıklı olduğu belirlenen ağırlıkları yaklaşık 250-300 gram olan, ortalama 12 haftalık yetişkin 40 adet Wistar cinsi albino rat üzerinde yapılmıştır.

Bu çalışma için kullanılacak olan ratlar, Pamukkale Üniversitesi Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilmiştir. Denekler, 12 saat aydınlık/ 12 saat karanlık siklusu sağlanacak şekilde tutularak, serbest diyet ve içme suyu ile beslenmeleri sağlanmıştır. Oda sıcaklığı 22 ± 2 °C'de sabit tutulmuştur. Buldukları odanın nispi nem oranı %30-45 arasında tutularak, odanın havalandırması filtre edilerek, kontaminasyon riski önlenmiştir. Ratlar kafeslerde tek olarak ve altlarında talaş olacak şekilde barındırılmıştır.

Tablo 3.1 Kontrol ve deney gruplarındaki hayvan sayıları

Kontrol Grubu (Boş Defekt)	8 adet
Deney Grubu 1 (Ksenogreft)	8 adet
Deney Grubu 2 (KsenoGreft+Tideglusib)	8 adet
Deney Grubu 3 (Otojen Greft)	8 adet
Deney Grubu 4 (Otojen Greft+ Tideglusib)	8 adet
Kullanılan toplam hayvan sayısı	40 adet

Çalışma 1 kontrol grubu, ve 4 deney grubundan oluşmaktadır. Her bir grup 8 deney hayvanından oluşmaktadır (Tablo 3.1). Kontrol grubunda rat mandibulasında oluşturulan 5mm çapındaki defekt herhangi bir işlem yapılmadan boş olarak bırakılmıştır. Deney gruplarında ise 1.deney grubunda defekt bölgesine Bonefill (Bionnovation Biomaterials, England) Kseno kemik greft materyali yalnız başına, 2. Deney grubunda Bonefill (Bionnovation Biomaterials, England) Kseno kemik greft materyali ile tideglusib (50 mg tb, Sigma Aldrich, Missouri, ABD) karıştırılarak defekt bölgesine uygulanmıştır. 3. Deney grubunda rat mandibulasından elde edilen otojen kemik greft partikül haline getirilerek yalnız başına (Şekil 3.4, Şekil 3.5), 4. Deney grubunda ise otojen kemik greft, tideglusib (50 mg tb, Sigma Aldrich, Missouri, ABD) ile karıştırılarak uygulanmıştır. Daha sonra defekt bölgesindeki kemik oluşumunu değerlendirmek için ratlar 28. gün sakrifiye edilmiştir. Kemik oluşumu histolojik olarak değerlendirilmiştir.

3.2 Cerrahi Prosedür

Yapılacak tüm işlemler steril şartlarda gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanlarının anestezisi intraperitoneal enjeksiyon yöntemi ile 3 mg/kg Xylazine (Rompun 2%, Bayer, İstanbul, Turkey) ve 35 mg/kg Ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı-Warner Lambert, İstanbul, Turkey) kullanılarak sağlanmıştır.

Rat mandibula bölgesindeki deri traş edildikten sonra kutanöz yüzey betadine kullanılarak dezenfekte edilmiştir. 2.5 cm'lik tam kalınlık insizyon yapıldıktan sonra kemik yüzeyi açığa çıkarılacak şekilde doku eleve edilmiştir. Standart kritik boyutta 5 mm çapında tam kat kemik grefti (Şekil 3.1), 5 mm çapında trefin frez kullanılarak irrigasyon altında alınmıştır (Şekil. 3.2). Defekt bölgesi kontrol grubunda boş

bırakılırken (Şekil 3.3), deney gruplarında ise otojen ve kseno greftler yalnız başlarına ve tideglusib ile karıştırılarak doldurulmuştur (Şekil 3.6, Şekil 3.7). Daha sonra eleve edilen epidermal flap sırasıyla önce kas ve cilt altı faysalar ve cilt 5-0 poliglaktin 910 (Vikril Jonson&Johnson/ethicon) sutür kullanılarak orjinal pozisyonuna suture edilmiştir.



Şekil 3.1 Alınan Kemik Greft Bölgesinin Şematize Görüntüsü



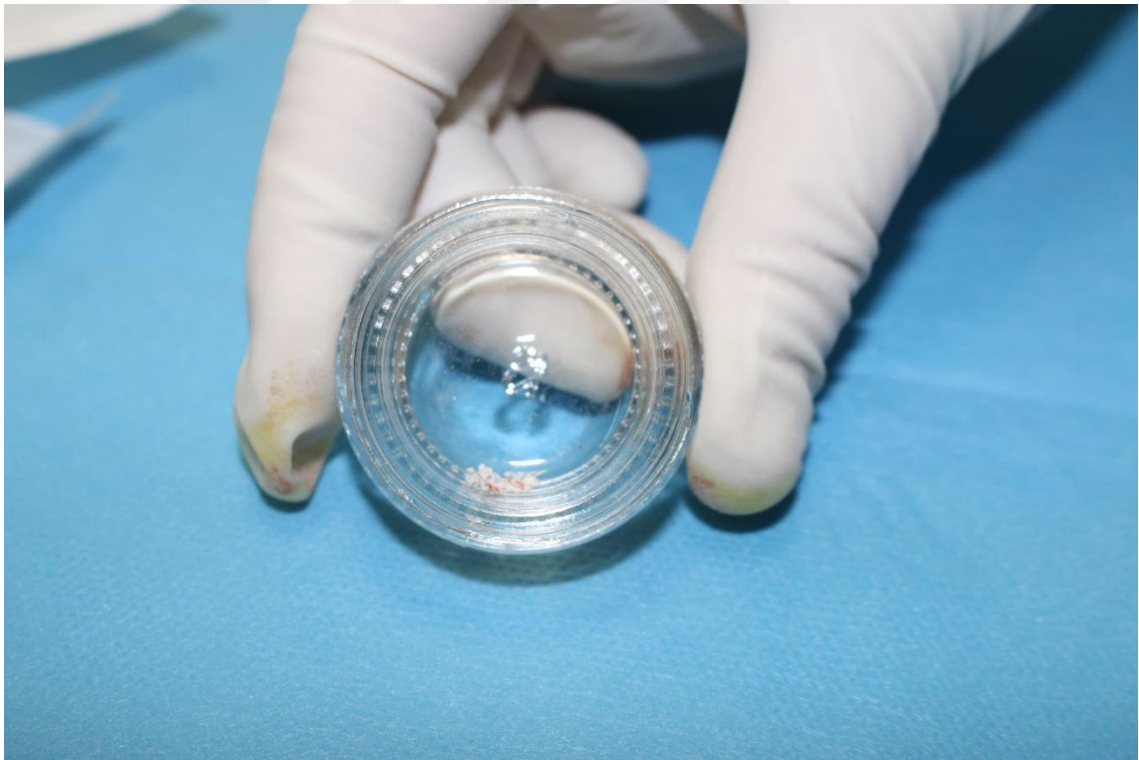
Şekil 3.2 Rat mandibulasında 5 mm çapında defekt oluşturulması



Şekil 3.3 Rat mandibulasında 5 mm çapındaki defektin görüntüsü



Şekil 3.4 Rat mandibulasından elde edilmiş olan otojen kemik grefti



Şekil 3.5 Otojen kemik greftin partikül haline getirilmesi



Şekil 3.6 Otojen greftin defekt bölgesine uygulanması



Şekil 3.7 Mandibulada oluşturulan defekte tadalafilin uygulanması

3.3 Ratların Bakımı Ve Deneyin Sonlandırılması

Postoperatif olarak deney hayvanlarına Ceftriaxon 25 mg/kg (Rocephine, Roche, Basel, Switzerland) ve Carprofen 4 mg/kg (Rimadyl, Pfizer) flakon 3 gün süre ile subkutan olarak verilmiştir.

Deney hayvanları 28. Günde anestezi altında servikal dislokasyon yöntemi kullanılarak sakrifiye edilmiştir. Hayvanların kalvaryumları alınarak %10'luk formol içinde saklanmıştır. Geriye kalan hayvan atıkları plastik torba içinde toplanıp, hastane tıbbi atıklarına atılmıştır.

3.4 Histopatolojik Değerlendirme

Histopatolojik İnceleme

Nekropsi sırasında alınan defekt oluşturulmuş mandibula örnekleri %10'luk tamponlu formaldehit solüsyonunda tespit edildi. Ardından 2 hafta boyunca dekalsifiye solüsyonunda (Osteofast 1, Biognost, Zagreb- Hırvatistan) dekalsifiye edildi. Trimlenen kemik parçaları takip kasetlerine alındı. Bir gün boyunca akan su altında yıkandı. Daha sonra doku takip prosedürüne geçildi. Bu işlem için gece boyunca takip cihazında alkol ve ksilol serilerinden geçirilerek parafine bloklandı. Rutin patolojik doku takibinde Leica ASP300S model ototeknikon kullanıldı. Bloklardan 4-5 saat soğutulmanın ardından Leica 2155 rotary mikrotomda, 5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler normal lamlara ve polilizinli lamlara alındı. Bir gece oda ısısında kurutulan kesitler ertesi gün boyamaya alındı. Normal lamlara alınan doku kesitleri 30' ar dakika süreyle 3 ayrı ksilol serisinden geçirilerek parafin tabakası uzaklaştırıldı. Daha sonra sırasıyla %100, 96, 90, 80 ve 70' lik olmak üzere alkol serisinden geçirilerek dokulara su verildi. Ardından dokular hematoksilinle (15 dakika) ve eozinle (3 dakika) boyandı. Boyama işleminin ardından sırasıyla %70, 80, 90, 96 ve 100'lük alkollerden geçirilerek dokuların suyu alındı. Parlatmak için ksilolden geçirilen dokuların üzerine entellan damlatılarak lamel yapıştırıldı. Olympus CX21 model ışık mikroskobunda incelenen preparatlar Olympus DP26 model kamera ile mikroskobik dijital fotoğraflar çekilerek bilgisayar ortamına aktarıldı.

Kemik iyileşme bölgesi defekt alanında aşağıdaki gibi skorlandı. Histomorfometrik parametreler ve hesaplamalarda;

Total iyileşme alanı (TİA; mm²), defekt kapanma oranı (DKO; %), yeni şekillenmiş kemik alanı (YKA; mm²) ve rezidüel materyal alanı (RMA; mm²) hesaplandı (Jung et al. 2015).

Lezyon alanında osteoblast ve osteoklast sayıları 1.23 mm² lik alanda (x400 büyütmede) sayıldı (Araújo et al. 2015).

3.5 İmmünohistokimyasal Değerlendirme

İmmunperoksidaz yöntem için polilizinli lamlara çekilerek hazırlan 6 ayrı seri kesitte streptoavidin-biotin kompleks peroksidaz yöntemi uygulandı. Bioss (USA) firmasının VEGF-A ve BMP-2 serumlarının kullanıldığı incelemede, kesitler üzerine VEGF [Rabbit anti-VEGF polyclonal antibody (bs-1957R), 1/100 dilüsyon] ve BMP-2 [Rabbit anti-BMP-2 polyclonal antibody (bs-1012R), 1/100 dilüsyon] uygulandı. Sekonder kit olarak EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC kit (ab80436) ve kromojen olarak DAB (3,3-diaminobenzidine) (Abcam, UK) kullanıldı. Bu amaçla ksilol serilerinden geçirilerek deparafinize edilen kesitler, alkol serisinden geçirilerek rehidre edildikten sonra 10 dakika süre ile suda yıkandı. Testin tüm aşamaları nemli kamarada gerçekleştirildi. Bu aşamadan sonra lamlar, dokulardaki endojen peroksidaz aktivitesini gidermek amacıyla metanolde hazırlanmış %3' lük hidrojen peroksit (H₂O₂) ile 20 dakika boyunca inkübe edildi. 10' ar dakika süreyle iki defa fosfat tamponlu solüsyonu (PBS, pH 7,2) ile yıkanan dokular, nonspesifik antijenik boyamaları önlemek için 45 dakika boyunca ticari normal keçi serumunda tutuldu. Daha sonra dokular yıkama yapılmaksızın primer antikolar ile kaplandı ve bir gece +4°C' de inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün dokular aynı şekilde PBS ile yıkandı akabinde 30 dakika süreyle streptavidin ile muamele edildi. Bu aşamadan sonra iki defa 10' ar dakika olmak üzere PBS ile yıkandı. Dokular 30 dakika boyunca biotinli serum ile inkübe edilip aynı şekil ve süreyle yıkandı. Yıkama işlemini takiben hazırlanmış olan DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride) substratı 15 dk süreyle uygulandıktan sonra harris hematoksilen ile karşıt boyama yapılarak işlem sonlandırıldı. Alkol serilerinden geçirilen dokular dehidre edildikten sonra ksilolde şeffaflaştırılıp yapıştırıcı (Entellan-Merck) ile lamel kapatıldı. Aynı şartlarda aynı prosedüre uyularak boyanan dokular ışık mikroskopunda (Olympus CX41) değerlendirildi. Negatif kontroller için primer serum yerine PBS' ye konuldu. Database Manual Cell Sens Life Science Imaging Software System (Olympus Corporation, Tokyo, Japan) kullanılarak mikrofotografi ve morfometrik inceleme yapıldı. İmmünohistokimyasal boyanma şiddeti 0 ile 3 arasında semikantitatif olarak skorlandı,

0= negatif, 1= hafif ekspresyon, 2= orta ekspresyon ve 3= şiddetli ekspresyon olarak değerlendirildi. Skorlara istatistik analiz yapılarak gruplar arasındaki fark değerlendirildi.

3.6 İstatistiksel Analiz

Çalışmada immunohistokimyasal skorların istatistik analizi One-way ANOVA testi ile SPSS 15.00 paket programda yapıldı. Gruplar arası farklar Duncan testi ile karşılaştırıldı. $P < 0.05$ olan değerler istatistik olarak önemli kabul edildi.



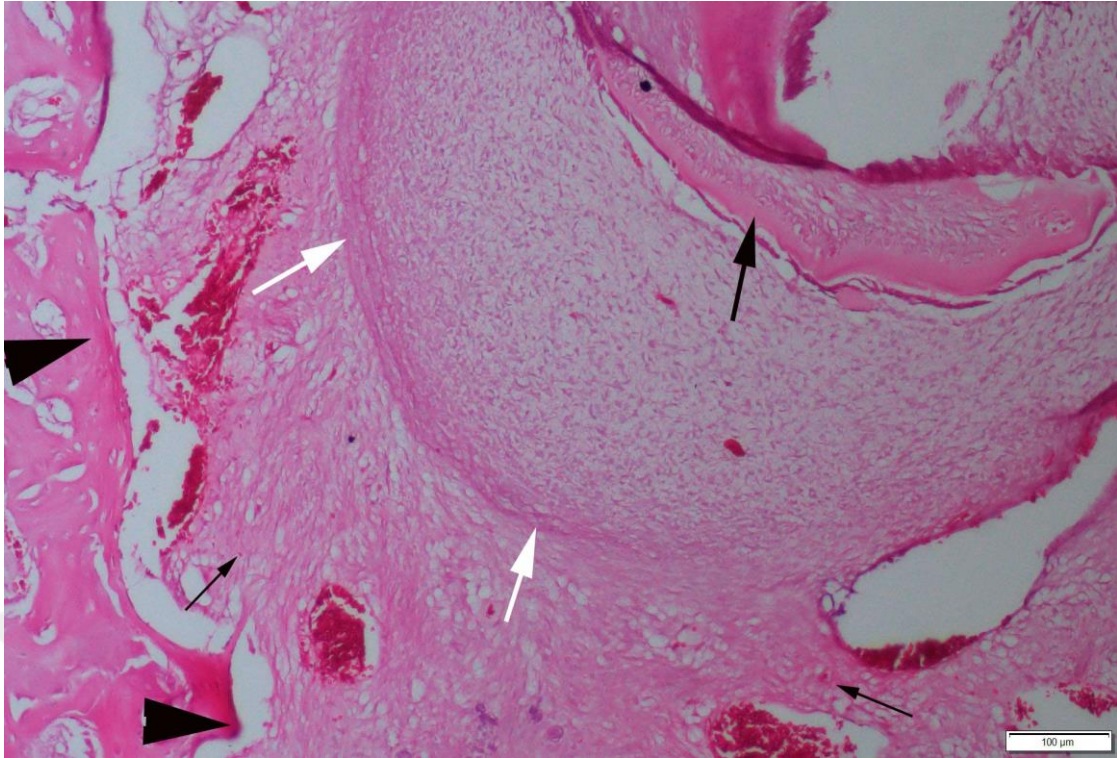
4. BULGULAR

4.1 Klinik Bulgular

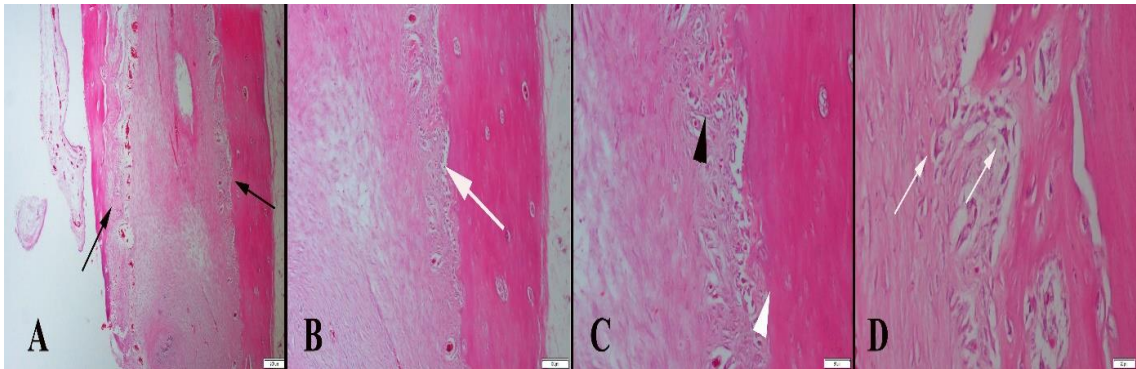
Deneysel çalışma süresince ratların uygulanan cerrahi işlemi iyi tolere ettiği, beslenmeleri açısından herhangi bir olumsuzluk gelişmediği, operasyona bağlı herhangi bir enfeksiyon oluşmadığı ve deneklerin genel sağlık durumlarının iyi olduğu gözlemlendi.

4.2 Histomorfometrik Bulgular

Mandibula örneklerinin histopatolojik incelemesinde tüm gruplarda defekt bölgesinin genellikle bağ doku ile doldurulduğu bazı bölgelerde ve bazı gruplarda kırık ve kemik gelişimleri saptandı. Kontrol grubunda daha belirgin olmak üzere bazı ratlarda ise orta kısımda boşluk bulunan defektin tam kapatılmadığı alanlara rastlandı. Otojen ve otojen-tideglusib gruplarında kemikleşmenin daha belirgin olduğu gözlemlendi. En az kemikleşmeye kontrol grubunda rastlandı. Ksenogreft ve ksenogreft-tideglusib gruplarında da kemikleşme kontrol grubuna göre daha belirgindi (Şekil 4.1-4.10).

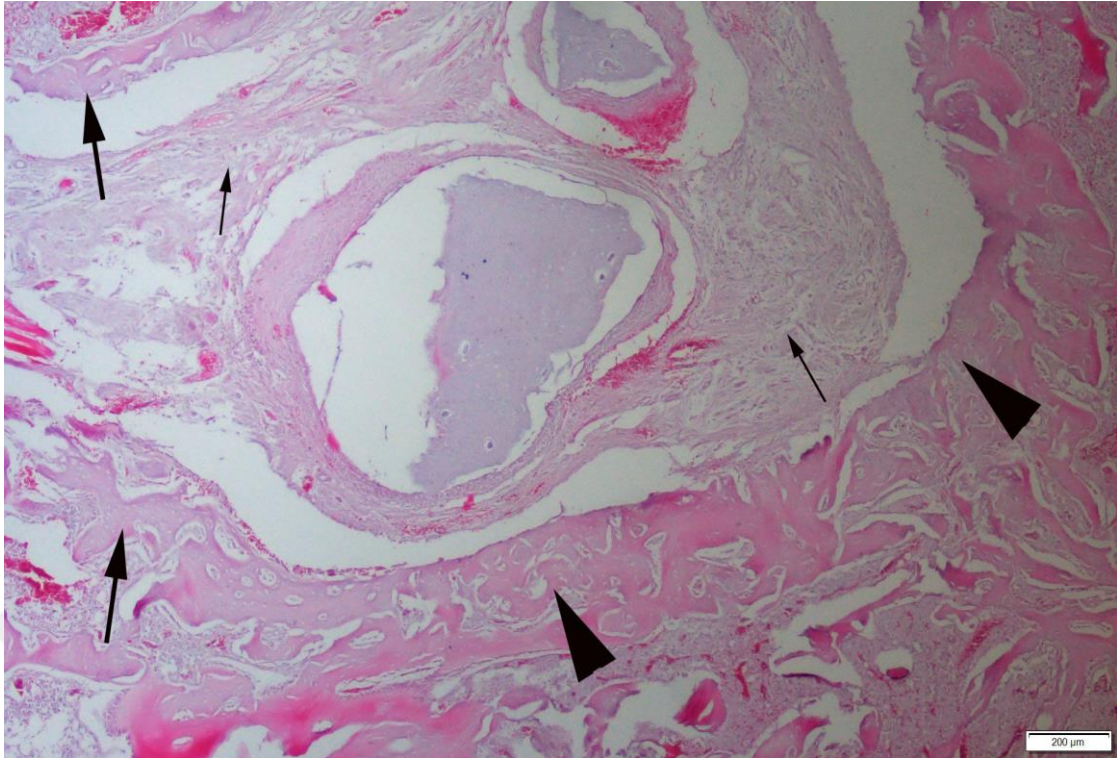


Şekil 4.1 Kontrol grubundaki bir ratın defekt bölgesinin görünümü (ok başları), bağdoku (ince ok), kıkırdak (beyaz ok) ve kemikleşme bölgeleri (siyah ok), HE, Bar=100µm

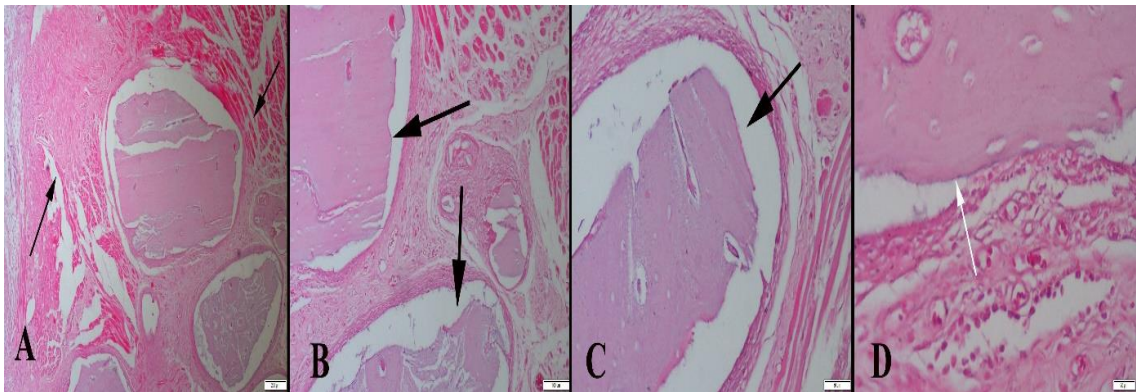


Şekil 4.2 Kontrol grubundaki bir başka ratın defekt bölgesinin değişik büyütlemelerdeki görünümü

HE. (A) defekt alanı siyah oklar, Bar= 200µm. (B) defekt bölgesi sınırı (beyaz ok), Bar= 100µm. (C) çene kemiğinden (beyaz ok başı) köken alan yeni kemik oluşumları (siyah ok başı), Bar= 50µm. (D) defekt bölgesi sınırında osteoklastlar (beyaz oklar), Bar= 20µm.

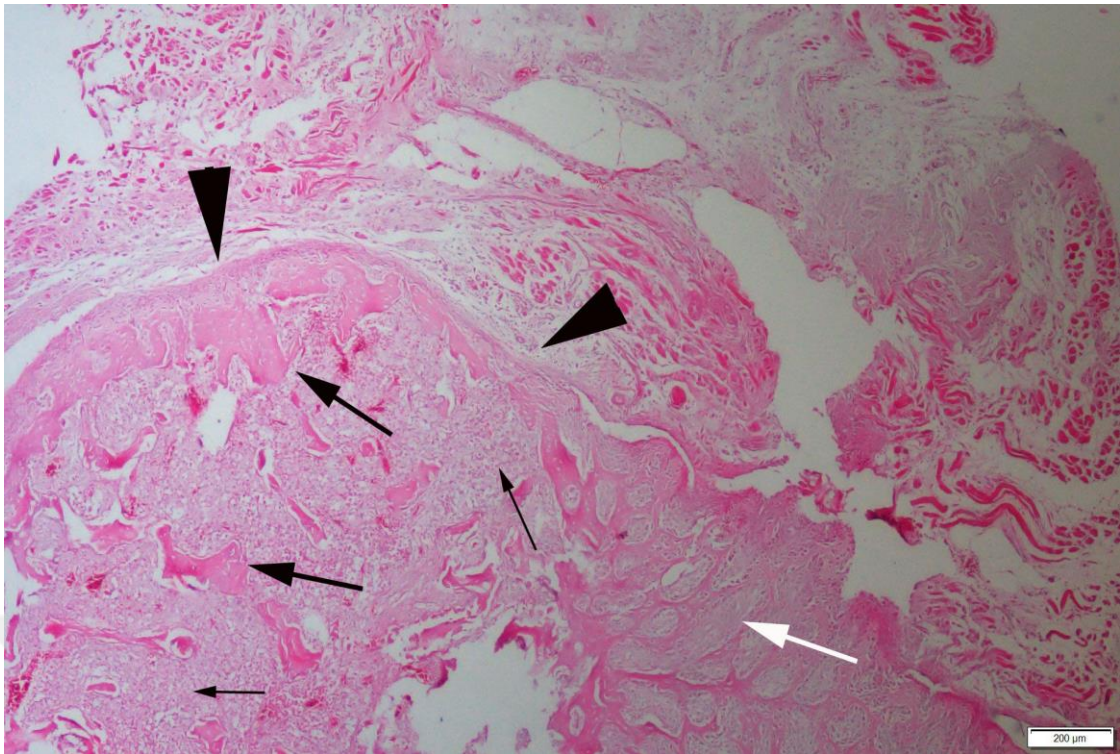


Şekil 4.3 Ksenogreft grubundaki bir ratın defekt bölgesinin görünümü (ok başları), bağ doku (ince ok), kemikleşme bölgeleri (kalın ok), orta kısımda greft kalıntıları, HE, Bar=100µM.

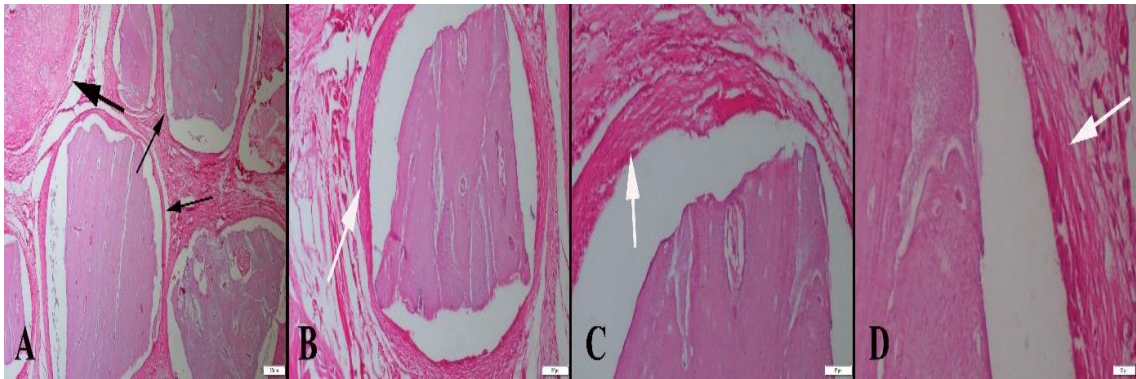


Şekil 4.4 Ksenogreft grubundaki başka bir ratın defekt bölgesinin değişik büyütmelelerdeki görünümü

HE. (A) defekt alanı oklar, Bar= 200µm. (B) defekt bölgesinde greft kalıntıları (oklar), Bar= 100µm. (C) greft kalıntılarının büyük büyütmedeki görünümü (ok) köken alan yeni kemik oluşumları (siyah ok başı), Bar= 50µm. (D) defekt bölgesi sınırında kemik oluşumları (beyaz ok), Bar= 20µm.

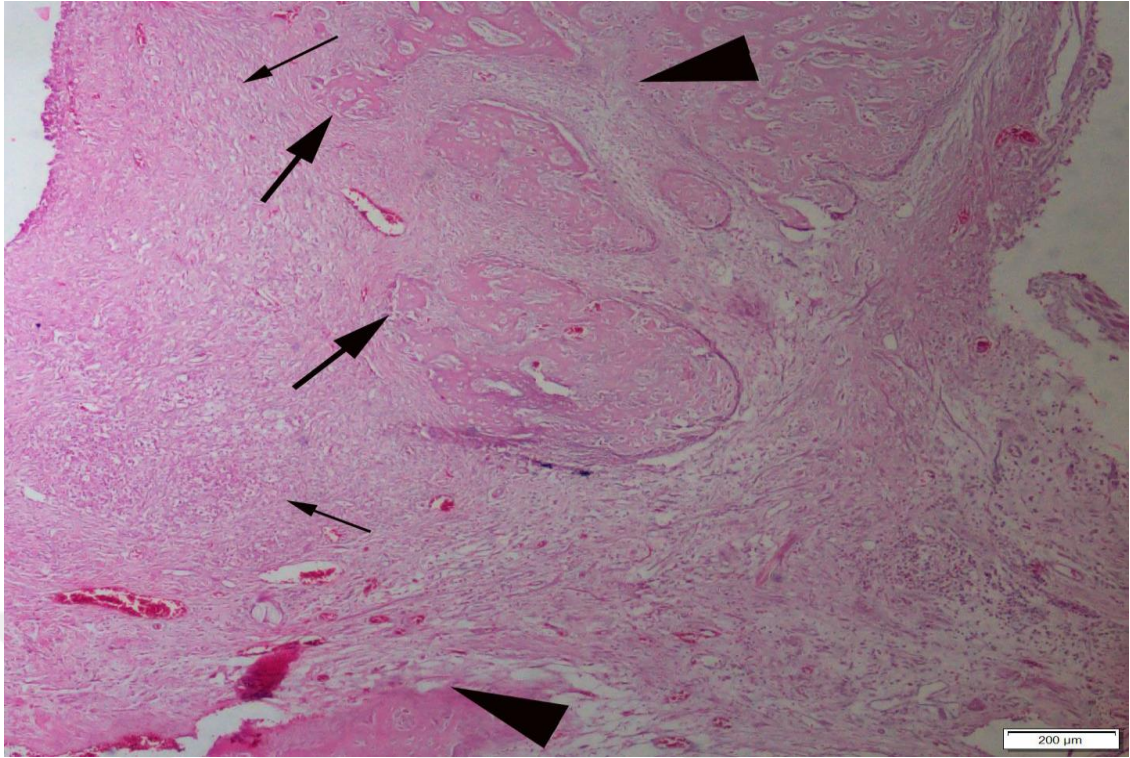


Şekil 4.5 Ksenogreft-Tideglusib grubundaki bir ratın defekt bölgesinin görünümü (ok başları), bağ doku (ince ok), kemikleşme bölgeleri (kalın ok), kıkırdak oluşumları (beyaz ok), HE, Bar=100µm.

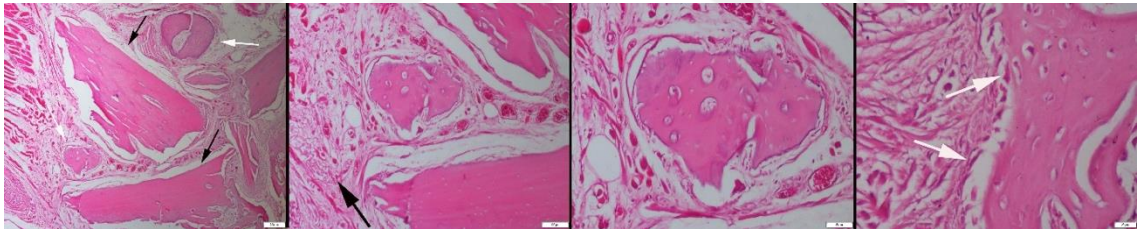


Şekil 4.6 Ksenogreft- Tideglusib grubundaki bir başka ratın defekt bölgesinin değişik büyütmelerdeki görünümü

He. (A) defekt alanında kemikleşme alanları (kalın ok) ve greft kalıntıları (ince oklar) oklar, bar= 200µm. (b) defekt bölgesinde greft kalıntıları çevresindeki bağ doku (beyaz ok), bar= 100µm. (c) greft kalıntılarının büyük büyütmedeki görünümü ve çevresinde bağ doku (beyaz ok), bar= 50µm. (d) bağ dokunun yakından görünümü (beyaz ok), bar= 20µm.

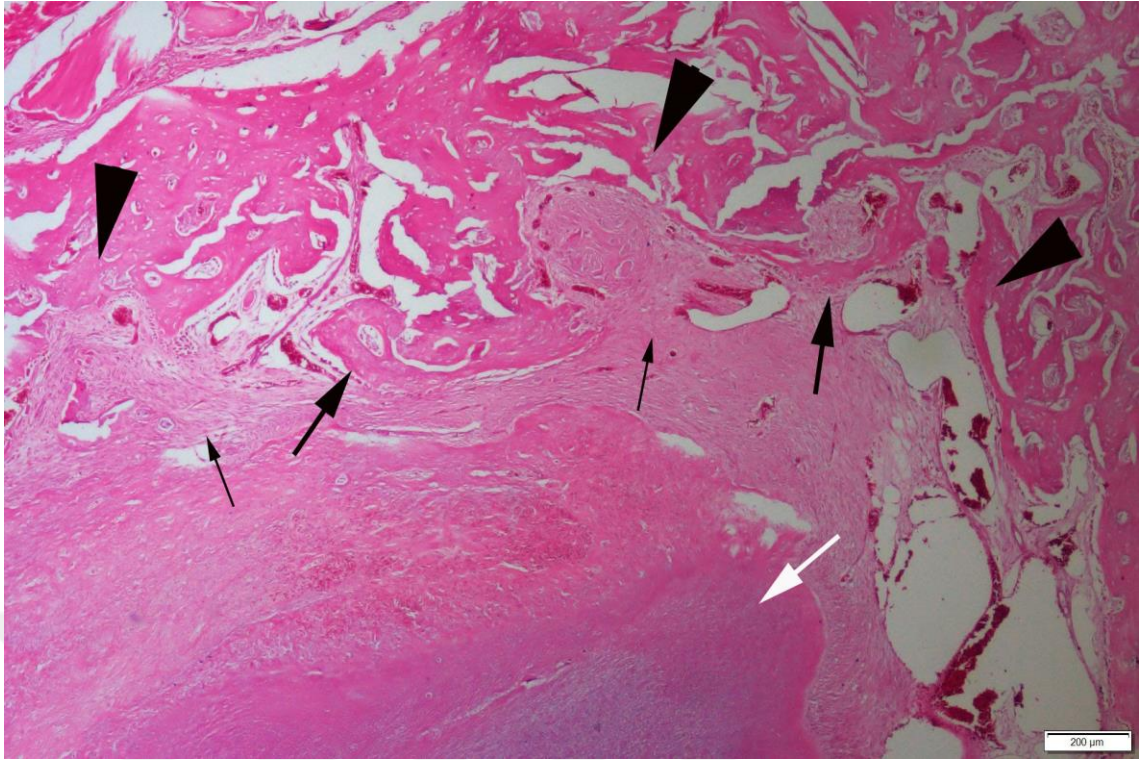


Şekil 4.7 Otojen grubundaki bir ratın defekt bölgesinin görünümü (ok başları), bağ doku (ince ok), ve kemikleşme bölgeleri (kalın ok), HE, Bar=100µm.

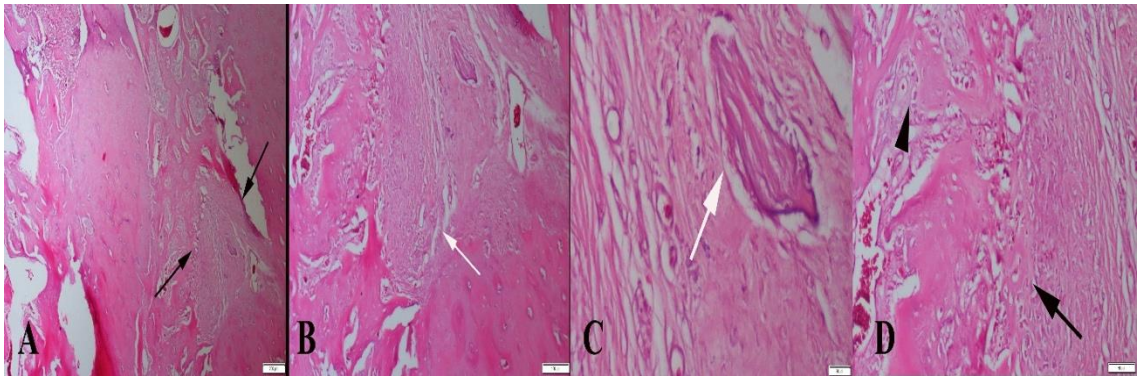


Şekil 4.8 Otojen grubundaki bir başka ratın defekt bölgesinin değişik büyütmelelerdeki görünümü

HE. (A) defekt alanında greft kalıntıları (siyah oklar) ve yeni kemik gelişimi alanları (beyaz ok), Bar= 200µm. (B) defekt bölgesinin büyük büyütmedeki görünümü, Bar= 100µm. (C) defekt bölgesindeki kemik oluşumunun büyük büyütmedeki görünümü, Bar= 50µm. (D) kemik oluşum sınırındaki osteoklastlar (beyaz ok), Bar= 20µm



Şekil 4.9 Otojen-Tideglusib grubundaki bir ratın defekt bölgesinin görünümü (ok başları), bağ doku (ince ok), kemikleşme bölgeleri (kalın ok) ve kıkırdak gelişim alanları (beyaz ok), HE, Bar=100µm.



Şekil 4.10 Otojen-Tideglusib grubundaki bir başka ratın defekt bölgesinin değişik büyütmelerdeki görünümü

HE. (A) defekt alanı (siyah oklar), bar= 200µm. (b) defekt bölgesinin büyük büyütmadaki görünümü ve bağ doku üremeleri (beyaz ok), bar= 100µm. (c) defekt bölgesindeki büyük bölümü absorbe edilmiş greft materyali (beyaz ok), bar= 50µm. (d) kemik oluşum sınırındaki kemik üremeleri (oklar) ve osteoklastlar (ok başı), bar= 20µm.

Tablo 4.1 Histomorfik verilerin istatistik analiz sonuçları

Total iyileşme alanı (mm ²)	Kontrol	1.77 ±0.58 ^a
	Grup 1	8.81±0.54 ^b
	Grup 2	9.69 ±0.79 ^c
	Grup 3	9.78 ±0.32 ^c
	Grup 4	11.74 ±0.52 ^d
Defekt Kapanma Oranı (%)	Kontrol	15.12 ±2.58 ^a
	Grup 1	54.22 ±4.79 ^b
	Grup 2	65.00 ±2.87 ^c
	Grup 3	59.12 ±5.19 ^d
	Grup 4	69.57 ±1.27 ^e
Yeni Kemik Alanı (mm ²)	Kontrol	0.23 ±0.07 ^a
	Grup 1	1.09 ±0.16 ^b
	Grup 2	1.37 ±0.13 ^c
	Grup 3	1.23 ±0.15 ^d
	Grup 4	1.65 ±0.09 ^e
Rezidüel materyal alanı (mm ²)	Kontrol	0.00 ±0.00 ^a
	Grup 1	18.66 ±1.73 ^b
	Grup 2	15.87±0.83 ^c
	Grup 3	15.00 ±3.02 ^c
	Grup 4	10.28 ±1.79 ^d

Devamı arkada

Osteoklast sayısı	Kontrol	6.37±1.50 ^a
	Grup 1	10.88 ±0.78 ^b
	Grup 2	12.62 ±0.91 ^c
	Grup 3	11.00 ±1.30 ^b
	Grup 4	11.60 ±1.81 ^d
Osteoblast sayısı	Kontrol	10.37 ±0.91 ^a
	Grup 1	15.33 ±1.32 ^b
	Grup 2	16.1±1.35 ^b
	Grup 3	15.8 ±2.35 ^b
	Grup 4	21.42 ±2.43 ^c

* Veriler ortalama±standart sapma (SS) olarak verilmiştir. İstatistik analizlerde One-way anova Duncan Testi kullanılmıştır.

** Aynı harften üst simgeli gruplar benzer farklı olanlar istatistik olarak önemli derecede farklı, P<0.001.

4.2.1 Osteoblastların Değerlendirilmesi

Gruplara ait yeni oluşan kemik alanı, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (Tablo 4.1). Kontrol grubuna ve diğer gruplara nazaran otojen-tideglusib grubunda osteoblast sayısında ciddi artış gözlenmiştir.

4.2.2 Osteoklastların Değerlendirilmesi

Gruplara ait yeni oluşan kemik alanı, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak

anlamli bulunmuştur. Osteoklastik aktivite en fazla ksenojen grupta gözlenmiştir (Tablo 4.1).

4.2.3 Yeni Kemik Alanının Değerlendirilmesi

Gruplara ait yeni oluşan kemik alanı, görüntü analiz programı kullanılarak ölçüldü. Elde edilen sayılar karşılaştırıldığında gruplar arasındaki fark istatistik olarak anlamlı bulunmuştur. Yeni kemik oluşumu en fazla otojen-tideglusib grubunda gözlenirken bunu sırasıyla ksenojen, ksenojen-tideglusib, otojen ve kontrol grupları izlemiştir (Tablo 4.1).

4.3 İmmunohistokimyasal Bulgular

İmmunohistokimyasal incelemelerde defekt bölgesinde hem BMP-2 hem de VEGF' nin gruplara göre değişik miktarlarda eksprese edildiği gözlenmiştir. Hem BMP-2 hem de VEGF en fazla olarak otojen-tideglusib grubunda eksprese edildiği görülmüştür (Şekil 4.11- 4.20). İmmunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları Tablo 4.2' de gösterilmiştir.

4.3.1 AntiVEGF ile Boyanan Hücre Sayısı

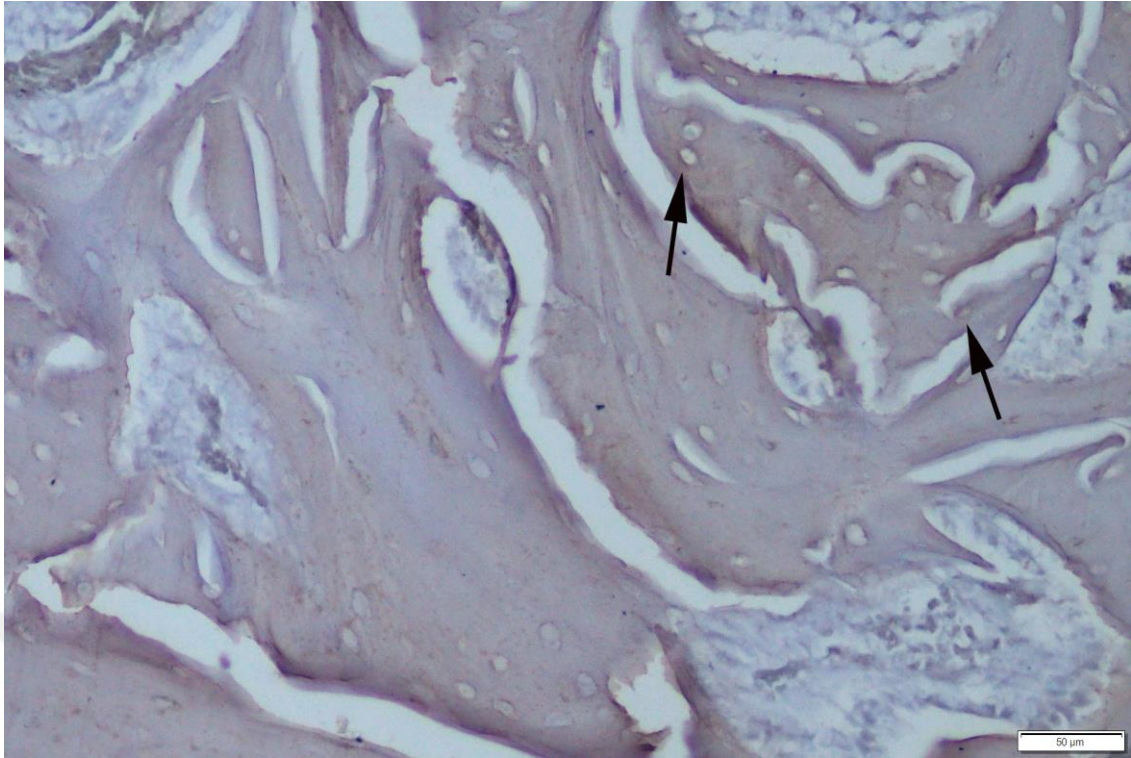
En belirgin immunoreaksiyon otojen-tideglusib grubunda gözlenmiştir.

Tablo 4.2 İmmunohistokimyasal skorların istatistik analiz sonuçları analiz sonuçları

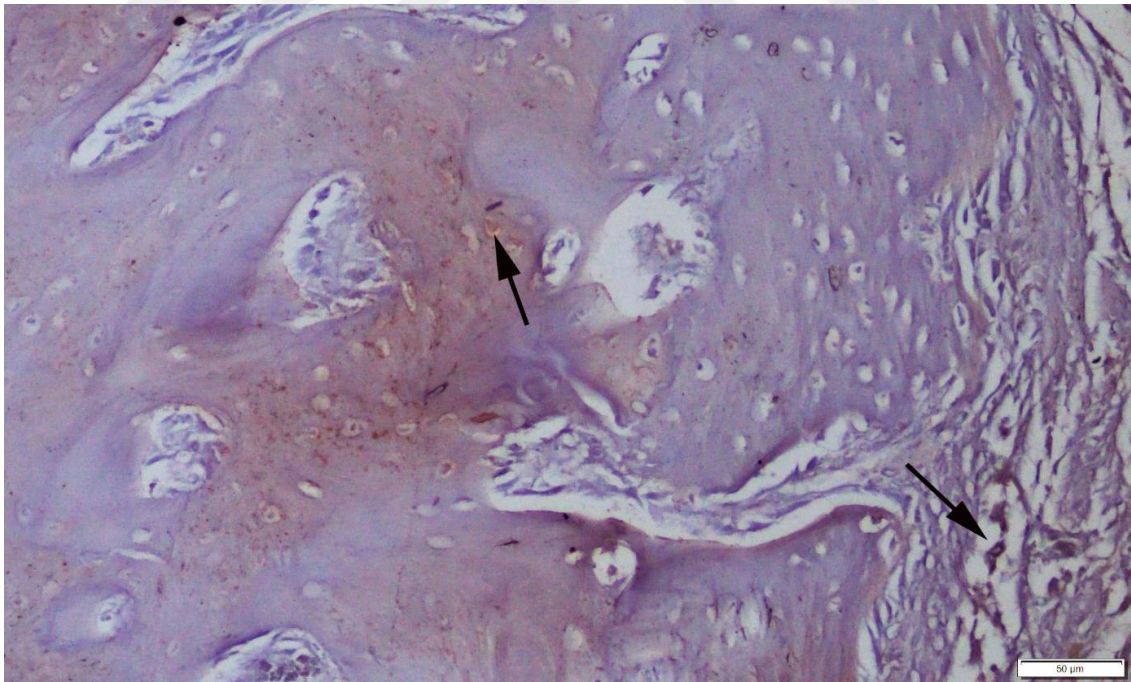
Gruplar	BMP-2	VEGF
Kontrol	1.12 ±0.35 ^a	1.50 ±0.53 ^a
Grup 1	1.44 ±0.52 ^{ab}	1.55 ±0.52 ^a
Grup 2	1.75 ±0.46 ^b	1.37 ±0.51 ^a
Grup 3	1.87 ±0.35 ^b	2.37 ±0.51 ^b
Grup 4	2.57 ±0.53 ^c	2.57 ±0.53 ^b

* Veriler ortalama±standart sapma (SS) olarak verilmiştir. İstatistik analizlerde One-way anova DuncanTesti kullanılmıştır.

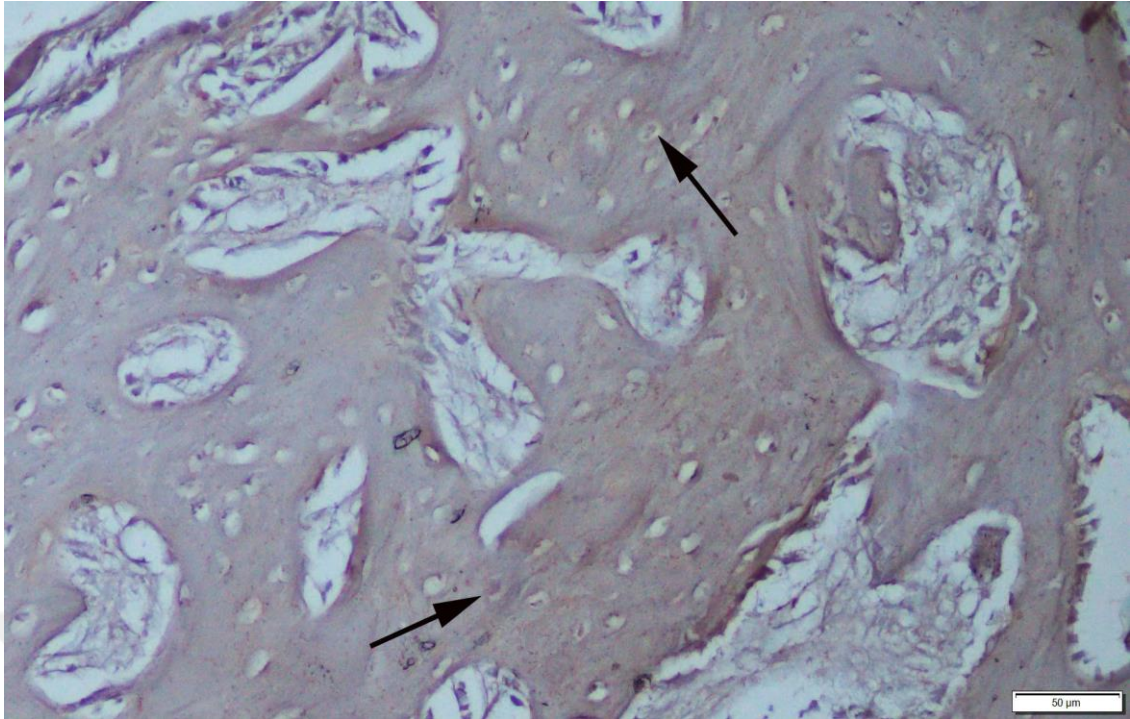
** Aynı haftten üst simgeli gruplar benzer farklı olanlar istatistik olarak önemli derecede farklı, P<0.001.



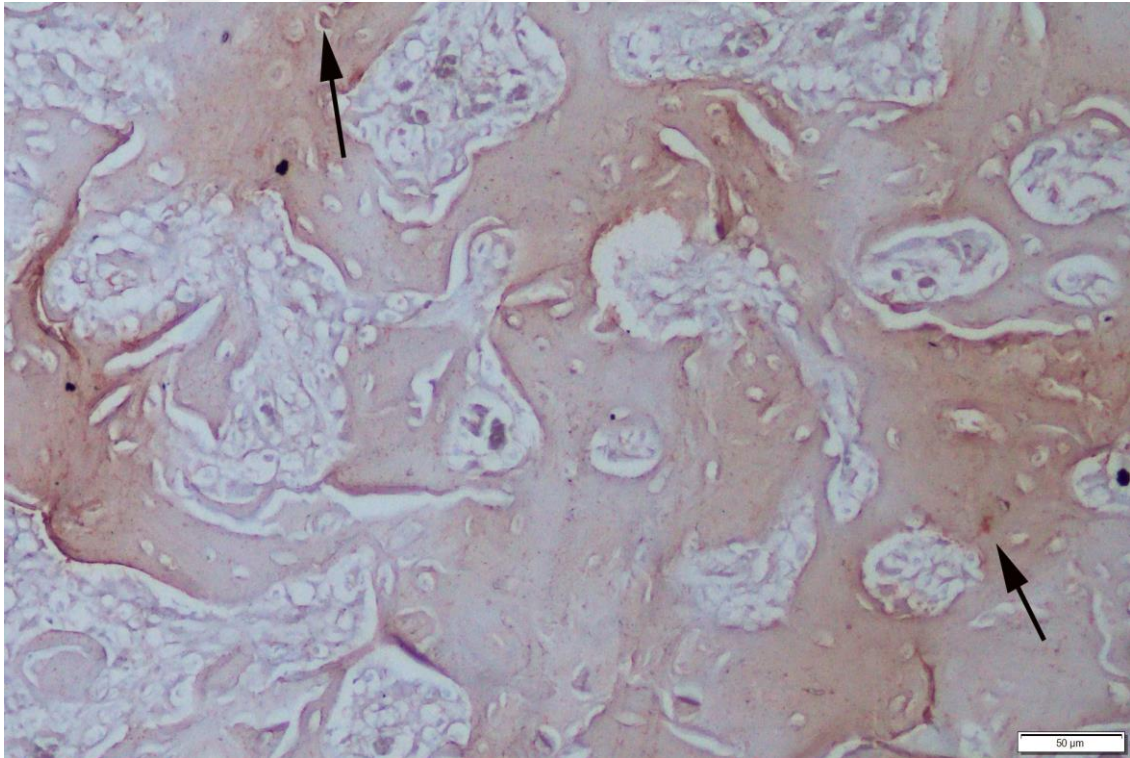
Şekil 4.11 Kontrol grubundaki bir ratin defekt bölgesinde hafif şiddette pozitif VEGF immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µM.



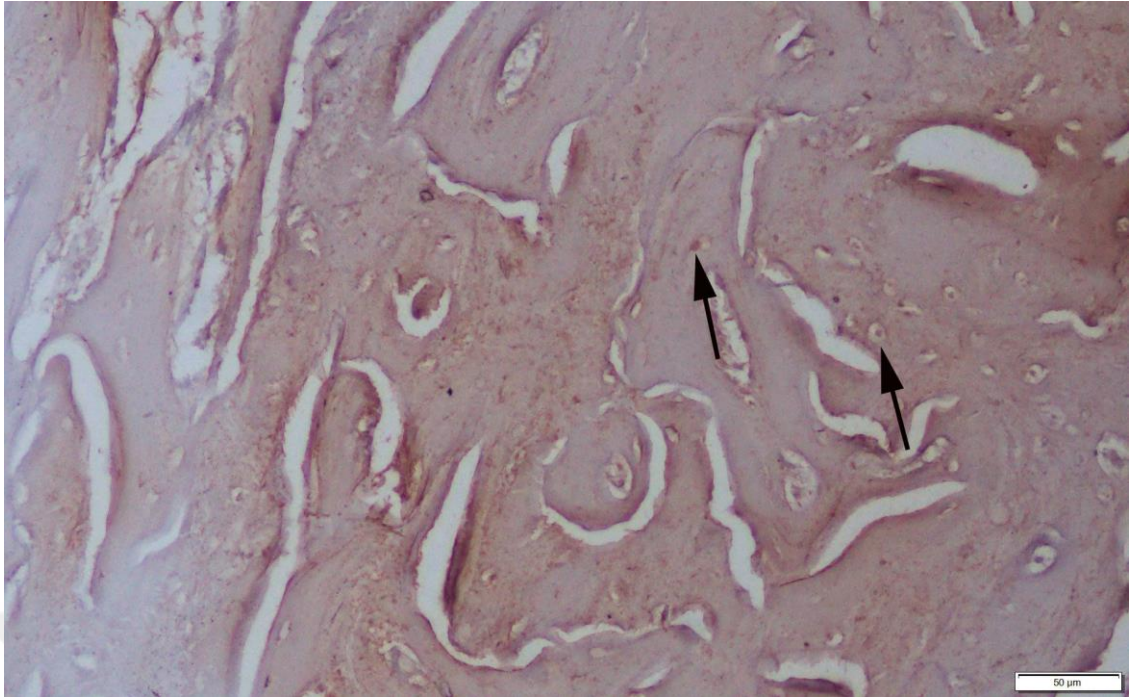
Şekil 4.12 Ksenogreft grubundaki bir ratin defekt bölgesinde orta şiddette pozitif VEGF immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µM.



Şekil 4.13 Ksenogreft-Tideglusib grubunda bir ratın defekt bölgesinde orta şiddette pozitif VEGF immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µm.



Şekil 4.14 Otojen grubundaki bir ratın defekt bölgesinde orta şiddette pozitif VEGF immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µm.

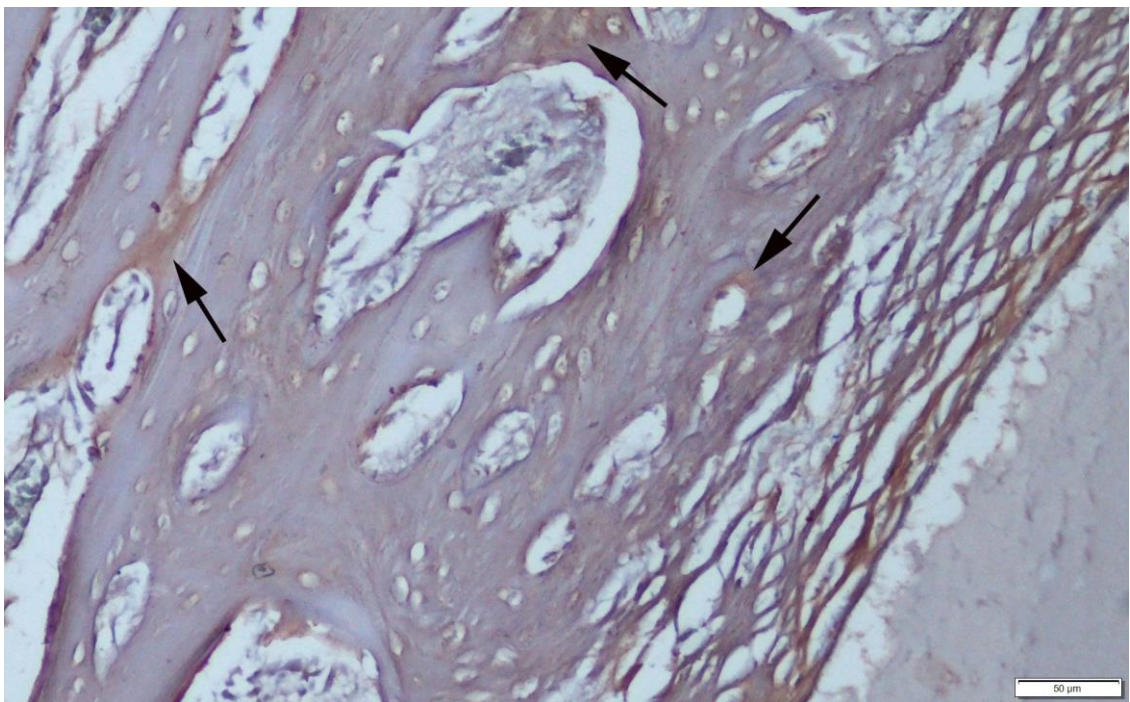


Şekil 4.15 Otojen-Tideglusib grubundaki bir ratın defekt bölgesinde orta şiddette pozitif VEGF immunreaksiyonu

(oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µM.

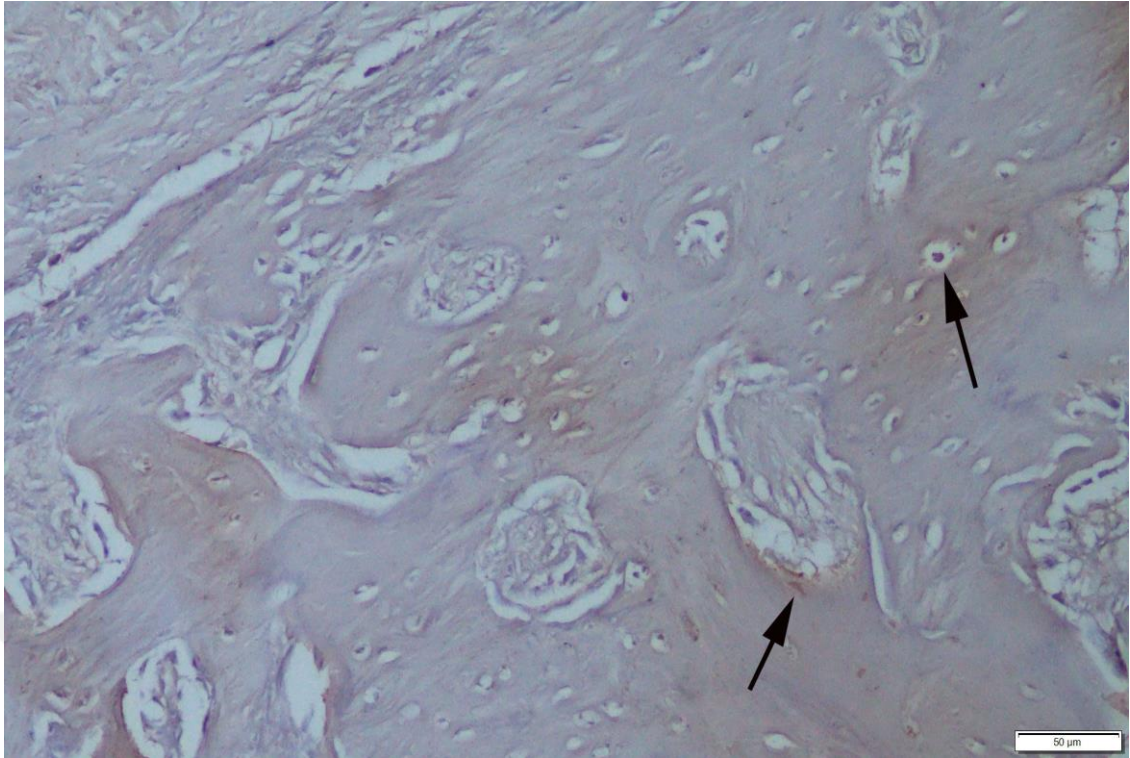
4.3.2 AntiBMP-2 ile Boyanan Hücre Sayısı

Hücrelerde ve matriste belirgin reaksiyonlar gözlemlendi. En belirgin BMP-2 ekspresyonu Otojen-Tideglusib grubunda gözlemlendi.

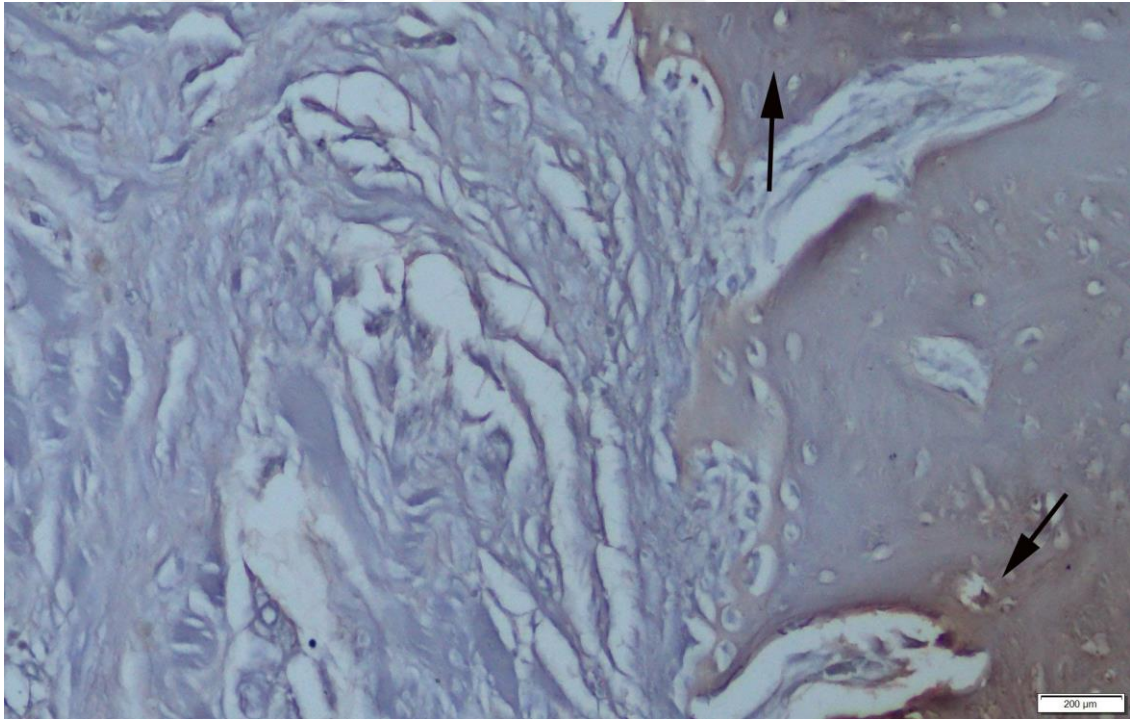


Şekil 4.16 Kontrol grubundaki bir ratın defekt bölgesinde hafif şiddette pozitif BMP-2 immunreaksiyonu

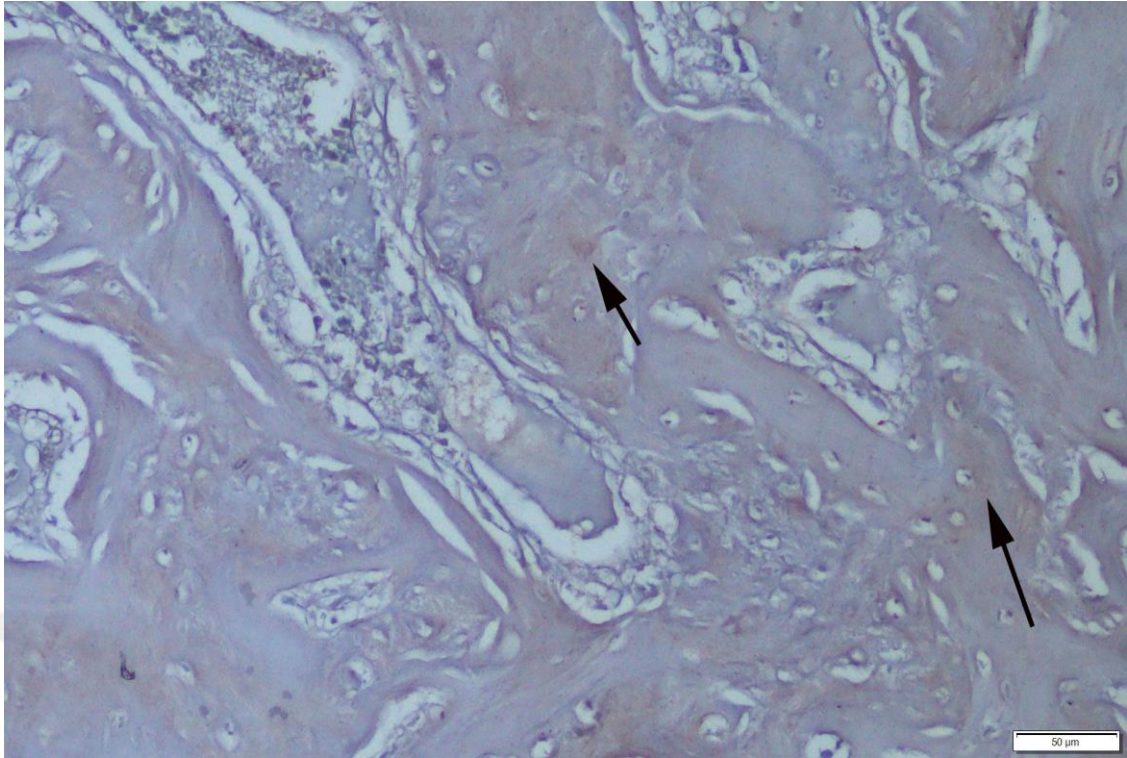
(oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µM.



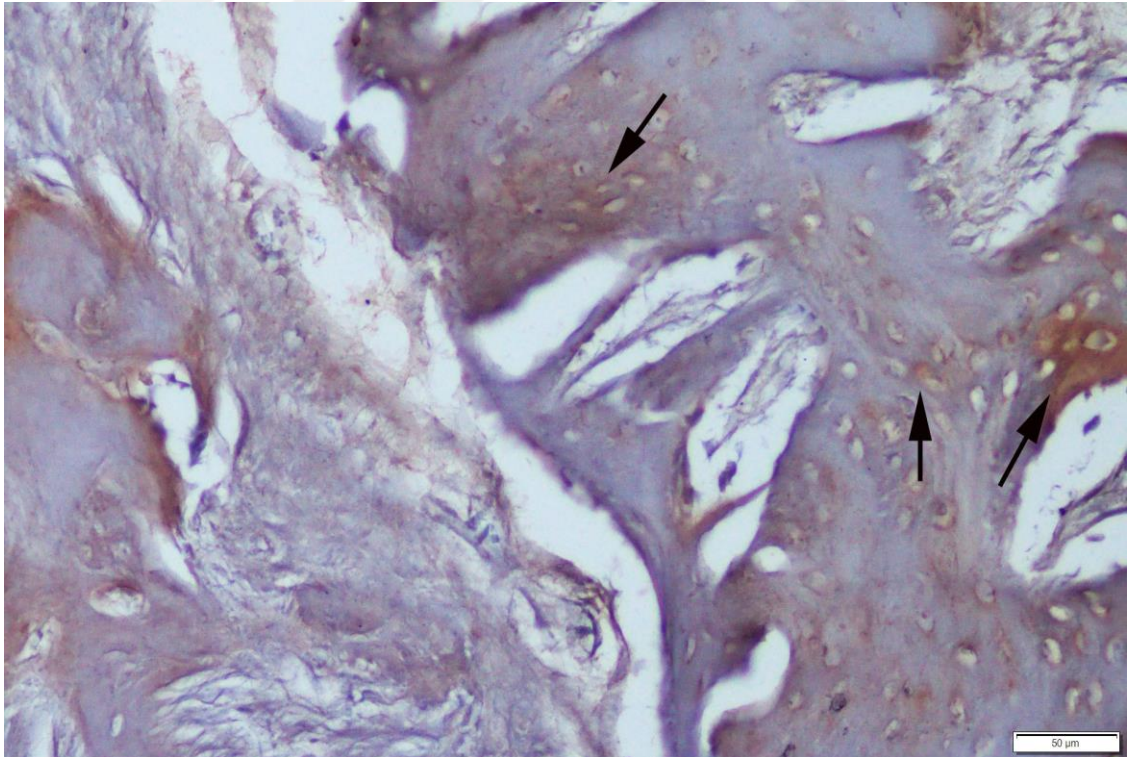
Şekil 4.17 Ksenogreft grubundaki bir ratın defekt bölgesinde hafif BMP-2 pozitif immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µm.



Şekil 4.18 Ksenogreft-Tideglusib grubundaki bir ratın defekt bölgesinde orta şiddette BMP-2 pozitif immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50µm.



Şekil 4.19 Otojen grubundaki bir ratin defekt bölgesinde orta şiddette BMP-2 pozitif immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50μM.



Şekil 4.20 Otojen-Tideglusib grubunda bir ratin defekt bölgesinde şiddetli BMP-2 pozitif immunreaksiyonu (oklar), Streptavidin biyotin peroksidaz yöntemi, Bar=50μm.

5. TARTIŞMA

Kritik boyutlu defekt bir hayvanda herhangi bir osteopromotif materyal kullanılmadan yaşam boyu spontan olarak kemik dolumu göstermeyen en küçük boyutlu kemik yarası olarak tanımlanmıştır (Schmitz vd. 1990). Bu tip defektler kemik dolumundan çok, fibröz bağ dokusuyla iyileşme eğilimi göstermektedirler.

Takagi ve Urist (Takagi 1982), 6 aylık Srague Dawley ratlarda 8 mm'lik defektler açıp, sonuçları histolojik yönden değerlendirmişlerdir. Defektlerin kemik iyileşmeyle, çaplarının 5 mm' ye düştüğü gözlenmiştir. Bu iyileşmede daha çok kemik marjinde başlayarak defektin merkezine doğru uzandığı ifade edilmiştir. Defektlerin merkezi ise fibröz bağ dokusuyla iyileşme göstermiştir. Halbuki BMP uygulanmış deney defektlerinde neredeyse tam bir iyileşme bulunmuştur.

Bosch ve ark. (Bosch vd. 1998) erişkin ratlarda 5mm' lik defekti kritik boyutta defekt olarak tanımlamışlar ve 12 ayın sonunda defekt marjinlerinde kemik rejenerasyonu görülse de, spontan iyileşme gerçekleşmemiştir.

Literatürde ratlar için kritik boyutlu defekt 5 veya 8mm olarak yer almaktadır (Freeman vd. 1973). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, ratların mandibulasında 5mm çapında kritik boyutta defektler açılmıştır.

Kemik hücrelerini, aktivitelerini ve kemik matriksini in situ olarak direkt değerlendirilebilen tek yöntem histomorfometri olduğu için, kemik dokusunu değerlendirmede altın standart olarak kabul edilir (Iwaniec vd. 2008). Çalışmamızda, hücre sayısındaki değişiklikleri incelemek amacıyla örnekler histomorfometrik olarak değerlendirilmiştir.

Bizim çalışmamızın histomorfometrik verilerinin istatistik sonuçlarına göre, otojen ve ksenojen greft kullanılan gruplar total iyileşme oranı, defekt kapanma oranı, yeni kemik alanı, osteblast sayısı açısından kıyaslandığında otojen kemik greftin ksenojene oranla daha avantajlı olduğu görülmüştür (Tablo 4.1). Tüm bu parametreler açısından tideglusibin kombine kullanıldığı gruplarda diğer gruplara nazaran anlamlı derecede bir artış söz konusudur.

Çalışmamızda greft partikülleri deney süresince rezorpsiyon göstermiş olup, en fazla osteoklastik aktivite otojen-tideglusib grubunda gözlenirken, en az osteoklastik aktivite sırasıyla kontrol ve ksenojen grupta gözlenmiştir. Yine bu durumla tutarlı bir

şekilde rezidüel greft miktarı en fazla ksenojen, en az otojen-tideglusib grubunda gözlenmiştir. Otojen greft ve ksenogreft kullanılan gruplarda greft komşuluğunda yeni kemik oluşumunda artış gözlenmiştir. Fakat bu greftlerle birlikte tideglusib kullanılan gruplarda yeni kemik oluşumunda artış ciddi oranda fazla gözlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkarak tideglusibin greftlerin etkisini sinerjistik bir şekilde arttırdığını söyleyebiliriz.

Kemik remodelasyonu döngüsünde osteoblastlar kemik formasyonu aşamasında aktif rol oynarlar fakat mineralizasyon aşamasında ise kemiğin içinde kalarak osteositlere dönüşürler ve matür kemik içinde çoğalamazlar (McCauley 2002). Bizim çalışmamızda 28. Günde osteoblastik aktivite, en az kontrol grubunda gözlenirken, sırasıyla en fazla otojen-tideglusib, ksenojen-tideglusib, otojen ve ksenojen olmak üzere artış gözlemlenmiştir (Tablo 2). Bu durum kemiğin normal remodelasyon süreci ile uyumludur ve histolojik olarak da matür kemik oluşumu ile desteklenmiştir. Bununla beraber yeni kemik alanı en fazla otojen-tideglusib grubunda oluşurken bunu ikinci olarak ksenojen-tideglusib grubu izlemektedir. En az yeni kemik alan oluşumu kontrol grubunda gözlenmiştir. Defekt kapanma oranlarına bakıldığında en az kapanma oranı kontrol grubunda gözlenirken, en fazla defekt kapanma oranı otojen-tideglusib grubunda olup, bunu ksenojen-tideglusib grubu izlemektedir.

Oral ve maksillofasiyal cerrahi çeşitli kist, tümör, ileri implant cerrahileri, travma, kronik enfeksiyon gibi kazanılmış ya da konjenital defeklerin tedavisinde kemik doku ile ilgili yeni yaklaşımlara ihtiyaç duymaktadır. Bu ihtiyaç kemik dokunun defekt bölgesinde uygun zaman diliminde, istenilen formda oluşmasını temin etmek şeklindedir.

Kemik doku çalışmaları klinisyenlerin ihtiyaçları göz önünde bulundurularak daha etkin tedavi yöntemleri geliştirmeyi amaçlamaktadır. Temel olarak bu çalışmaların amacı halen kliniklerde kullanılmakta olan tedavi yöntemlerinin dezavantajlarını ortadan kaldırmak ve klinisyenlerin işini kolaylaştırmak için çözümler aramaktır (Amini vd. 2012). Bu çalışmalar kemik doku fonksiyonunun yeniden temini, idamesi ve şekillenmesi için biyolojik malzeme ve çözümler üreterek bu konuda umut vaat etmektedir. Bu yaklaşımın asıl amacı, doğal kemik dokusunun fiziksel ve biyolojik özellikleri ile uyuşan materyaller oluşturmaktır (Moshaverinia vd. 2013).

Günümüzde çeşitli nedenlerle oluşan kemik defektleri genellikle otojen kemik greftleri ile tedavi edilmektedir. Otojen greftler osteoprogenitör hücreler için kaynak sağlayıp (osteogenezis), çevreleyen doku ile bu hücreleri indükler (osteoinduksiyon) ve damarlanma ve kemik oluşumu için mekanik destek (osteokondüksiyon) sağlarlar. (Bigam vd. 2008). Yüksek osteojenitesi, minimal antikor cevabı geliştirmesi, kısa sürede en mükemmel damarlanma ve primer kallus oluşumu sağlaması gibi özellikleriyle otojen greftler kemik greftlerinde altın standardı oluştururlar (Çakır 2009).

Fakat bu greftin en önemli dezavantajlarından biri olan rezorpsiyon klinik sonuçları etkileyebilmektedir (Gorla vd. 2015).

Jardini ve ark. (Jardini vd. 2005) yaptıkları çalışmada otojen blok kemik grefti kalvaryumdan alarak mandibulaya yerleştirmiştir. Bu çalışmada alınan kalvaryal kemik greftin embriyojenik olarak mandibular kemikle benzer özelliklere sahip olduğu, rezorpsiyon ve kontur uyumu açısından iliak greftlere göre daha avantajlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ayrıca mandibuladan alınan kemik greftte vasküler yatak gelişiminin iliak grefte göre daha hızlı olduğu belirtilmiştir (Tezulaş 2007).

Çalışmamızda da tüm bu özellikler ve kalvaryumdan alınan greftle benzer özellik göstermesi sebebiyle greft olarak mandibuladan alınan otojen kemik grefti tercih edilmiştir.

Ksenogreftlerin osteoindüktif kapasiteleri literatürde tartışmalı olup, Torricelli ve ark. (Torricelli vd. 1999) ratlarda yaptıkları çalışmaya göre ksenojenik kemik matriksin iskeletsel yaralanmalarda osteoindüksiyonu ve osteogenezisi artırdığını gözlemlemişlerdir. Oysa bu konudaki genel kanı sığır kaynaklı ksenogreftlerin yavaş rezorbe olan, apatit kristalleri arasındaki mikroporları ve mikropartikülleri aracılığıyla organik bir iskelet sağlayan, osteokondüktif özellikteki biyomateryaller olduğu yönünde baskındır. Mikroporlar ve mikropartiküller kan hücreleri ve osteoblast migrasyonuna ortam hazırlayarak bu materyale yüksek osteokondüktif özellik kazandırmaktadır (Pogrel 2014).

Aksine yine literatüre bakıldığında Bigham ve ark. (Bigham et al. 2011) ratlarda yaptıkları bir çalışmada sığır kaynaklı ksenojenik grefti external ve internal abdominal oblik kaslar arasına submukozal olarak yerleştirip ektopik osteoindüktif özelliklerini incelemişlerdir. Çalışmanın radyolojik ve histolojik sonuçlarına göre ksenojenik greftin ektopik kemik oluşumunu sağladığını ve herhangi bir komplikasyona neden olmadığını rapor etmişlerdir.

Lambert ve ark. (Lambert vd. 2011) yaptıkları tavşan çalışmasında, sinüs ogmentasyonunda sığır kaynaklı ksenogreft ve otojen greft kullanımını karşılaştırmışlardır. Maksiller sinüslerinin üst kemik duvarında defekt oluşturup, greft uygulamışlar, örnekleri histolojik ve histomorfometrik olarak değerlendirmişlerdir. 6. ayda otojen greft uygulanan bölgede kemik dansitesinin daha düşük olduğu görülmüştür. Sinüs membranı ve osteoid dokunun altında osteoklastların varlığı saptanmıştır. 6. ayda sığır kaynaklı ksenogreft uygulanan bölgede sıklıkta kemik iliği oluşumu görülmüş, osteoklastlara rastlanılmamıştır. 6. ayda yeni kemik oluşumunun otojen greft uygulanan bölgelerde sığır kaynaklı ksenogreft uygulanan bölgeye kıyasla daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Otojen greft uygulanan bölgede greft hacminde sığır kaynaklı ksenogreft uygulanan bölgeye nazaran daha fazla azalma olduğu

gözlenmiştir. Çalışmanın sonucuna göre sığır kaynaklı ksenogreftin yavaş rezorbe olan osteokondüktif bir materyal olduğu bildirilmiştir.

Öte yandan sığır kaynaklı ksenogreftlerin rezorpsiyon süreleri ile ilgili literatürde çelişkili sonuçlar bulunmuştur. Bazı çalışmalar ksenogreftin rezorbe olmayıp, greft etrafında yeni kemik oluşumu meydana geldiği tespit edilirken, bazı çalışmalarda ise aylar sonra bile osteoklast varlığı bulunmuştur (Sartori vd. 2003). Bulunan osteoklastların grefti rezorbe ederek, aktif kemik remodelasyonunu devam ettirdiği savunulmuştur (Cunha vd. 2014).

Sığır kaynaklı ksenogreft ve mine matriks proteini kombinasyonu ile yapılan bir çalışmada Velasquez-Plata ve ark. (Velasquez-Plata et al. 2002), bu kombinasyonunun, sadece mine matriks proteinine göre daha fazla kemik dolumu gerçekleştirdiğini rapor etmiştir. Yine aynı araştırmacılar, ksenogreft ve mine matriks proteini kombinasyonunun etkinliğini, sadece ksenogreft ile karşılaştırmışlar, iki teknikte de eşit sayılabilecek düzeyde kemik dolumu elde etmişlerdir. Otörler bu çalışmaların sonucunda sığır kaynaklı ksenogreftin sert doku rejenerasyonunda mine matriks proteini kadar etkin olduğunu savunmuşlardır.

Yukarıda bahsedilen çalışmalara zıt olarak, sığır kaynaklı greft materyallerinin kemik iyileşmesine katkısının olmadığını belirten çalışmalar da literatürde yer almıştır (Develioğlu vd. 2009). Bu çalışmalarda greft partiküllerinin kemikten ayrı bir şekilde ve bağ doku tarafından enkapsüle olduğu ayrıca osteokondüktif etki de göstermediği vurgulanmıştır.

Pinholt ve ark.(Pinholt vd. 1991) ratlarda yaptıkları bir çalışmada sığır kaynaklı ksenojen greftlerin osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklerini incelemek istemişler ve bu sebeple ratlara supperiosteal olarak ksenojen greft uygulaması yapmışlardır. Çalışmanın sonunda ışın mikroskobu değerlendirmesinde bu kemik greftin sinterize ve sinterize olmayan formunda osteokondüksiyon ve osteoindüksiyon özelliğine rastlanılmamıştır.

Yapılan bir çalışmaya göre deproteinize sığır kaynaklı kemik greftlerin hem tek başına hem mine matriks grefti ile birlikte uygulandığında ektopik kemik oluşumunu sağlamada yetersiz olduğunu belirtilmiştir. (Donos vd. 2006). Bizim çalışmamızda da ksenogreft grubu; total kemikleşme oranı, yeni kemik alanı, defekt kapanma oranı ve osteoblastik aktivite açısından değerlendirildiğinde ksenojen-tideglusib grubu ve diğer gruplara kıyasla yetersiz görülmüştür. Bu durum literatürdeki benzer çalışmalarla tutarlılık sergilemektedir.

Dentin dokusunun osteoindüktif ve osteokondüktif etkisini gösteren çalışmalara rastlanılmaktadır. Urist ve ark. (Ike ve Urist 1998) yapmış oldukları çalışmada

demineralize dentinin tıpkı kemik dokuda olduğu gibi BMP proteinlerine sahip olduğunu göstermişlerdir.

Ayrıca son zamanlarda araştırmacıların ilgi odağı haline gelen diş greftler ya da diğer adıyla dentin greftler otojen kemik greftlere benzer özellikler gösterdikleri rapor edilmektedir. Kızıldağ ve ark (Kızıldağ vd. 2019) yaptıkları çalışmada dentin greftlerinin defekt rekonstrüksiyonunda kullanılabileceğini ve BMP salınımı yapılabildiğini göstermişlerdir.

Literatürdeki bir çok çalışmaya göre insan kaynaklı dentin dokusu, içerdiği doğal BMP gibi büyüme faktörleri sebebiyle osteoindüktif etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir (Ike ve Urist 1998; Steiglitz vd. 2004).

Kamal ve ark. (Kamal vd. 2017) tavşanlarda alveoler defekt tamiri ile ilgili yaptıkları bir çalışmada ksenojenik dentin grefti kullanmışlar ve sonuç olarak dentin greftlerin kemik hacmi, kemik densitesi açısından üstün olduğunu göstermişlerdir.

Tavşanlarda yapılan diğer çalışmalar ksenojenik dentin blok greftlerin alıcı kemik doku ile entegre olup zamanla minimal enflamatuar reaksiyonla yeni kemik dokuya dönüştüğünü göstermektedir (Andersson vd. 2009; Andersson 2010). Bu da dentin greftlerin osteoindüktif ve osteokondüktif etkilere sahip olduğunu göstermektedir.

BMP 'nin klinik kullanımına ilgi her geçen gün artsa da direkt uygulamalarında asıl sorun hızlı salınımıdır. Bu sebeple dentin greftler BMP 'nin yavaş salınımını sağlayıp, osteoindüktif etkisini artırdığı düşünülmektedir (Andersson 2010). Daha önceden yapılmış bir çalışmada dentin dokusuna Wnt yolağı üzerinden olumlu etki eden tideglusibin (Neves vd. 2017), bizim çalışmamızın sonuçlarına göre de kemik oluşumunu BMP ve VEGF salınımını indükleyerek artırması literatürle tutarlılık göstermektedir.

Tüm bu bilgiler ışığında, otojen kemik greftlerin donör saha morbitidesi, hızlı rezorbe oluşu ile sığır kaynaklı greftlerin osteoindüksiyon özelliğinin olmayışı ve BMP salınımını indükleyememesi bu greft materyallerinin dezavantajlarıdır. Literatüre göre diş greftler osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon özelliğine sahip olmaları ve BMP gibi büyüme faktörlerinin salınımını sağlayabilmeleri açısından otojen ve ksenojen greftlere üstün görülmeye başlanmış olup, son zamanlarda popülerlik kazanmaktadır.

Gelişen teknoloji ile birlikte görüntüleme teknikleri ve moleküler biyoloji alanındaki yenilikler paralel seyretmekte olup kemik dokuda meydana gelen iyileşme artık moleküler düzeyde değerlendirilebilmektedir. Bu sayede kemik dokudaki iyileşme oran ve hızının artırılması amacıyla; hücrel diferansiyasyon ve proliferasyonun, büyüme faktörlerinin salınımının, hücre içi ve hücreler arası yolların işleyişi ve kapasitelerinin artırılması hedeflenmektedir. Araştırmacılar materyallere ekledikleri bazı ilaçlar ile bu

etkiyi sağladıklarını belirtmektedirler. Bu sebeple alternatif ilaç çalışmalarına yoğun bir ilgi söz konusu olmaktadır.

Büyüme faktörleri kemik rejenerasyonu içinde bazı yolların düzenlenmesinde etkili olmaktadır. Büyüme faktörleri spesifik reseptörlerine bağlanarak, spesifik biyokimyasal yollar aracılığıyla hücre içi bazı olayları aktive eder ve benzer hücresel elemanların kemotaksisini sağlarlar. Literatüre göre, Wnt yolağı (Bergwitz vd. 2001; Fischer vd. 2002), TGF- β /BMP süperailisi (Hemmerich vd. 2006), notch sinyal yolağı (Schnabel vd. 2002), hedgehog proteinleri (Hooper ve Scott 2005) ve fibroblast büyüme faktörleri (FBF) (Ornitz ve Marie 2002) osteogenezde rol alan moleküler sinyal yollarıdır.

Wnt/ β Katenin yolağı osteoblast ve osteoklast farklılaşmasını denetleyerek postnatal kemik oluşumunu düzenler (Holmen vd. 2005). Yine bu yolk osteoblast ve kondrosit farklılaşmasını tetikleyerek fetüsün iskeletsel farklılaşma ve oluşumunda etkilidir (Seitz vd. 2017). Wnt/ β katenin yolağı sadece büyüme ve gelişimde değil aynı zamanda iskeletin olgunlaşması ve korunmasında da önem arz eder (Duan ve Bonewald 2016).

Tideglusib, thiazolidinedione ailesinin üyesi olup, GSK-3 β 'nın yarışmasız-geri dönüşsüz inhibitörüdür (Domínguez vd. 2012). Bu ilaç GSK-3 β 'yı inhibi ederek WNT/ β Katenin yolağını aktive eder (Arioka vd. 2014).

Çalışmamızın sonuçlarına göre tideglusib BMP-2 salınımı önemli ölçüde artırmaktadır. Aynı şekilde litaretürde BMP-2 salınımı aktive eden moleküller rapor edilmektedir. Bu moleküller arasında lityum klorid, sklerositin antibodileri, stronsiyum ranelat, simvastatin (LLP) bulunmaktadır. Bu moleküllerin etkisi de benzer veya farklı yollarla olabilir.

Lityum klorit, tıpkı tideglusib gibi GSK-3 β inhibitörlerindedir. Galli ve ark.(Galli vd. 2013) hidrofilik modSLA yüzeylerde lityum klorid aracılığıyla kanonik olan Wnt/ β katenin yolağının aktivasyonu ile osteoblast farklılaşmasının arttığını rapor etmişlerdir.

Yine Arioka ve ark.(Arioka vd. 2014) yaptıkları bir çalışmada lityumun ve diğer GSK 3 β inhibitörlerinin lokal uygulaması sonucunda osteoklastogenezin baskılanıp, osteoblastogenezin arttığını gözlemlemişlerdir.

Lityum klorit implant osteointegrasyonunu artıran, osteoporotik durumlarda kemik oluşumunu tetikleyen bir ilaç olması sebebiyle osteoporozlu hastalarda implant ve kemik kaybını azaltacak umut vadeden bir ilaç olarak düşünülmektedir.(Jin vd. 2017)

Neves ve ark.(Neves vd. 2017) yaptıkları çalışmada tideglusibin Wnt yolağı aracılığıyla dentin oluşumunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Embriyolojik olarak kemik ve diş nöral krestten köken alıp benzer inorganik ve organik içeriğe sahiptirler. Kemikte de olduğu gibi dentinin organik matriksi de %90 Tip I kollajen içerir. Tip I kollajen

osteojenik aktiviteyi indükleyerek, kemik oluşumu ve mineralizasyonunda önemli bir rol alır (Nanci ve Ten Cate). Bu çalışmadan yola çıkarak biz de tideglusibin aynı yolak aracılığıyla kemik oluşumunu arttırdığını düşünmekteyiz.

Vaskülarizasyon kemik rejenerasyonunda kritik bir öneme sahiptir. Yeni damar oluşumunu arttırır, kan dolaşımını hızlandırır. Osteojenik hücre oluşumunu ve kemiğin iyileşme potansiyelini arttırır. Ayrıca, VEGF kondrositler, osteoklastlar ve osteoblastlar üzerinde etki göstererek endrokondral kemik oluşumu ve kemik mineralizasyonunda da rol oynar (Gerber vd. 1999). VEGF, neovaskülarizasyonu (yeniden damarlanma) başlatarak, yeni oluşan damarlar aracılığıyla yara alanında osteoprogenitör hücrelerin farklılaşmasını, oksijen desteğini, büyüme faktörleri ve sitokinlerin sekresyonunu sağlar (Ferrara vd. 2003). Bu sitokinler endojen salgılanmakta olup özellikle Amerika başta olmak üzere Avrupa ülkelerinde BMP gibi sitokinler rekombinant olarak üretilerek deney hayvanları çalışmaları ve klinik uygulamalarda eksojen olarak kullanılmaktadır. Histolojik ve klinik gözlemlere göre rhBMP2 ile kemik defektlerinin 4-6 ay gibi bir sürede tamamen dolduğu gözlemlenmiştir (Boyne 2001). VEGF ise henüz çok yeni rekombinant uygulamaya sahiptir.

Literatürde bazı ilaçların tek başlarına ya da greftlerle kombinasyonu ile yapılan çalışmalarda BMP ve VEGF'nin salınımını eş zamanlı olarak arttırdıkları görülmüştür. Özellikle in vitro olarak yapılmış statinlerle ilgili çalışmalarda, statinlerin osteoblastik farklılaşma ve mineralizasyonu arttırdığını kanıtlayan çok sayıda çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda statinlerin osteoblastlar üzerine olan etkisini BMP-2 ve VEGF salınımlarını eş zamanlı olarak arttırarak sağladığı belirtilmektedir (Maeda vd. 2003; Maeda vd. 2004; Ruiz-Gaspa vd. 2007).

Liu ve ark. (Liu vd. 2009) simvastatinin; TGF- β 1, BMP-2 ve VEGF' nin mRNA (mitokondrial ribonükleik asit) ekspresyonuna olan etkisini değerlendirmek için ratlarda bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada ratların mandibuler kesici dişlerini çekip simvastatini sokete lokal olarak uygulamışlardır. Çalışmanın sonuna göre lokal simvastatin uygulamasının osteogeneziste etkili olan bu büyüme faktörlerinin salınımını arttırıp, alveoler kemik remodelingini indüklediğini rapor etmişlerdir.

Taşdemir ve ark.(Taşdemir vd. 2015) rifamisin ile dekontamine edilen otojen kemik greftin etkilerini değerlendirme amacıyla ratlarda bir çalışma yapmışlardır. 5mm çapında standart kemik greft sağ mandibula angulus bölgesinden alınıp, tükrükle kontamine edildikten sonra rifamisin ile dekontamine edilip onley greft olarak sol mandibulaya uygulanmıştır. Çalışmanın sonucuna göre rifamisin ile dekontamine edilen gruplarda BMP-2, VEGF ve osteoblast sayısında artış gözlemlenmiştir.

Almazin ve ark. (Almazin vd. 2009) minosiklinin ve doksisisiklinin kemik oluşumu üzerine etkilerini araştırma amacıyla yaptıkları in vitro çalışmaya göre, minosiklinin osteoblastların çoğalması üzerine sitotoksik etkisinin olmadığını, doksisisiklinin ise osteoblast farklılaşması ve maturasyonu üzerine olumlu etkisinin olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yapılan bir çalışmaya göre BMP, VEGF ve bFGF (basic Fibroblastic Growth Factor) 'nin düşük konsantrasyonlarda bile sinerjistik olarak osteojenik farklılaşmayı tetiklediği rapor edilmiştir (Wang vd. 2018).

Peng ve ark. (Peng vd. 2005) BMP-2' nin uygun dozda VEGF ile kombinasyonu ile kemik mineralizasyonunda etkili bir faktör olan tip I kolajen salınımını arttırarak kemik regenerasyonu indüklendiğini rapor etmişlerdir.

Zhang ve ark. (Zhang vd. 2011) VEGF'nin tek başına ve BMP-2 ile birlikte uygulandığında etkilerini gözlemek için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre tek başına VEGF 'nin kemik rejenerasyonunda yeterli olmadığını, BMP-2 ile birlikte uygulandığında kemik oluşumunu, yoğunluğunu ve hacmini arttırdığını gözlemlemişlerdir.

Samee ve ark. (Samee vd. 2008) insan periosteumunun VEGF ve BMP-2 stimülasyonu üzerine etkisini gözlemek için farelerde in vivo ve in vitro bir çalışma yapmışlardır. Çalışmanın sonucuna göre periosteal hücrelerden gen transferi ile VEGF ve BMP-2'nin sinerjistik olarak osteogenezisi indüklediğini savunmuşlardır. Bu sebeple BMP-2 ve VEGF kombinasyonunun kanlanmanın yeterli olduğu durumlarda kemik rejenerasyonunda etkili olabileceğini rapor etmişlerdir.

Literatüre bakıldığında bir çok çalışmada BMP-2, VEGF kombinasyonunun kemik oluşumunu uygun süre ve dozda; bifazik veya sinerjistik olarak arttırdığı söylenmektedir (Kempen vd. 2009) (Lin vd. 2014) (Schönmeyr vd. 2010).

Bundan yola çıkarak, BMP ve VEGF' nin kemik rejenerasyonu sırasında birbirlerini etkileyerek, birlikte salındıklarında tek başına yarattıkları etkiye kıyasla kemik iyileşmesi üzerine daha fazla olumlu etki gösterdikleri sonucunu çıkarabiliriz. Bizim çalışmamızda da tideglusib greft karışımı eş zamanlı olarak BMP ve VEGF salınımı arttırmıştır. Bundan yola çıkarak çalışmamızda bu iki büyüme faktörünün sinerjistik etkisi sebebiyle kemik iyileşmesinde ciddi oranda artış olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızın immunohistokimyasal sonuçlarına göre BMP-2 ve VEGF salınımı açısından otojen kemik greftin ksenojene oranla daha üstün olduğunu söyleyebiliriz (Tablo 4.2). Tüm bu değerler açısından her iki greft materyaline kıyasla tideglusibin ve bu greftlerle kombine uygulanması sonucunda, BMP-2 ve VEGF salınımında daha fazla bir artış sağladığını söyleyebiliriz.

Ayrıca literatürde osteogenezis ve dental kök hücre oluşum mekanizmasında Wnt/ β katenin yolağı ve BMP yolaklarının eş zamanlı olarak görev yaptığını belirten çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalardan birinde kanonik olmayan Wnt/ β katenin sinyal yolağının BMP-9 aracılığıyla indüklenen osteojenik indüksiyonda kritik öneme sahip olduğu rapor edilmiştir (Zhang vd. 2016).

Başka bir çalışmaya göre kanonik olmayan BMP ve Wnt/ β katenin yolakları arasında erken diş gelişiminin düzenlenmesi sırasında karşılıklı kontrol mekanizması mevcut olduğu savunulmuştur (Yuan vd. 2015).

Tüm bu çalışmaların sonuçlarından yola çıkarak bizim çalışmamızda da tideglusib BMP ve VEGF salınımını artırarak kemik oluşumunu tetiklemiş olduğu için, bu durum daha önceki mevcut tideglusib-dentin çalışması (Neves vd. 2017) ve diğer çalışmalarla tutarlılık sergilemektedir.

Lokal ilaç uygulaması sistemik yan etki oluşumu ve toksisitenin gözlenmemesi gibi avantajlara sahiptir. Bu sebeple biz de sistemik etkileri elimine etmek amacıyla tideglusibi lokal olarak uygulamayı tercih ettik. Tideglusibin lokal doz ve konsantrasyonunu belirlerken Neves ve ark. (Neves vd. 2017) yaptığı lokal dentin çalışmasını rehber olarak aldık.

Çalışmamızın sonuçlarına göre seçtiğimiz bu doz rat modelde herhangi bir yan etki ve toksik etki göstermemiş olup, rat modelin bu dozu iyi tolere ettiği gözlemlenmiştir. Ayrıca yine kullanılan ilaç ve doz herhangi bir iyileşme bozukluğuna da yol açmamıştır.

Literatürde tideglusibin kemik oluşumu üzerine etkisini değerlendirme amaçlı yapılmış hiçbir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu bakımdan çalışmamız orijinal bir çalışma olma özelliği göstermektedir. Çalışmamızın sonuçlarının literatüre katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Bu sonuçlara göre tideglusibin olumsuz bir etkisinin olmadığı, aksine lokal olarak uygulandığında kemik oluşumu üzerine olumlu bir etkisinin olduğunu söyleyebiliriz. Çalışmamızın sonuçlarına göre tideglusib kemik greft materyalleri ile birlikte lokal olarak kullanıldığında kemik oluşumunu arttırmaktadır. Bu ilacın kemik oluşumu üzerine etki mekanizmasını değerlendirme amacıyla daha çok in vivo çalışmaya ihtiyaç vardır.

6. SONUÇLAR

1. Çalışmamızın bulguları başlangıç hipotezimizi kısmen desteklemektedir.
2. Rat model, 5 mm'lik kemik greft uygulamaları için uygun bir modeldir.
3. Rat modelde mandibula angulus bölgesi otojen greft elde etmek için uygun bir bölgedir.
4. Tideglusibin otojen kemik greft ve ksenojen kemik greft uygulamalarında osteoblastlar ve yeni oluşan kemik hacmi üzerine pozitif etkisi vardır.
5. Tideglusibin otojen kemik greft ve ksenojen kemik greft uygulamalarında BMP-2 ve VEGF salınımı üzerine pozitif etkisi vardır.
6. Tideglusibin lokal kemik greft olarak uygulamalarında sistemik toksisite gözlenmemiştir.

7. KAYNAKLAR

Akal ÜK CM. Kistektomi, Kronik Enfeksiyon Bölgelerinin Küretajı ve Apikal Rezeksiyon Operasyonu Sonucunda Oluşan Kemik Defektlerinde Solventlerle Dehidrate Edilmiş Spongioz Kemik Cipslerinin Kullanılması. **A Ü Diş Hek Fak Derg** 1995; 22:103–108.

Aktaş ÜKA. Dental implantlarda greft kullanımı. **Türkiye Klin Derg İmplantoloji Sayısı** 2010;1:23–30.

Albers J, Keller J, Baranowsky A, Beil FT, Catala-Lehnen P, Schulze J, Amling M, Schinke T. Canonical Wnt signaling inhibits osteoclastogenesis independent of osteoprotegerin. **J Cell Biol** 2013; 200(4):537–49.

Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. **Eur Spine J** 2001; 10 Suppl 2(Suppl 2):S96-101.

Alden TD, Beres EJ, Laurent JS, Engh JA, Das S, London SD, Jane JA, Hudson SB, Helm GA. The use of bone morphogenetic protein gene therapy in craniofacial bone repair. **J Craniofac Surg** 2000; 11(1):24–30.

Almazin SM, Dziak R, Andreana S, Ciancio SG. The Effect of Doxycycline Hyclate, Chlorhexidine Gluconate, and Minocycline Hydrochloride on Osteoblastic Proliferation and Differentiation In Vitro. **J Periodontol** 2009; 80(6):999–1005.

Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. 2012. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges **Crit Rev Biomed Eng** 2012; 40(5): 363–408.

Andersson L. Dentin xenografts to experimental bone defects in rabbit tibia are ankylosed and undergo osseous replacement. **Dent Traumatol** 2010; 26(5):306–310.

Andersson L, Ramzi A, Joseph B. Studies on dentin grafts to bone defects in rabbit tibia and mandible; development of an experimental model. **Dent Traumatol** 2009; 25(1):78–83.

Araújo AS, Fernandes ABN, Maciel JVB, Netto J de NS, Bolognese AM. New methodology for evaluating osteoclastic activity induced by orthodontic load. **J Appl Oral Sci** 2015; 23(1):19–25.

Arioka M, Takahashi-Yanaga F, Sasaki M, Yoshihara T, Morimoto S, Hirata M, Mori Y, Sasaguri T. Acceleration of bone regeneration by local application of lithium: Wnt signal-mediated osteoblastogenesis and Wnt signal-independent suppression of osteoclastogenesis. **Biochem Pharmacol** 2014; 90(4):397–405.

Banks R, Forbes M, Kinsey S, Stanley A, Ingham E, Walters C, Selby P. Release of the angiogenic cytokine vascular endothelial growth factor (VEGF) from platelets: significance for VEGF measurements and cancer biology. **Br J Cancer** 1998;

77(6):956–964.

Benke, D., A. Olah HM. Protein-chemical analysis of Bio-Oss bone substitute and evidence on its carbonate content. *Biomaterials* 2001; 22(9):1005–12.

Bergwitz C, Wendlandt T, Kispert A, Brabant G. Wnts differentially regulate colony growth and differentiation of chondrogenic rat calvaria cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2001; 1538(2–3):129–140.

Bhisitkul RB. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br J Ophthalmol* 2006; 90(12):1542–1547.

Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: Radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J Orthop Traumatol* 2008; 9(2):73–80.

Bigham AS, Shadkhast M, Bigham Sadegh A, Shafiei Z, Lakzian A, Khalegi MR. Evaluation of osteoinduction properties of the demineralized bovine foetal growth plate powder as a new xenogenic biomaterial in rat. *Res Vet Sci* 2011; 91(2):306–310.

Bosch, C., B. Melsen KV. Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg* 1998; 9(4):310–6.

Boyne, P.J., Marx, R.E., Nevins, M., Triplett, G., Lazaro, E. and Lilly LC. A feasibility study evaluating rhbmp-2/absorbable collagen sponge for maxillary sinus floor augmentation. *Int J Periodontics Restorative Dent* 1997; 17:11.

Boyne PJ. Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects. *J Bone Joint Surg Am* 2001; 83 A Suppl 1(Pt 2).

Durmuşlar MC. Maksillofasiyal Bölgedeki Kemik İçi Defektlerin Tedavisinde Plateletten Zengin Plazmanın Hidroksi Apatit Kemik Greftleri ile Birlikte Kullanımının Etkinliğinin Klinik ve Radyolojik Olarak İncelenmesi. Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 2009, s. 137

Campisi P, Hamdy RC, Lauzier D, Amako M, Rauch F, Lessard M-L. Expression of Bone Morphogenetic Proteins during Mandibular Distraction Osteogenesis. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111(1):201–208.

Carson JS, Bostrom MPG. Synthetic bone scaffolds and fracture repair. *Injury* 2007; 38(1):S33–S37.

Carstens MH, Chin M, Ng T, Tom WK. Reconstruction of #7 facial cleft with distraction-assisted in situ osteogenesis (DISO): role of recombinant human bone morphogenetic protein-2 with Helistat-activated collagen implant. *J Craniofac Surg* 2005; 16(6):1023–32.

Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, Nadesan P, Wei Q, Poon R, Alman BA. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med* 2007; 4(7):e249.

Choi W-S, Lee J-I, Yoon H-J, Min C-K, Lee S-H. Medication-related osteonecrosis of the jaw: a preliminary retrospective study of 130 patients with multiple myeloma. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2017; 39(1):1. doi:10.1186/s40902-016-0099-4.

Clarke BL. Anti-sclerostin antibodies: Utility in treatment of osteoporosis. *Maturitas* 2014; 78(3):199–204.

Clarke SA, Hoskins NL, Jordan GR, Marsh DR. Healing of an ulnar defect using a proprietary TCP bone graft substitute, JAX™, in association with autologous osteogenic cells and growth factors. *Bone* 2007; 40(4):939–947.

Cunha MJS, Esper LA, Sbrana MC, De Oliveira PGFP, Do Valle AL, Lúcia A, De Almeida PF. Effect of Low-Level Laser on Bone Defects Treated with Bovine or Autogenous Bone Grafts: In Vivo Study in Rat Calvaria *BioMed Research International* 2014; doi:10.1155/2014/104230.

Cutting CB, McCarthy JG. BA. Blood supply of the upper craniofacial skeleton: The search for composite calvarial blood flaps. *Plast Reconstr Surg* 1984; (74):603.

Day TF, Guo X, Garrett-Beal L, Yang Y. Wnt/ β -Catenin Signaling in Mesenchymal Progenitors Controls Osteoblast and Chondrocyte Differentiation during Vertebrate Skeletogenesis. *Dev Cell* 2005; 8(5):739–750.

Develioğlu H, Unver Saraydın S, Kartal U. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J* 2009; 28(4):396–400.

Dimitriou, R., Tsiridis, E. and Carr I. The role of inhibitory molecules in fracture healing. *Injury* 2006; 37:20–9.

Domínguez JM, Fuertes A, Orozco L, del Monte-Millán M, Delgado E, Medina M. Evidence for irreversible inhibition of glycogen synthase kinase-3 β by tideglusib. *J Biol Chem* 2012; 287(2):893–904.

Donos N, Kostopoulos L, Tonetti M, Karring T, Lang NP. The effect of enamel matrix proteins and deproteinized bovine bone mineral on heterotopic bone formation. *Clin Oral Implants Res* 2006; 17(4):434–438.

Duan P, Bonewald LF. The role of the wnt/ β -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth. *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 77:23–29.

Ekelund A NO. Effects of Cyclosporin A on Bone Turnover and on Resorption Demineralized Bone Matrix. *Clin Orthop Relat Res* 1996; 326:127–134.

Feighan JE, Davy D, Prewett AB et al. Induction of Bone by a Demineralized Bone Matrix Gel: A Study in a Rat Femoral Defect Model. *J Orthop Res* 1995; 13:881–891.

Ferrara, N., Gerber, H.P. and LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669–76.

Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 161(2):851–858.

Fischer L, Boland G, Tuan RS. Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis. *J Cell Biochem* 2002; 84(4):816–31.

Frame JW. A convenient animal model for testing bone substitute materials. *J Oral Surg* 1980; 38(176).

Freeman E.. TRS. The role of osseous coagulum as a graft material. *J Periodont. Res*

1973; 8:229.

Galli C, Piemontese M, Lumetti S, Manfredi E, Macaluso GM, Passeri G. GSK3b-inhibitor lithium chloride enhances activation of Wnt canonical signaling and osteoblast differentiation on hydrophilic titanium surfaces. *Clin Oral Implants Res* 2013; 24(8):921–927.

Gazdag AR, Lane JM GD. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 1995; 3:1–8.

Geiger F, Bertram H, Berger I, Lorenz H, Wall O, Eckhardt C, Simank HG, Richter W. Vascular endothelial growth factor gene-activated matrix (VEGF 165-GAM) enhances osteogenesis and angiogenesis in large segmental bone defects. *J Bone Miner Res* 2005; 20(11):2028–2035.

Gerber H-P, Vu Thiennu H, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5:623-628.

Giannoudis, P.V., Tzioupis, C.C. and Tsiridis E. Gene therapy in orthopaedics. *Injury* 2006; 37:30–40.

Glass DA, Karsenty G. Molecular Bases of the Regulation of Bone Remodeling by the Canonical Wnt Signaling Pathway. *Curr Top Dev Biol* 2006; 73:43–84.

Golberg VM, Stevenson S. The Biology of Bone Grafts. *Semin Arthroplasty* 1993; 4:58–63.

Gorla LF de O, Spin-Neto R, Boos FBDJ, Pereira R dos S, Garcia-Junior IR, Hochuli-Vieira E. Use of autogenous bone and beta-tricalcium phosphate in maxillary sinus lifting: a prospective, randomized, volumetric computed tomography study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2015; 44(12):1486–1491.

Granjeiro JM, Oliveira RC, Bustos-Valenzuela JC, Sogayar MC, Taga R. Bone morphogenetic proteins: from structure to clinical use. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol* 2005; 38(10):1463–73.

Groeneveld, E.H. and Burger EH. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol* 2000; 142:21–25.

Gual-Vaqués P, Polis-Yanes C, Estrugo-Devesa A, Ayuso-Montero R, Marí-Roig A, López-López J. Autogenous teeth used for bone grafting: A systematic review. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal* 2018; 23(1):e112–e119.

Hallman, M. AT. Bone substitutes and growth factors as an alternative/complement to autogenous bone for grafting in implant dentistry. *Periodontol 2000* 2008; 47:172–92.

Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VMY, Klein PS. Activation of the Wnt signaling pathway: A molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol* 1997; 185(1):82–91.

Heliotis M, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiridis E, di Silvio L. Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; 35(3):265–269.

Hemmerich A, Brown H, Smith S, Marthndam SSK, Wyss UP. Distinct Roles of Bone

Morphogenetic Proteins in Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. **J Orthop Res** 2006; 11(April):770–781.

Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO. Essential role of β -catenin in postnatal bone acquisition. **J Biol Chem** 2005; 280(22):21162–21168.

Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2005; 6(4):306–317.

Ike M, Urist MR. Recycled root matrix Bone morphogenetic protein (BMP) Recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). **J Oral Implantol** 1998;24(3):124-32.

İnsal B, Pişkin İ. Kemik Dokusunun Fiziyojisi. **Etlik Vet Mikrobiyol Derg** 2017; 28(1): 28-32

Iwaniec UT, Wronski TJ, Turner RT. Histological Analysis of Bone. **Humana Press** 2008, p. 325–341.

Jardini, M.A., Carvalho, D.M., and Lima L. Early healing pattern of autogenous bone grafts with and without e-PTFE membranes: A histomorphometric study in rats. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2005; 100:666–73.

Jin Y, Xu L, Hu X, Liao S, Pathak JL, Liu J. Lithium chloride enhances bone regeneration and implant osseointegration in osteoporotic conditions. **J Bone Miner Metab** 2017; 35(5):497–503.

Jung I-H, Lim H-C, Lee E-U, Lee J-S, Jung U-W, Choi S-H. Comparative analysis of carrier systems for delivering bone morphogenetic proteins. **J Periodontal Implant Sci** 2015; 45(4):136–44.

Kamal M, Andersson L, Tolba R, Al-Asfour A, Bartella AK, Gremse F, Rosenhain S, Hölzle F, Kessler P, Lethaus B. Bone regeneration using composite non-demineralized xenogenic dentin with beta-tricalcium phosphate in experimental alveolar cleft repair in a rabbit model. **J Transl Med** 2017; 15(1):1–13.

Kempen DHR, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Yaszemski MJ, Dhert WJA. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. **Biomaterials** 2009; 30(14):2816–2825.

Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis P V. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. **Injury** 2008; Sep;39 Suppl 2:S45-57.

Kizildağ A, Taşdemir U, Arabaci T, Özmen Ö, Kizildağ CA, İyilikci B. Evaluation of New Bone Formation Using Autogenous Tooth Bone Graft Combined with Platelet-Rich Fibrin in Calvarial Defects. **J Craniofac Surg** 2019; 30(6):1662–1666.

Kleinheinz J, Stratmann U, Joos U, Wiesmann H-P. VEGF-Activated Angiogenesis During Bone Regeneration. **J Oral Maxillofac Surg** 2005; 63(9):1310–1316.

Kökden, A. Turker M. Oral ve maksillofasial cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. **Cumhur Üniversitesi Diş Hek Fak Derg** 1999; 2:134–140.

Kömürcü, E., İnanmaz, M.E., Işık, C., Akan, B., Köse KÇ. Kemik Yerine Geçen Biyomateryaller 2. Kısım: Hayvansal ve Sentetik Greftler. **Düzce Tıp Dergisi** 2011; 13(3):46–52.

Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. **Mol Cell Biol** 2010; 30(12):3071–85.

Kubler, N.R., Reuther, J.F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R. and Sebald W. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1998; 27:305–9.

Kusumoto, K., Bessho, K., Fujimura, K. and Akioka J. Comparison of ectopic osteoinduction in vivo by recombinant human bmp-2 and recombinant xenopus bmp-4/7 heterodimer. **Biochem Biophys Res Commun** 1997; 239:575–79.

Lambert F, Léonard A, Drion P, Sourice S, Layrolle P, Rompen E. Influence of space-filling materials in subantral bone augmentation: Blood clot vs. autogenous bone chips vs. bovine hydroxyapatite. **Clin Oral Implants Res** 2011; 22(5):538–545.

Leach JK, Kaigler D, Wang Z, Krebsbach PH, Mooney DJ. Coating of VEGF-releasing scaffolds with bioactive glass for angiogenesis and bone regeneration. **Biomaterials** 2006; 27:3249–3255.

Lee CH, Jin MU, Jung HM, Lee JT, Kwon TG. Effect of dual treatment with SDF-1 and BMP-2 on ectopic and orthotopic bone formation. **PLoS One** 2015; 10(3):1–15.

Levin LS. Early versus delayed closure of open fractures. **Injury** 2007; 38(8):896–899.

Li J, Xiang L, Jiang X, Teng B, Sun Y, Chen G, Chen J, Zhang J V., Ren PG. Investigation of bioeffects of G protein-coupled receptor 1 on bone turnover in male mice. **J Orthop Transl** 2017; 10:42–51.

Lin Z, Wang JS, Lin L, Zhang J, Liu Y, Shuai M, Li Q. Effects of BMP2 and VEGF165 on the osteogenic differentiation of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells. **Exp Ther Med** 2014; 7(3):625–629.

Liu C, Wu Z, Sun HC. The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor-beta1, bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. **Int J Oral Sci** 2009; 1(2):90–98.

Ma Q, Mao T, Liu B, Zhao J, Chen F, Wang H, Zhao M. Vascular osteomuscular autograft prefabrication using coral, type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2000; 38(5):561–564.

Maeda T, Kawane T, Horiuchi N. Statins Augment Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Osteoblastic Cells via Inhibition of Protein Prenylation **Endocrinology** 2003 Feb;144(2):681-92.

Maeda T, Matsunuma A, Kurahashi I, Yanagawa T, Yoshida H, Horiuchi N. Induction of osteoblast differentiation indices by statins in MC3T3-E1 cells. **J Cell Biochem** 2004; 92(3):458–471.

Malmgren B, Cvek M, Lundberg M, Frykholm A. Surgical treatment of ankylosed and

infrapositioned reimplanted incisors in adolescents. **Scand J Dent Res** 1984; 92(5):391–9.

Maloney JP, Silliman CC, Ambruso DR, Wang J, Tuder RM, Voelkel NF. In vitro release of vascular endothelial growth factor during platelet aggregation. **Am J Physiol** 1998; 275(3 Pt 2):H1054-61.

Marie BA, D.J. B, J.H. H. Angiogenic and cell survival functions of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). **J Cell Mol Med** 2007; 9(4):777–794.

Martinez A, Gil C, Perez DI. Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibitors in the Next Horizon for Alzheimer's Disease Treatment. **Res Int J Alzheimer's Dis** 2011; 2011:280502

Marukawa, E., Asahina, I., Oda, M., Seto, I., Alam, M.I. and Enomoto S. Bone regeneration using recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in alveolar defects of primate mandibles. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2001; 39:452–9.

Marx RE. Bone and Bone Graft Healing. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am** 2007; 19(4):455–466.

McCauley, L.K. Nohutçu RM. Mediators of periodontal osseous destruction and remodeling: principles and implications for diagnosis and therapy. **J Periodontol** 2002; 73(11):1377–91.

Misch CE. Contemporary implant dentistry. **Mosby Elsevier** St Louis, United States 2008.

Mohammad G, Pandey HP, Tripathi K. Diabetic wound healing and its angiogenesis with special reference to nanoparticles. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures** 2008; 3:201-208 .

Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Xu X, Chee WWL, Schricker SR, Shi S. Encapsulated dental-derived mesenchymal stem cells in an injectable and biodegradable scaffold for applications in bone tissue engineering. **J Biomed Mater Res** 2013; 101(11): 3285–3294.

Murat Yildirim ED, Biesterfeld S, Daniel Edelhoff H, Yildirim M. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Oss A in combination with venous blood A histologic and histomorphometric study in humans maxillary sinus augmentation using bovine bone substitute material Bio- partly invaginating. **Clin Oral Impl Res Clin Oral Impl Res C Munksgaard**. 2000; 11(11):217–229.

Murphy WL, Simmons CA, Kaigler D, Mooney DJ. Bone Regeneration via a Mineral Substrate and Induced Angiogenesis. **J Dent Res** 2004; 83(3):204–210.

Nanci A, Ten Cate AR Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. **Elsevier** 2017

Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. **Periodontol** 2000. 1999; 19(1):74–86.

Neufeld, G., Cohen, T.Gengrinovitch, S. and Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. **Faseb J**. 1999; 13:9–22.

Neves VCM, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT.. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. **Sci Rep**. 2017; 7:1–7.

Neves VCM, Babb R, Chandrasekaran D, Sharpe PT. Promotion of natural tooth repair by small molecule GSK3 antagonists. **Sci Rep** 2017; 7:1–7.

Omura, S., Mizuki, N., Kawabe, R., Ota, S., Kobayashi, S. and Fujita KA. Carrier for clinical use of recombinant human bmp-2:dehydrothermally cross linked composite of fibrillar and denatured atelocollagen sponge. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1998; 27:129–34.

Ornitz DM, Marie PJ. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease. **Genes Dev** 2002; 16(12):1446–65.

Özeç, İ., Yeler H. Bone morphogenetic proteinler ve osteoindüksiyon. **CÜ Diş Hek Fak Derg** 2003; 6:31–6.

Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong MEK, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. **Bone** 2008; 43(5):931–40.

Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho Andrew M., Gearhart B, Cooper GM, Huard J. VEGF improves, whereas sFlt1 inhibits, BMP2-induced bone formation and bone healing through modulation of angiogenesis. **J Bone Miner Res** 2005; 20(11):2017–2027.

Peng H, Usas A, Olshanski A, Ho Andrew M, Gearhart B, Cooper GM, Huard J. VEGF Improves, Whereas sFlt1 Inhibits, BMP2-Induced Bone Formation and Bone Healing Through Modulation of Angiogenesis. **J Bone Miner Res** 2005; 20(11):2017–2027.

Pinholt EM, Bang G, Haanaes HR. Alveolar ridge augmentation in rats by Bio-Oss. **Eur J Oral Sci** 1991; 99(2):154–161.

Pogrel MA (Tony) Karl-EKA. Essentials of Oral and Maxillofacial Surgery. 2014.

Prolo DJ, Pedrotti PW, Burres KP, OS. Superior osteogenesis in transplanted allogeneic canine skull following chemical sterilization. **Clin Orthop** 1982; 108:230.

Rasubala L, Yoshikawa H, Nagata K, Iijima T, Ohishi M. Platelet-derived growth factor and bone morphogenetic protein in the healing of mandibular fractures in rats. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2003; 41(3):173–8.

Rauch, F., D. Lauzier, S. Croteau, R. Travers, F.H. Glorieux RH. Temporal and spatial expression of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 during distraction osteogenesis in rabbits. **Bone** 2000; 27(3):453–9.

Rowe NL. Nonunion of the mandible and maxilla. **J Oral Surg** 1969; 27:520.

Ruiz-Gaspa S, Nogues X, Enjuanes A, Monllau JC, Blanch J, Carreras R, Mellibovsky L, Grinberg D, Balcells S, Díez-Perez A, et al. Simvastatin and atorvastatin enhance gene expression of collagen type 1 and osteocalcin in primary human osteoblasts and MG-63 cultures. **J Cell Biochem** 2007; 101(6):1430–1438.

Samee M, Kasugai S, Kondo H, Ohya K, Shimokawa H, Kuroda S. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. **J Pharmacol Sci** 2008; 108(1):18–31.

Sapir-Koren R, Livshits G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key

molecular coordinator of the balanced bone resorption–formation cycles. **Osteoporos Int.** 2014; 25(12): 2685–2700.

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. **Clin Oral Implants Res** 2003; 14(3):369–372.

Schmitz JP., Schwartz Z., Holling BB e. J. Characterization of rat calvarial nonunion defects. **Acta Anat** 1990; 138(3):1990.

Schnabel M, Fichtel I, Gotzen L, Schlegel J. Differential expression of Notch genes in human osteoblastic cells. **Int J Mol Med** 2002; 9(3):229–232.

Schönmeyr BH, Soares M, Avraham T, Clavin NW, Gewalli F, Mehrara BJ. Vascular endothelial growth factor inhibits bone morphogenetic protein 2 expression in rat mesenchymal stem cells. **Tissue Eng Part A** 2010; Feb;16(2):653-62.

Scott MA, Levi B, Askarinam A, Nguyen A, Rackohn T, Kang T, Chia S, James AW. Brief review of models of ectopic bone formation. **Stem Cells Dev** 2012; 21(5):655–667.

Seitz IA, Teven CM, Reid RR. "Repair and grafting of bone." Plastic Surgery, Third Edit. **Elsevier Inc**, 2017; p. 425-463.e16.

Şencan, M., Güneşçar, R., Cevit, Ö., Devenci D. Aspirinin kandaki anjiyojenik vasküler endotelial büyüme faktörü ve anti-anjiyojenik endostatin seviyelerine etkisi. **CÜ Tıp Fak Derg** 2007; 29:56–61.

Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. **Science** 1983; 219(4587):983–5.

Şimşek A. Çakmak G, Cila E. Kemik Greftleri ve Kemik Greftlerinin Yerini Tutabilecek Maddeler. **TOTBD Derg** 2004; 3(3–4).

Sojo K, Sawaki Y, Hattori H, Mizutani H, Ueda M. Immunohistochemical study of vascular endothelial growth factor (VEGF) and bone morphogenetic protein-2,-4 (BMP-2,-4) on lengthened rat femurs. **Eur Assoc Cranio-Maxillofacial Surg** 2005; 33:238–245.

Stavropoulos A. "Deproteinized Bovine Bone Xenograft." Musculoskeletal Tissue Regeneration. **Pietrzak, William S. (Eds.) Humana Press** Totowa, NJ, 2008; p. 119–151.

Steiglitz BM, Ayala M, Narayanan K, George A, Greenspan DS. Bone Morphogenetic Protein-1/Tolloid-like Proteinases Process Dentin Matrix Protein-1. **J Biol Chem** 2004;

Street J, Bao M, Deguzman L, Bunting S, Peale FV, Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002; Jul 23;99(15):9656-61

Takagi K., Urist MG. The reaction of the dura the bone morphogenetic protein (BMP) in repair of skull defects. **AnnSurg** 1982; 196(1):100-109

Taşdemir U, Özeç I, Esen HH, Avunduk MC. The influence of rifamycin decontamination on incorporation of autologous onlay bone grafts in rats: A histometric and immunohistochemical evaluation. **Arch Oral Biol** 2015; 60(5):724-9

Tezulaş E. İmplant osteotomisinde kemik filtresiyle toplanan otojen kemik greftlerinin klindamisin ve klorheksidin ile dekontaminasyonunun belirlenmesi. **Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**, Master tezi, İstanbul 2007.s.13-15

Theiss SM, Boden SD, Hair G, Titus L, Morone MA, Ugbo J. The Effect of Nicotine on Gene Expression During Spine Fusion. **Spine(Phila Pa 1976)** 2000; Oct 15;25(20):2588-94.

Thorwarth M, Schultze-Mosgau S, Kessler P, Wiltfang J, Schlegel KA. Bone Regeneration in Osseous Defects Using a Resorbable Nanoparticulate Hydroxyapatite. **J Oral Maxillofac Surg** 2005; 63(11):1626–1633.

Thorwarth M, Srour S, Felszeghy E, Kessler P, Schultze-Mosgau S, Schlegel KA. Stability of autogenous bone grafts after sinus lift procedures: A comparative study between anterior and posterior aspects of the iliac crest and an intraoral donor site. **Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology** 2005, 100(3):278–284.

Tomin, E., Beksaç, B., Joseph, M. ve Lane MJ. Amerika birleşik devletlerinde ortopedik girişimlerde otogreftlerin yerine kullanılan materyallere toplu bakış. **J Arthroplast Arthroscopic Surg** 2002; 13:114–129.

Torricelli P, Fini M, Rocca M, Giavaresi G, Giardino R. Xenogenic demineralized bone matrix: Osteoinduction and influence of associated skeletal defects in heterotopic bone formation in rats. **Int Orthop** 1999; 23(3):178–181.

Türker M YŞ. Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi. **Atlas Kitapçılık Tic. Ltd. Şti**, Ankara, 1997.

Vaibhav B, Nilesh P, Vikram S, Anshul C. Bone morphogenic protein and its application in trauma cases: A current concept update. **Int J Care Inj** 2007; 38:1227–1235.

Velasquez-Plata D, Todd Scheyer E, Mellonig JT. Clinical Comparison of an Enamel Matrix Derivative Used Alone or in Combination With a Bovine-Derived Xenograft for the Treatment of Periodontal Osseous Defects in Humans. **J Periodontol** 2002; 73(4):433–440.

Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. **Circulation** 1996; 93(8):1493–5.

Wang DS, Miura M, Demura H, Sato K. Anabolic Effects of 1,25-Dihydroxyvitamin D3 on Osteoblasts Are Enhanced by Vascular Endothelial Growth Factor Produced by Osteoblasts and by Growth Factors Produced by Endothelial Cells. **Endocrinology** 1997; 138(7):2953–2962.

Wang T, Guo S, Zhang H. 2018. Synergistic Effects of Controlled-Released BMP-2 and VEGF from nHAC/PLGAs Scaffold on Osteogenesis. **Biomed Res Int** 2018:3516463.

Warnke P, Springer I, Wiltfang PJ, Acil PY, Eufinger PH, Wehmöller M, Russo P, Bolte

H, Sherry E, Behrens E, Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man. **Lancet** 2004; 364(9436):766–770.

Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. **PLoS One** 2011; 6(10):e25900.

Wikesjö U, Qahash M, Huang Y-H, Xiropaidis A, Polimeni G, Susin C. Bone morphogenetic proteins for periodontal and alveolar indications; biological observations - clinical implications. **Orthod Craniofac Res** 2009; 12(3):263–270.

Wikesjö UME, Lim WH, Razi SS, Sigurdsson TJ, Lee MB, Tatakis DN, Hardwick WR. Periodontal Repair in Dogs: A Bioabsorbable Calcium Carbonate Coral Implant Enhances Space Provision for Alveolar Bone Regeneration in Conjunction with Guided Tissue Regeneration. **J Periodontol** 2003; 74(7):957–964.

Wiltfang J, Kessler P, Buchfelder M, Merten H-A, Neukam FW, Rupprecht S. Reconstruction of skull bone defects using the hydroxyapatite cement with calvarial split transplants. **J Oral Maxillofac Surg** 2004; 62(1):29–35.

Wiroszko, B., Wong, T.Y. and Simo R. Vascular endothelial growth factor and diabetic complications. **Prog Retin Eye Res** 2008; 6:608–21.

Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. **Science** 1988; 242(4885):1528–34.

Yuan G, Yang G, Zheng Y, Zhu X, Chen Z, Zhang Z, Chen Y. The non-canonical BMP and Wnt/ -catenin signaling pathways orchestrate early tooth development. **Development** 2015; 142(1):128–139.

Zellin, G.,

Linde A. Bone neogenesis in domes made of expanded polytetrafluoroethylene: efficacy of rhBMP-2 to enhance the amount of achievable bone in rats. **Plast Reconstr Surg** 1999; 103:1229–37.

Zhang F, Song J, Zhang H, Huang E, Song D, Tollemar V, Wang Jing, Wang Jinhua, Mohammed M, Wei Q. Wnt and BMP signaling crosstalk in regulating dental stem cells: Implications in dental tissue engineering. **Genes Dis**; 2016; 3(4):263–276.

Zhang W, Wang X, Wang S, Zhao J, Xu L, Zhu C, Zeng D, Chen J, Zhang Z, Kaplan DL. The use of injectable sonication-induced silk hydrogel for VEGF 165 and BMP-2 delivery for elevation of the maxillary sinus floor. **Biomaterials** 2011; 32(35):9415–9424.

8.EKLER

Ek 1-a



T.C.
PAMUKKALE ÜNİVERSİTESİ
Hayvan Deneyleri Etik Kurulu



Sayı :60758568-020/31897
Konu :Başvurunuz hk.

08/05/2018

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Osman Ufuk TAŞDEMİR

İlgi :15/02/2018 tarihli dilekçeniz.

"Tideglusib ile Karıştırılan Kemik Greftin Yeni Kemik Oluşumu Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi" konulu PAUHADYEK-2018/05 no'lu çalışmanız 21.03.2018 tarih ve 2018/03 sayılı toplantımızda görüşülmüş olup,

Yapılan görüşmelerden sonra, söz konusu çalışmanın yapılmasının **Hayvan Deneyleri Etiği açısından uygun olduğuna ve 40 adet Sıçan** kullanılarak yapılmasına oy birliği ile karar verildi.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.

Prof. Dr. Funda Fatma BÖLÜKBAŞI HATİP
Başkan

9.ÖZGEÇMİŞ

25.04.1983 tarihinde Manisa'nın Demirci ilçesinde dünyaya gelen Berrin İYİLİKCİ ilkokulu Abdurrahman Şeref Bey İlkokulu' nda, ortaöğrenimini Demirci Ortaokulu' nda, lise öğrenimini ise Demirci Yabancı Dil Ağırlıklı Lisesi' nde tamamlamıştır. Çukurova Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi' ni 2007 yılında bitirmiştir. 2007-2008 İzmir' de özel kliniklerde çalışmış olup, 2008-2016 yılları arasında Tavas Devlet Hastanesi Ağız Diş Sağlığı Polikliniği' nde diş hekimi olarak hizmet vermiştir. Pamukkale Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız, Diş ve Çene Cerrahisi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimine 2016 yılı Şubat ayında başlamıştır. Evli ve 1 çocuk annesidir.