



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**FONKSİYONEL MANDİBULAR İLERLETME APAREYİ
KULLANILAN SIÇANLARDA SİSTEMİK ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ
EKSTRESİ VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI İLE
DÜŞÜK DOZ LOKAL LAZER UYGULAMASININ DAMAR VE
YENİ KEMİK OLUŞUMU AÇISINDAN KONDİL HİSTOLOJİSİNE
ETKİSİ**

Merve Nur EĞLENEN
UZMANLIK TEZİ

ORTODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd.Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ
Tez Danışmanı

Gaziantep

2017



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**FONKSİYONEL MANDİBULAR İLERLETME APAREYİ
KULLANILAN SIÇANLARDA SİSTEMİK ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ
EKSTRESİ VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI İLE
DÜŞÜK DOZ LOKAL LAZER UYGULAMASININ DAMAR VE
YENİ KEMİK OLUŞUMU AÇISINDAN KONDİL HİSTOLOJİSİNE
ETKİSİ**

Merve Nur EĞLENEN
UZMANLIK TEZİ

ORTODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Yrd.Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ
Tez Danışmanı

Gaziantep

2017

T.C.
GAZIANTEP ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ORTODONTİ ANABİLİM DALI

**FONKSİYONEL MANDİBULAR İLERLETME APAREYİ KULLANILAN
SIÇANLARDA SİSTEMİK ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRESİ VE
MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI İLE DÜŞÜK DOZ LOKAL
LAZER UYGULAMASININ DAMAR VE YENİ KEMİK OLUŞUMU
AÇISINDAN KONDİL HİSTOLOJİSİNE ETKİSİ**

Merve Nur EĞLENEN

Tez Savunma Tarihi: 15.2017

Kurum Onayı:

Prof. Dr. Kamile ERCİYAS
Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı

Bu tez çalışmasının bir “Uzmanlık” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Yrd. Doç. Dr. Merve GÖYMEN
Ortodonti Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Uzmanlık” tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Uzmanlık” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Doç. Dr. Nihal HAMAMCI

.....

Yrd. Doç. Dr. Merve GÖYMEN

.....

Yrd. Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ

.....

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

07.08.2017

Merve Nur EĞLENEN

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tezimin hazırlanmasında destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen tez danışmanım, kıymetli hocam Sn. Yrd. Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ hocama,

Fakültede bulunduğum süre boyunca bütün yoğunluklarına rağmen tüm bilgi ve birikimlerini paylaşan ve uzmanlık eğitimime yaptıkları değerli katkılarından ötürü Sn. Yrd. Doç. Dr. Merve GÖYMEN hocama,

Tezimin histolojik incelemelerini hazırlayıp değerlendiren ve bunun için gece gündüz demeden yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Sn. Prof. Dr. M. İbrahim TUĞLU, Dr. Işıl AYDEMİR ve değerli asistanlarına,

Fakülteye başladığım ilk günden beri ortodontiye ve hayata dair hep bir şeyler öğrendiğim, beni yüreklendiren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyen meslektaşım, sevgili canım dostum Sn. Dr. Zryan Jaza Hama Salih'e,

Uzmanlık eğitimime başladığım ilk günden beri iyisiyle kötüsüyle kader arkadaşlarım olan Sn. Dr. M. Nezir Karaca, Sn. Dr. Güzin Bilgin ile Sn. Dr. Sarah Fadıl Al-Sabunchi başta olmak üzere beraber eğitim aldığımız diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Bugünlere gelmemde emeklerini, haklarını hiç bir zaman ödeyemeyeceğim, her zaman için hayattaki en büyük şansım olarak nitelendirdiğim canım annem, babam, anneannem ve dedeme teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	1
TEŞEKKÜR	İ
TABLolar LİSTESİ	VI
ŞEKİLLER LİSTESİ	VIII
RESİMLER	IX
SİMGE ve KISALTMALAR	XI
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	6
2.1. Kemik ve Kemik Hücreleri	6
2.1.1. Osteoblastlar	6
2.1.2. Osteoklastlar	6
2.1.3. Osteositler	7
2.2. Fonksiyonel Adaptasyon ve Remodeling	7
2.3. Kemik Formasyonu.....	7
2.3.1. İntramembranöz kemikleşme.....	7
2.3.2. Endokondral kemikleşme.....	8
2.4. Mandibulanın Büyüme ve Gelişimi	8
2.4.1. Prenatal dönem büyümesi	8
2.4.2. Postnatal dönem büyümesi	10
2.5. Mandibular Kondil.....	12
2.5.1. Mandibular kondilin histomorfolojisi	12
2.5.2. Mandibular kondilin büyüme mekanizması.....	13

2.6. Maloklüzyonlar	14
2.6.1. Sınıf II maloklüzyonların prevalansı	15
2.6.2. Sınıf II maloklüzyonların etiyojisi	15
2.6.3. Sınıf II maloklüzyonların özellikleri	16
2.6.4. Sınıf II maloklüzyonların tedavi seçenekleri	16
2.7. Fonksiyonel Apareyler	18
2.7.1. Tanım ve tarihçe	18
2.7.2. Fonksiyonel apareylerin tedavi zamanlaması	18
2.7.3. Sınıf II maloklüzyonlarda fonksiyonel apareylerin mekanizması	18
2.7.4. Fonksiyonel apareylerin sınıflaması	19
2.7.5. Fonksiyonel apareyler ile Sınıf II düzeltiminde iskeletsel ve dental etkiler	22
2.8. Lazer	23
2.8.1. Lazerin tanımı ve tarihçesi	23
2.8.2. Temel lazer fiziği	23
2.8.3. Lazer ışınlarının temel özellikleri	24
2.8.4. Lazer doku etkileşimleri	25
2.8.5. Diş hekimliğinde lazer tipleri	27
2.8.6. Düşük doz lazer terapisi (DDLT)	30
2.8.7. Diş hekimliğinde düşük doz lazer uygulamaları	33
2.8.8. Ortodontide düşük doz lazer kullanımı	33
2.9. Mezenkimal Kök Hücreler	36
2.9.1. Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması ve yüzey belirteçleri	37
2.9.2. MKH'lerin osteoblastik ve kondrojenik farklılaşması	38
2.9.3. MKH farklılaşmasının düzenlenmesi	38
2.9.4. Mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamaları	39
2.9.5. Mezenkimal kök hücrelerin diş hekimliğinde kullanımı	40
2.9.6. Mezenkimal kök hücrelerin ortodontide kullanımı	42
2.9.7. Kök hücreler için düşük doz lazer terapisi	43
2.10. Üzüm Çekirdeği Ekstresi (ÜÇE)	44
2.10.1. Üzüm çekirdeği ekstresinin kullanım alanları	45
2.11. Kullandığımız İmmunohistokimyasal Belirteçler	47
2.11.1. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)	47
2.11.2. Osteonektin (ON)	47
2.11.3. Tip II kollajen	48

2.11.4. STRO-1	48
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	49
3.1. Araştırmada Kullanılan Malzemeler	49
3.1.1. Araştırmanın deney safhasında kullanılan malzemeler	49
3.1.2. Araştırmada kullanılan farmakolojik ajanlar	50
3.1.3. Araştırmanın histolojik değerlendirilmesinde kullanılan malzemeler	50
3.2. Çalışma Gruplarının Tanımlanması	51
3.3. Ağız İçi Aparey (AİA) Uygulaması.....	53
3.3.1. Ölçü alınması ve ağız içi apareyin hazırlanması.....	53
3.3.2. Ağız içi apareyin (AİA) yerleştirilmesi	55
3.4. Kök Hücre Uygulaması.....	56
3.4.1. Kök hücre eldesi	56
3.4.2. YDMKH Tanımlanması.....	56
3.4.3. Kök hücre uygulanması	58
3.5. Üzüm Çekirdeği Ekstresi Uygulaması.....	59
3.5.1. Üzüm çekirdeği ekstresi hazırlanması	59
3.5.2. Üzüm çekirdeği ekstresi uygulanması	59
3.6. Lazer Uygulaması	60
3.7. Ağırlık Takibi.....	62
3.8. Sakrifikasyon	62
3.9. Histomorfometrik Analizi	63
3.10. İndirekt İmmunohistokimya Boyaması.....	65
3.11. İstatistiksel Yöntem	66
4. BULGULAR.....	67
4.1. Sıçanlar ve Kullanılan Apareylerle İlgili Gözlemsel Bulgular	67
4.2. Ağırlık Ölçümleriyle İlgili Bulgular	67
4.3. Deney Gruplarında H-E Boyama ile Elde Edilen Bulgular	68
4.3.1. Yeni Osteoblast Yapımı (YOY).....	68
4.3.2. Yeni Kemik Oluşumu (YKO).....	70
4.3.3. Yeni Damar Oluşumu (YDO).....	74
4.4. Deney Gruplarında Masson Trikrom Boyaması ile Yapılan Değerlendirmeler .	76

4.5. Deney Gruplarında İmmunohistokimya Boyaması ile Yapılan Değerlendirmeler	78
4.5.1. STRO-1	78
4.5.2. Osteonektin	82
4.5.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF).....	85
4.5.4. Tip II kollajen	88
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	91
5.1. Gereç ve Yöntemin Tartışması	91
5.2. Yeni Osteoblast Yapımının Tartışması (YOY).....	98
5.3. Yeni Kemik Oluşumunun Tartışması (YKO).....	98
5.4. Yeni Damar Oluşumunun Tartışması (YDO).....	101
5.5. STRO-1 Tartışması	102
5.6. Osteonektin Tartışması (ON).....	102
5.7. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü Tartışması (VEGF).....	103
5.8. Tip II Kollajen Tartışması.....	104
6. KAYNAKLAR	109
7. EKLER	135
EK 1: YEREL ETİK KURUL KARAR METNİ.....	135
8. ÖZGEÇMİŞ	137

TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Çalışma gruplarının tanımlanması.....	53
Tablo 3.2. DDLT, MKH ve ÜÇE uygulamaları	61
Tablo 3.3. Hızlı doku takibi ve parafine gömme protokolü.....	64
Tablo 3.4. Masson Trikrom boyama protokolü	65
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan deneklerin çalışma başlangıç ve bitim ağırlık ortalamaları	67
Tablo 4.2. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni osteoblast yapımı (YOY) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi	69
Tablo 4.3. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni osteoblast yapımı (YOY) ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi	70
Tablo 4.4. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni kemik oluşumu (YKO) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi	71
Tablo 4.5. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni kemik oluşumu (YKO) ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi	72
Tablo 4.6. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni damar oluşumu (YDO) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi	74
Tablo 4.7. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni damar oluşumu (YDO) ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi	75
Tablo 4.8. STRO-1 ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi	78
Tablo 4.9. STRO-1 ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi.....	80
Tablo 4.10. Osteonektin ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi.....	82
Tablo 4.11. Osteonektin ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi.....	83
Tablo 4.12. VEGF ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi.....	85
Tablo 4.13. VEGF ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi.....	86

Tablo 4.14. Tip II Kollajen ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi.....	88
Tablo 4.15. Tip II Kollajen ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi.....	89



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1. Meckel kıkırdağı ve mandibulanın kemikleşmesi	9
Şekil 2.2. Mandibulanın kıkırdak yapıları	10
Şekil 2.3. A) Sınıf I oklüzyon B) Sınıf I maloklüzyonu C) Sınıf II maloklüzyonu D) Sınıf III maloklüzyonu.....	14
Şekil 2.4. Lazerin oluşumu	24
Şekil 2.5. Lazer ışını diş dokusu etkileşimleri	25
Şekil 3.1. DPMKH STRO-1, CD90, CD34 ve CD45 tanımlanmasının skorlama ile analizinde hücrelerimizin tanımlamaları.....	58
Şekil 4.1 Yeni osteoblast yapımının (YOY) grafik ile gösterilmesi.....	69
Şekil 4.2. Yeni kemik oluşumunun (YKO) grafik ile gösterilmesi	71
Şekil 4.3. Yeni damar oluşumunun (YDO) grafik ile gösterilmesi	76
Şekil 4.4. STRO-1 ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi	79
Şekil 4.5. Osteonektin ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi	82
Şekil 4.6. VEGF ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi	85
Şekil 4.7. Tip II Kollajen ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi.....	88

RESİMLER

Resim 3.1. Alınan ölçülerden elde edilen krom kobalt model.....	54
Resim 3.2. Elde edilen krom kobalt modellere basılan 1 mm kalınlığındaki Essix plak.....	54
Resim 3.3. Deneklerin alt dişlerine çapraz kapanış sağlanacak şekilde Essix plakların yapıştırılma aşaması.....	55
Resim 3.4. YDMKH için kültür ortamında yerleşip, çoğalmış 3. pasajdaki hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri.....	56
Resim 3.5. DPMKH STRO-1 antikor ile boyanmış pozitif ve CD45 ile boyanmamış negatif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması.....	57
Resim 3.6. Deneklere kök hücre enjeksiyonu.....	59
Resim 3.7. Deneklere intraoral gavaj yöntemiyle üzüm çekirdeği ekstresi uygulaması	60
Resim 3.8. Deneklere düşük doz lazer uygulaması	61
Resim 3.9. Diseke edilmiş kondile ait görüntü	62
Resim 3.10. Diseke edilmiş sol mandibulanın görünümü	63
Resim 4.1. Hemotoksilen–Eozin (H-E) ile boyanan kesitlerde kondil kırırdağı ve kırırdak altı subkondiler kemik görüntüsü (x200).....	68
Resim 4.2. H-skor ile boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun belirlendiği incelemede yeni kemik oluşumu ve yeni damar oluşumuna ayrıntılı bakış	73
Resim 4.3. Deney gruplarının Masson Trikrom (MTK) ile histokimyasal boyama görüntüleri.....	77
Resim 4.4. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların STRO-1 ile yapılan boyamalarında kondildeki MKH tutulumuna ayrıntılı bakış	81
Resim 4.5. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların Osteonektin ile yapılan boyamalarında osteoblast durumuna ayrıntılı bakış	84
Resim 4.6. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların VEGF ile yapılan boyamalarında damarlanma durumuna ayrıntılı bakış	87

Resim 4.7. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların Tip II Kollajen ile yapılan boyamalarında matriks durumuna ayrıntılı bakış 90



SİMGE ve KISALTMALAR

ABD	Amerikan Birleşik Devleti
AİA	Ağız İçi Aparey
AlGaAs	Aliminyum- Galyum-Arsenid
ANB	A-Nasion-B Noktalarının oluşturduğu aç
ANOVA	Analysis of Variance (Varyans Analizi)
ALP	Alkale Fosfataz
Ar	Argon
AsAP	Ascorbic acid-2-phosphate
ATP	Adenozin Trifosfat
BM-40	Basement-Membrane Protein 40
BMPs	Kemik Morfogenetik Proteinler
BrdU	5-bromo-2'-deoxyuridine
Ca	Kalsiyum
cbfa1	Core Binding Factor Alpha 1
CD	Clusters of differentiation
CFU-F	Koloni oluşturan birim- fibroblastik
M-CSFR	Macrophage-Colony Stimulating Faktör Reseptörü
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare

CO ₂	Karbondioksit
Co	Condylon
Co-Gn	Condylon-Gnathion arasındaki uzunluk
Co-Pg	Condylon-Pogonion arasındaki uzunluk
Co-Gn/Pg	Condylon-Gnathion-Pogonion arasındaki açı
DAB	Diaminobenzidin
DDLTL	Düşük Doz Lazer Terapisi
DKH	Dental Kök Hücreler
DNA	Deoxyribonucleic acid (Deoksiribonükleik asit)
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic Acid
Er:YAG	Erbiyum: Yttrium Aliminium Garnet
FADH ₂	Flavin Adenine Dinucleotide (hydroquinone form)
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblastik Gelişme Faktörler
FR	Frankel Regulator
GaAlAs	Galyum-Alüminyum Arsenid
GaAr	Galyum-Arsenid
GAG	Glikoz Amino Glukan
GDF	Growth Differentiation Factors (Büyüme Farklılaşma Faktörleri)
GF	Glenoid Fossa

GM-CFC	Granulocyte-Macrophage Colony-Forming Cell
gr	Gram
GRAS	Genel Olarak Güvenli Kabul Edilen Statüsü
GvHD	Graft Versus Host Hastalığı
H-E Boyama	Hemotoksilen–Eozin Boyama
He	Helyum
He-Ne	Helyum-Neon
HKH	Hematopoetik Kök Hücreler
H ₂ O ₂	Hidrojen Peroksit
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
Ho:YAG	Holmiyum: Yttrium Alüminyum Garnet
Hz	Hertz
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
Ihh	Indian Hedgehog
IL1-β	İnterlökin 1- β
InGaAs	İndiyum-Galyum-Arsenid
J	Joule
Kİ-MKH	Kemik İliği Kökenli Mezenkimal Kök Hücreler
KKH	Kardiyak Kök Hücreler
LED	Light Emitting Diyot
LD50	%50 Lethal Doz (Ortalama Öldürücü Doz)

LIPUS	Düşük Yoğunluklu Pulsed Ultrason
MASER	Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation
MKH	Mezenkimal Kök Hücre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
MTK	Masson Trikrom
N	Azot
NADH	Flavin Adenine Dinucleotide
Nd:YAG	Neodmiyum: Yttrium Aliminium Garnet
Ne	Neon
nm	Nanometre
OTK	Olgun Tabaka Kalınlığı
Osx	Osterix
OCN	Osteokalsin
ON	Osteonektin
OPN	Osteopontin
PDL	Periodontal Ligament
PG-E2	Prostaglandin E2
PPAR γ	Nuclear Hormone Receptor Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
pQCT	Peripheral Quantitative Computed Tomography (Periferik

Kantitatif Bilgisayarlı Tomografi)

PRP	Platelet Rich Plasma
PTH	Parathroid Hormon
PTHrP	Parathroid Hormon-related Protein
RANKL	Reseptör Aktivatör Nükleer Kappa B Ligandı (RANKL)
RME	Rapid Maksiller Ekspansiyon (Hızlı Üst Çene Genişletmesi)
RNA	Ribo Nükleik Asit
SPARC	Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
SRP	Kök Yüzey Temizliği
SUS	Sabbagh Universal Spring
TAD	Geçici Ankraj Aygıtları
TAZ	Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif
TGF- β	Transforming Growth Factor-Beta (Dönüştürücü Gelişme Faktörü-Beta)
TME	Temporo Mandibular Eklem
TUNEL	Terminal Transferase dUTP Nick End Labeling
ul	Mikrolitre
ÜÇE	Üzüm Çekirdeği Ekstresi
VEGF	Vasküler Endotelyal Growth Faktör (Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü)
W	Watt

Wnts	Farklılaşmanın Erken Mediatörü
YAG	Yttrium Alüminyum Garnet
YDMKH	Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre
YDO	Yeni Damar Oluşumu
YKO	Yeni Kemik Oluşumu
YOY	Yeni Osteoblast Yapımı
$1.25(OH)_2D_3$	1,25-dihydroxyvitamin D ₃ (Calcitriol)



ÖZET

FONKSİYONEL MANDİBULAR İLERLETME APAREYİ KULLANILAN SIÇANLARDA SİSTEMİK ÜZÜM ÇEKİRDEĞİ EKSTRESİ VE MEZENKİMAL KÖK HÜCRE KULLANIMI İLE DÜŞÜK DOZ LOKAL LAZER UYGULAMASININ DAMAR VE YENİ KEMİK OLUŞUMU AÇISINDAN KONDİL HİSTOLOJİSİNE ETKİSİ

Merve Nur EĞLENEN
Uzmanlık Tezi, Ortodonti Anabilim Dalı
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ
Ağustos 2017, 137 sayfa

İskeletsel Sınıf II maloklüzyonların fonksiyonel tedavisi ile glenoid fossa ve kondilde büyüme elde edilebilmektedir. Bu çalışmanın amacı, sıçanlarda alt çeneyi önde konumlandıran fonksiyonel apareyler ile birlikte uygulanan üzüm çekirdeği ekstresi (ÜÇE), mezenkimal kök hücre (MKH) ve düşük doz lazer terapisinin (DDLT), kondil bölgesindeki damarlanmaya ve yeni kemik oluşumuna etkilerinin incelenmesidir. Çalışma, ağırlıkları 250 ± 50 gram olan, rastgele 8 gruba ayrılan 45 adet Wistar erkek sıçandan oluşmaktadır. Grup 1 (n=3) Kontrol grubu hariç, tüm gruplara (n=6) fonksiyonel aparey uygulanmıştır. Grup 2, sadece aparey uygulanan grup; Grup 3, apareye ek olarak sadece 300 mg/kg/gün ÜÇE; Grup 4, sadece 8 J/cm² DDLT; Grup 5, DDLT ve 300 mg/kg/gün ÜÇE; Grup 6, 1×10^6 hücre / 100 ul besiyeri MKH ve 300 mg/kg/gün ÜÇE; Grup 7, DDLT ve MKH; Grup 8 ise, DDLT ile MKH ve ÜÇE uygulanan gruptur. 4 haftalık deneyin sonunda kondil kesitlerini immunohistokimyasal olarak değerlendirmek için yeni kemik oluşumu, yeni damar oluşumu, yeni osteoblast yapımı, osteonektin, VEGF, Tip II kollajen ve STRO-1 belirteçleri kullanılmıştır. Aparey kullanımı ile birlikte bütün parametrelerde önemli bir artış olduğu bulunmuş ve en fazla artış ise ÜÇE, lazer ve MKH'nin birarada kullanılmasıyla elde edilmiştir. MKH, uygulanan bütün gruplarda ölçülen parametreler lazer ve ÜÇE uygulamalarına göre daha fazla artış göstermiştir. Sonuç olarak, özellikle kök hücre olmak üzere, DDLT ve ÜÇE uygulamalarının Tip II kollajen oluşumunu, osteoblast farklılaşmasını ve yeni kemik oluşumunu daha fazla sağladığı tespit edilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Fonksiyonel apareyler, Kök hücre terapisi, Lazer terapisi, Mandibular kondil, Üzüm çekirdeği ekstresi.

ABSTRACT

THE NEW BONE FORMATION AND NEOVASCULARIZATION EFFECTS OF SYSTEMATICALLY APPLIED GRAPE SEED EXTRACTION, MESENCHYMAL STEM CELLS AND LOCALIZED APPLIED LOW LEVEL LASER THERAPY AFTER FUNCTIONAL MANDIBULAR ADVANCEMENT ON RAT CONDYLE

Merve Nur EYLENEN

Specialist Thesis, Department of Orthodontics

Supervisors: Yrd. Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ

August 2017, 137 pages

Functional treatment of skeletal Class II malocclusions could lead to growth in the glenoid fossa and in the condyle. The aim of this study was to evaluate the effects of using localized applied low level laser therapy (LLLT) with systematically administered grape-seed extraction (GSE) and mesenchymal stem cells (MSCs) on new bone formation and neovascularization of the condyle of the rats after mandibular advancement by using functional appliance. 45 rats weighting 250 ± 50 gr, were divided randomly into 8 groups. Functional appliances were administered to all groups (n=6) except the control group which is Group 1 (n=3). Group 2 was treated with only appliances; Group 3 with 300 mg/kg/day GSE; Group 4 with 8 J/cm^2 LLLT once in a two days; Group 5 with LLLT and GSE; Group 6 with 1×10^6 MSCs and GSE, Group 7 with LLLT and MSCs; Group 8 with LLLT, MSCs and GSE. Analysis of new bone, vascular and osteoblast formation, osteonectin, VEGF, Type-II collagen, STRO-1 were done for the condyle after 4 weeks. All parameters were increased with appliance use, and the highest increase was achieved by the combined application of GSE, LLLT and MSCs to the appliance groups. It has been found that especially MSCs with LLLT and GSE applications provide new vascularity, cell proliferation, Type II collagen formation, osteoblast differentiation and new bone formation.

Key Words: Functional appliances, Grape seed extraction, Laser therapy, Mandibular condyle, Stem cells therapy.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Mandibular kondil, mandibulanın büyümesi, remodelingi ve adaptasyonu sırasında (1) önemli bir role sahip olan postnatal bir büyüme yeridir (2). Kondil, mekanik, fonksiyonel ve hormonal uyarılara cevap oluşturmaktadır (3). Mandibular hareketler, çiğneme fonksiyonları ve okluzal kuvvetler mandibulayı uyararak bu bölgedeki kasları etkilerler (4).

Sınıf II maloklüzyonlar, pratikte en sık rastlanan ortodontik problemlerden biridir (5). Alt çene gelişim yetersizliği gösteren Sınıf II divizyon 1 maloklüzyona sahip hastalar, yapılan çalışmalara göre tüm ortodonti hastalarının %25,5'ini oluşturmaktadır (6). Populasyonun %15'inde 5-10 mm'lik ciddi bir overjet bulunurken, %38'i ise 3-4 mm'lik ortalama bir overjete sahiptir. Büyümesi devam eden hastalarda Sınıf II maloklüzyonların ortognatik tedavi gerektirmeyen büyük bir bölümü fonksiyonel apareyler ile tedavi edilir (7).

Büyümekte olan hayvanlarla yapılan çalışmalarda, iskeletsel Sınıf II maloklüzyonların fonksiyonel tedavisi ile glenoid fossa ve kondilde ilave büyüme elde edilebildiği; Temporo Mandibular Eklem (TME'nin) moleküler ve hücresel cevabının uyarıldığı gösterilmiştir (8). Bu nedenle, son yıllarda sıklıkla tercih edilmeye başlanan fonksiyonel tedavilerde başarı, tamamen hastanın kooperasyonuna bağlıdır (9). Güncel literatürler incelendiğinde, alt çeneyi önde konumlandıran fonksiyonel apareyler ile elde edilen kondiler büyüme ve adaptasyonu hızlandırmak için, apareylerin kemik yapımını arttıran çeşitli uygulamalar ile desteklendiği görülmüştür. Lazer ve ultrason uygulamaları, çeşitli sistemik ilaçların (steroid, hormon vb) verilmesi, diyet içeriğinin değiştirilmesi gibi uygulamalar buna örnek olarak gösterilebilir (10, 11).

Güncel literatür incelendiğinde, düşük doz lazer terapisinin (DDLTL) kemik rejenerasyonu üzerine olan etkilerinin çeşitli çalışmalarla gösterilmiş olduğu görülmektedir (12, 13). DDLTL'nin in vitro olarak uygulanması ile Alkalen Fosfataz

aktivitesinin, hücre içi kalsiyum miktarının ve osteoblast aktivitesinin artarak, yeni kemik formasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (14). Ayrıca, in vivo çalışmalarla, DDLT'nin kırıklarda kemik iyileşmesini, kemik defektlerinde ise yeni kemik formasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (13, 15).

Genetik çalışmaların gelişimiyle ise, son yıllarda oldukça ön plana çıkan kök hücrelerin, büyüme gelişimi artırıcı etkileri olduğu bilinmektedir (16). Mezenkimal kök hücreler (MKH) kemik iliği, kas, karaciğer, plasenta, periferik kan damarları, sinovyal sıvı, dental pulpa ve adipoz dokularda bulunmaktadır (17) ve farklı biyolojik ve kimyasal sinyaller kullanılarak kemik, kırık, adipoz, kas ve sinir hücrelerinden üretilmektedir (18). Kemik iliği stromasından elde edilen mezenkimal kök hücreler, osteojenik öncül hücrelerin affinitesini artırır (19). Yapılan çalışmalar, lokal kemik defektlerine yerleştirilen mezenkimal kök hücre içerikli biyomateryallerin, mezenkimal kök hücrelerin defekt bölgelerine maksimum tutunmasını, proliferasyonunu, osteojenik farklılaşmasını ve mineralize doku formasyonunu sağladığını göstermiştir (20). Mezenkimal kök hücreler, kemik defektlerinin iyileşmesini arttırmakla birlikte yara iyileşmesini, vaskularizasyonu ve kırık formasyonunu da arttırmaktadır. Yapılan bir çalışmada, ortodontik olarak maksillası genişletilen sıçanlarda, intermaksiller sutura kemik iliği kaynaklı mezenkimal kök hücre uygulaması yapılmış, sonuç olarak yeni kemik formasyonunun, osteoblast sayısının ve vaskularizasyonun arttığı, böylece tedavi sonrası kemikleşme için gereken bekleme süresinin azaldığı bildirilmiştir (21).

MKH'lerin osteoblast ve kondroblastlara dönüşümüyle kemik ve kırık yapımı artırılabilir (22). Kök hücrelerin farklılaşması, çeşitli fiziksel ve kimyasal stimülasyonlarla indüklenmektedir. Bu uygulamalardan bir tanesi de, DDLT uygulamasıdır. DDLT, ışınlanan hücrelerde sitoprotektif (hücre koruyucu) etki göstererek, MKH'lerin implante edildikleri bölgede daha uzun süre kalmalarını sağlar. Ayrıca, yerleştirildikleri dokuda kök hücrelerin çeşitli büyüme faktörleri salınımını artırarak rejeneratif olayların bir parçası olur (23).

Üzüm çekirdeği ekstresi (ÜÇE), bitkisel esaslı bir flavonoid türevidir. Son yıllarda ÜÇE'nin, terapötik etkileri ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmıştır; bunların sonucunda antiinflamatuar, antioksidan, antikanser, antidiyabetik, antialerjik, kardiyoprotektif, vazodilatör, kolesterol düşürücü, dermal yara iyileşmesinde

anjyogenezi stimule edici vb. etkilerinin olduğu bildirilmiştir (24). Ayrıca, g¼ncel literat¼rde ¼z¼m ¼ekirdeđi ekstresinin, kalsiyum ile birlikte alındığında kemik formasyonunu arttırdığını, osteoblastların farklılaşmasını hızlandırdığını, kemik rezorbsiyonunu inhibe ettiğini ve osteoporozis gibi pek ¼ok kemik hastalığının tedavisinde kullanılabileceğini g¼steren ¼alıřmalar mevcuttur (25, 26). Gelişmekte olan sı¼anlarda, ¼ÇE kullanımının mandibulaya etkisini değerlendiren bir ¼alıřmada, ¼ÇE'nin hem kemik formasyonunu, hem de kemik direncini arttırdığı g¼r¼lm¼řt¼r (27).

Bu ¼alıřmanın amacı, alt ¼eneyi ¼nde konumlandırılan fonksiyonel apareyler ile birlikte uygulanan ¼z¼m ¼ekirdeđi ekstresi, mezenkimal k¼k h¼cre ve d¼ř¼k doz lazer terapisinin, sı¼anlarda kondil b¼lgesindeki damarlanmaya ve yeni kemik oluşumuna etkilerinin incelenmesidir. Bu klinik uygulamalar ile, tedavi s¼resini uzatan fakt¼rlerin minimize edilebileceği ve ortodontik tedavi sonrası relaps oranının azaltılarak daha stabil sonu¼lar elde edilebileceği d¼ř¼n¼lmektedir. Bununla birlikte, istenen başarılı sonu¼lar daha kısa s¼rede elde edilerek hastanın apareyini daha kısa s¼re kullanması sağlanabilecektir. B¼ylece hasta kooperasyonuna duyulan ihtiya¼ azaltılarak, hem hastanın hem de hekimin komforu arttırılmış olacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik ve Kemik Hücreleri

Kemik, kemik yapım ve yıkımından sorumlu majör hücreler ile ekstrasellüler matriksten oluşan, %65'i mineral ve %35'i Tip 1 kollajen içeren, hayat boyu metabolik olarak aktif olan bir dokudur. Lokal ve sistemik faktörlerin etkisi altında, osteoblastlar sentezlenir, organize olur, organik matriks salgılar ve ardından mineralize olur. Ekstrasellüler matriksin %90'lık organik kısmını kollajen oluştururken; %10'luk kısmını proteoglikan ve osteonektin, osteopontin, bone sialoprotein ve osteokalsin gibi kemik morfogenetik proteinleri (BMPs) olarak da bilinen nonkollajenöz proteinler oluşturur. Bu proteinler, kemiğin devamlılığının sağlanmasında önemli olup mineralizasyonun düzenlenmesi, hücre-matriks bağlantısı, kemik apozisyon ve rezorpsiyon aşamalarının düzenlenmesinde rol alırlar (28).

2.1.1. Osteoblastlar

Osteoblastlar, metabolik olarak aktif, çapları 20-30 µm olan kübik mononükleer hücrelerdir (29). Mezenkim bağ dokusu orjinli osteoprogenitör hücrelerden köken almaktadırlar. Kemik yapım hücreleri olup osteoid mineralizasyonu, kemik turnover ve remodelinginden sorumludurlar. Protein sentezi, osteoid veya mineralize olmamış kemik matriksi sekresyonunda görevli olan gelişmiş bir golgi organeline ve kaba bir endoplazmik retikuluma sahiptirler (30). Osteoblastların tipik fenotipik özellikleri, Tip 1 kollajen üretimi ve Alkalen Fosfataz aktivitesindeki pozitif boyanmadır. Alkalen Fosfataz (AP), osteoblast farklılaşmasında önemli bir indikatördür. Kemik Alkalen Fosfataz enzimi, inorganik fosfatın seviyesini arttırarak ve hidroksiapatit formasyonunu baskılayan inorganik pirofosfat'ı inhibe ederek kemik mineralizasyonunda görev alır (31).

2.1.2. Osteoklastlar

Osteoklastlar, kemik yıkımından sorumlu çok çekirdekli dev hücrelerdir, genellikle kortikal ve trabeküler kemiklerin yüzeyinde veya Howship lakünlerinde bulunmaktadır. Osteoblast ve osteositlerden farklı olarak osteoklastlar, kemik iliğindeki hematopoetik tek çekirdekli hücrelerden köken alırlar (32). Salgıladıkları lizozomal enzimler aracılığıyla rezorpsiyon meydana getirirler.

2.1.3. Osteositler

Salgılanan organik matriksin kalsifiye olmasının ardından, osteoblastların ortalama %10-20'si osteosit adı verilen olgun kemik hücrelerine dönüşür ve metabolik faaliyetleri ciddi şekilde azalır (33). Osteositler, matriks bütünlüğünün sağlanması ve sinyal iletiminde rol alırlar. Bu hücreler öldüklerinde matrikste rezorpsiyon meydana gelir (34).

2.2. Fonksiyonel Adaptasyon ve Remodeling

İskelet sistemi, günlük aktiviteler sırasında meydana gelen moment ve kuvvetleri karşılamaktadır. İskeletin bu fonksiyonel kuvvetlere karşı olan adaptasyon yeteneği, yüzyıl önce fark edilmiş olup "Wolff Kanunları" olarak tarif edilmiştir (35). Kemik, çevredeki mekanik stimullara duyarlı olup adaptasyon gösterir. Bu yapısal değişim, genel olarak remodeling olarak ifade edilir. Remodeling, 1964 yılında Frost tarafından "A-R-F Sıralaması" şeklinde tanıtılmış olup sırasıyla Aktivasyon, Rezorpsiyon ve Formasyon şeklinde meydana gelmektedir (36).

Değişmiş yükler sonucunda kemikte görülen adaptasyon,

(1) Remodeling (ARF Sırasıyla) veya

(2) Modeling (AF- rezorpsiyon olmadan kemik yapımı) veya

(3) Rezorpsiyon (AR- yeterli kemik yapımı olmadan kemik yıkımı) sonucunda meydana gelir. Özetle, Remodeling tanımı ARF Sıralaması için kullanılırken, fonksiyonel adaptasyon daha genel bir tanımlamadır (36).

2.3. Kemik Formasyonu

Genel olarak iki çeşit kemikleşme mekanizması vardır ve bunlar arasındaki temel fark kıkırdak fazının olmasına (endokondral kemikleşme) veya olmamasına (intramembranöz kemikleşme) bağlıdır (37).

2.3.1. İntramembranöz kemikleşme

Herhangi bir kıkırdak öncül olmadan doğrudan primitif mezenkimin osteoblastlara farklılaşarak kemik matriksi sentezlemesiyle meydana gelir. Bu şekilde üretilen matriks, başlangıçta woven kemik yapısında olup düzensiz kollajen lifleri, büyük ve çok sayıda osteosit ve düzensiz kalsifikasyon odakları içerir. Daha sonra remodeling ve replasman ile lameller kemiğe dönüşür (37). Yassı kemiklerin çoğunun kemikleşmesi bu şekilde

olup kafatasının frontal ve pariyetal kemikleri ile oksipital, temporal, mandibula ve maksilla kemiklerinin bazı kısımları intramembranöz kemikleşme gösterir. Bu kemikleşme, mezenkim dokusunun yoğunlaştığı bölgelerde gerçekleştiği için bu isim verilmiştir (38).

2.3.2. Endokondral kemikleşme

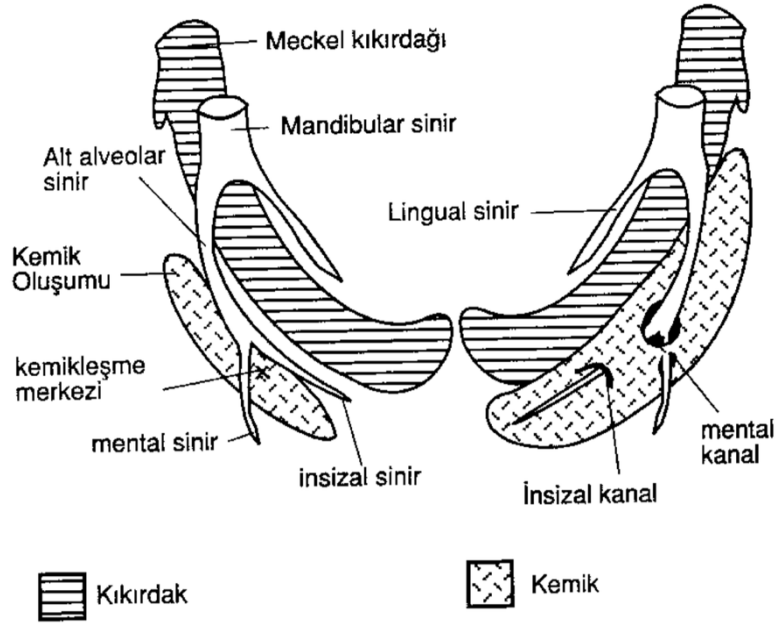
Mezenkimal hücreler, prekondroblastlara ardından da kondroblastlara farklılaşarak kıkırdak matriks sentezlerler. Kondroblastlar, aşama aşama matrikse gömülür ve kondrosit adını alır. Kıkırdakta interstisyel büyüme olur ve kondrositler arasında yeni matriks yapımı meydana gelir. Büyüme plağının Proliferasyon Tabakası, izogenik gruplar denilen kondrositlerin vertikal sütunlar halinde sıralanmasıyla karakterizedir. Bu genişlemiş plak, hücrelerin öldüğü Hipertrofik Tabakanın başladığı yere kadar devam eder. Bu fazda kıkırdak hücreleri, selektif olarak kalsifiye olur. Daha sonra osteoklastik rezorbsiyon başlayarak, osteoblastların yerleşebilmesi için kalsifiye kıkırdak dokuyu kaldırılır, bölgeye kan damarları göç eder ve bu kan damarlarının getirdiği farklılaşmamış bağ dokusu hücrelerinden osteoblastlar oluşur. Böylece, kemik yapımı başlamış olur (37). Kol, bacak, el ve ayak gibi uzun kemiklerin yanı sıra kafa kaidesi kemikleri ve alt çene kondili de endokondral kemikleşme göstermektedir (6).

2.4. Mandibulanın Büyüme ve Gelişimi

2.4.1. Prenatal dönem büyümesi

Mandibula, klavikuladan sonra vücutta ossifikasyonu başlayan ikinci kemiktir (39). Kafatası kemikleri içerisinde (kulak kemikçikleri dışında) bağımsız hareket eden tek kemiktir ve temporal kemikle artikülasyon yapar (39-41). Mandibula kondiler ünite, gövde (corpus), angular çıkıntı, alveolar çıkıntı ve çene ucu olmak üzere 5 ünite halinde büyüme gösterir (3).

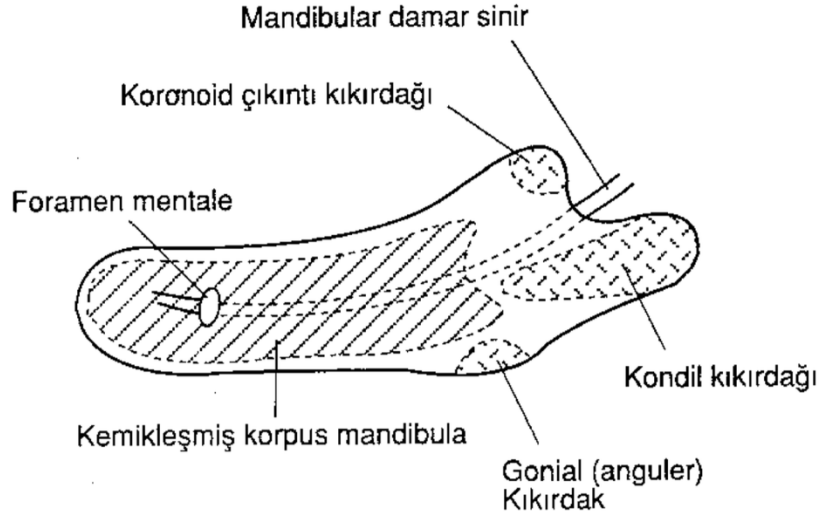
Mandibula, birinci mandibular arkın mandibular çıkıntısından bilateral olarak gelişir ve Meckel Kıkırdağı içerir. Gestasyonun 6. haftasında, Meckel kıkırdağının lateralindeki perikondriyal membranda ossifikasyon merkezi meydana gelir. Mandibular ossifikasyon, Meckel kıkırdağından değil, kıkırdağın lateralindeki membrandan meydana gelir (3).



Şekil 2.1. Meckel kıkırdağı ve mandibulanın kemikleşmesi (6)

Mandibulada mental simfizden distale doğru ve mandibular foramen bölgesinden proksimale doğru intramembranöz kemikleşme gerçekleşir. Meckel kıkırdağı dejenere olmaya başlar ve inferoalveolar nörovasküler demet, gelişen mandibulayı zarf gibi sarar. Gestasyonun 24. haftasında Meckel kıkırdağı tamamen ortadan kalkar (3).

Primer ossifikasyonun büyük bir kısmı, 12. haftada Angular, Koronoid ve Kondiler çıkıntılarda gerçekleşir. Kondiler çıkıntı, gestasyonun 10. haftasında görülmeye başlar ve temporal kemiğin skuamöz kısmıyla artikülasyon yapar. Bu artikülasyon, yaklaşık gestasyonun 12. haftasında temporamandibular eklem (TME) şeklinde görülür. 14. haftada, sekonder kıkırdaklar meydana gelir. Sekonder kıkırdak, hem intramembranöz kemik, hem hiyalin büyüme kıkırdağının histolojik ve fonksiyonel özelliklerini taşıyan özel tipte bir kıkırdaktır. Sekonder kıkırdak, intramembranöz kemikte gerilim ve stres alanlarında, hızlı büyüme gelişim gösteren kemiklerde bulunur (3). Mandibulada üçer adet ikincil kıkırdak kütlesi bulunmaktadır: Kondil kıkırdağı, Koronoid kıkırdak ve Gonial kıkırdak. Bunlardan ilk oluşanı ve en iri olanı, kondil kıkırdağıdır (6). Kondiler kıkırdak, mandibulanın dorsal kısmındaki hücresel blastemden şekillenir, havuç şeklindeki kıkırdak kanatları gelişir ve ramusa doğru ilerler. Bundan 2 hafta sonra, TME rahatça belirlenebilir. Mandibular kondiler kıkırdak, hem büyüme plağı, hem artiküler kıkırdak özelliği taşır ve mandibulanın büyümesinde oldukça önemlidir (3).



Şekil 2.2. Mandibulanın kıkırdak yapıları (6)

Kondil kıkırdağının dörtte üçü doğumdan önce endokondral olarak kemikleşir, ancak eklem tarafında kemikleşmeden kalan şerit şeklindeki kıkırdak parçası, doğumdan sonrada, çocuğun büyümesi bitinceye kadar, endokondral ossifikasyon ile alt çenenin büyüme ve gelişimini sağlar. Prenatal 4. ayda ortaya çıkan koronoid ve gonial kıkırdakların endokondral kemik yapımı ise, doğumdan önce sona erer ve bu kıkırdaklar, kemikleşerek ortadan kalkarlar (6).

Doğumda, mandibulanın iki yarısı mental simfiz bölgesinde, fibröz bir doku tarafından birbirinden ayrılmış durumdadır ve 1. senenin sonunda iki kısım birleşir. Çiğneme gibi fonksiyon farklılıkları, çene pozisyon ve hareketleri, mandibulanın büyümesini ve şeklini etkilemektedir. Mandibulanın korpusu, mandibular foramen den mental çıkıntıya kadar genişleyerek, mandibulanın çeşitli fonksiyonel komponentleri arasında destek ve yapısal bağlantı sağlar (3).

2.4.2. Postnatal dönem büyümesi

Ramus, doğumda oldukça kısa olup postnatal dönemde belirginleşir. Aynı zamanda, mandibular dişlerin sürmesi için gereken boşluk, korpusun büyümesiyle elde edilir (3).

Kondiler büyüme sonucu, mandibula aşağı ve ileri hareket eder. Doğumla birlikte, mandibular açı azalır ve ramus ile mandibulanın gövde kısmı belirginleşir. Kondiler

kıkırdak, 30'lu yaşların başlarına kadar aktif büyüme merkezi olarak varlığını sürdürür (39).

Doğum sonrası, mandibula daha hızlı büyür ve diş gelişimi ve mekanik kuvvetlerin sonucunda şeklinde meydana gelen değişiklikler, diğer kraniyofasiyal kemiklerinkinden fazladır (39). Mandibular büyüme, ilk yıl 15-18 mm, 2. yıl 8-9 mm, 3.yıl yavaşlayarak 5 mm civarında görülür. Çocukluk dönemi ve adölesan dönemde, kondil superior kısımlarda posterior kısımlara göre daha fazla büyüme gösterir. Her 1 mm'lik posterior büyüme karşılık, 8-9 mm superior büyüme görülür. Kondil, ortalama olarak kadınlarda senede 2-2.5 mm ve erkeklerde 2.5-3 mm büyüme gösterir. Yaklaşık her 3 mm'lik superior kondiler büyüme için gonionda yaklaşık 1 mm'lik rezorpsiyon meydana gelir (42).

Mandibula, kraniyofasiyal kompleks içerisinde büyüme potansiyeline en fazla sahip olan yapıdır (3). Enlow and Harris, mandibulanın postnatal gelişimi üzerine çalışmışlardır ve mandibulanın oranlarındaki artışın, kemikte gerçekleşen bir seri apozisyon ve rezorpsiyon sonucunda olduğunu fark etmişlerdir (43).

Charles, kondil başında meydana gelen büyümenin, mandibular büyümeden sorumlu olduğunu bildirmiştir. Bu geleneksel yaklaşıma göre, kondil primer büyüme merkezidir ve intrinsik faktörlerle kontrol edilir, endokondral kemikleşme meydana gelir (44). Erken dönem teorilerine göre, kondildeki endokondral kemikleşme, mandibulanın aşağı ve ileri yer değiştirmesinde etkili olduğu gibi, mandibulanın boyutlarının artmasını da sağlar (1).

Moss (45) ise, Charles (44) ve destekçilerinin aksine, Fonksiyonel Matriks Teorisini geliştirmiştir. Bu teori, iskeletin orijin, büyüme ve devamlılığının sağlanmasında fonksiyonel matriksin yani iskeletle ilgili doku, organ ve boşlukların etkili olduğunu bildirmiştir. Bu teori ile, kondil büyüme yeri olarak tariflenmeye başlamıştır. Fonksiyonel Matriks Teorisine göre, ekstrinsik faktörler kondil büyümesini kontrol eder. Yani, mandibular büyüme, oral kavitenin fonksiyonlarına ve onu çevreleyen kaslara yanıt olarak meydana gelir (45).

Özetle, kondildeki sekonder kırıkdağın ossifikasyon ve proliferasyonu ile tüm yüzey boyunca kemiklerde meydana gelen remodeling ve differansiyal formasyon sonucu mandibula boyut olarak artış gösterir. Posterior bölgedeki inferior yer değiştirme, anteriordan fazla olduğu için mandibula ileri rotasyon yapar (3).

2.5. Mandibular Kondil

Yetişkinlerde kondilin mediolateral uzunluğu 15-20 mm olup anteroposterior genişliği 8-10 mm'dir (46). Subkondral kemik içerisinde süngerimsi kemik ve vasküler kanallar yer almaktadır. Subkondral kemik, endokondral kemikleşme gösterir ve altındaki artiküler kırıkdağa yapısal destek sağlar . Besinler ya da sitokinler subkondral kemikten transport edilir, yani subkondral kemik, kırıkdağın metabolizmasını etkiler. Ayrıca, çok absorpsiyonunu sağlar (47).

Mandibular kondilin artikülasyon yüzeyi ise, kırıkdağla kaplıdır, kollajen ve proteoglikan içermektedir. Kırıkdağın sinir, kan damarı ve lenfatik sistem içermez; matriksteği glikozaminoglikanlar (GAG) ve su, besinlerin ve metabolizma artıklarının diffüzyonuna izin verir (48).

2.5.1. Mandibular kondilin histomorfolojisi

Kondil, mandibulanın adaptasyon, fonksiyon ve büyümesinde önemli bir yere sahiptir. Kondil, mekanik, fonksiyonel ve hormonal uyarılara yüksek miktarda cevap oluşturmaktadır (3).

Büyümekte olan hayvanlarda mandibular kondil, sadece artiküler kırıkdağ olarak görev yapmaz, aynı zamanda büyüme kırıkdağıdır (49). Ramirez-Yañez ve ark. (50), maturasyonun farklı aşamalarında bulunan kondrositlerden oluşan 4 farklı tabaka olduğunu ifade etmişlerdir: Superior Artiküler Tabaka (Fibröz Hücre Tabakası olarak da bilinir), Polimorfik (ya da Proliferatif) Tabaka, Olgun Tabaka ve Hipertrofik Tabaka (50).

Graber ve ark. (3) ise, TME'nin sekonder kırıkdağını genel olarak 2 tabakaya ayırır: 1) Artiküler Tabaka ve 2) Subartiküler Büyüme Tabakası.

Artiküler Tabaka, artiküler yüzeye paralel dizilmiş kollajen liflere sahip yoğun avasküler fibroelastik bağ dokusu içerir (3). Artiküler Tabaka, en dışta yer alıp çenenin kayma ve sürtünme hareketlerini karşılar. Fibroblast benzeri hücrelerden oluşmuştur. Çiğneme esnasında kompresif kuvvetlerin geldiği temporal kemiğin artiküler kısımları ve kondilin superiorunda kalınlığı artar (51).

Subartiküler kondiler kıkırdak, iskelet dokusunun gelişim ve maturasyonu ile ilgili bir seri tabaka içermektedir. Proliferatif veya Prekondroblastik Tabaka, Artiküler Tabakanın hemen altında olup periostal membranın osteojenik tabakasıyla devam eder. Dış kısmında, farklılaşmamış mezenkimal hücreler bulunmakta olup bunlar daha sonra skeloblastik kök hücrelere veya prekondroblastlara farklılaşacaklardır (3). Bu hücreler, aynı zamanda kondiler kıkırdak için rezervuardır. Proliferatif Tabaka, çevre uyaranlara karşı adaptasyon sağlanmasında oldukça önemlidir (52).

Kondroblastik Tabaka, 2 tane alt tabakaya ayrılır; Olgun (Maturasyon) Tabaka ve Hipertrofik Tabaka. Bu tabakada büyük, sferik, olgun kondrositler yer alır. Bu hücreler, hipertrofik olup çekirdekleri piknotiktir. Hipertrofik hücrelerin, 3-5 sıra distalinde hücreler arası matriks mineralize olmaya başlar. Daha derindeki tabakalarda ise, kemik ve kemik iliği boşlukları kıkırdak ile yer değiştirir (3).

2.5.2. Mandibular kondilin büyüme mekanizması

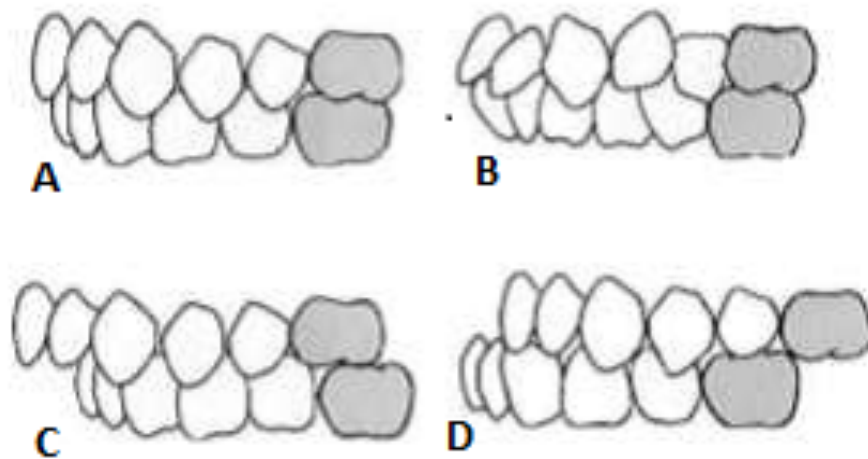
Kondil kıkırdağının büyüme ve gelişiminde çeşitli aşamalar bulunmaktadır. Öncelikle farklılaşmamış mezenkim hücreleri, Proliferatif Tabakada kondrositlere dönüşür. Bunu Hipertrofik Tabakada, kondrositlerin hipertrofisi ve kıkırdak matriksin mineralizasyonu izler. Kalsifiye matriks rezorbe olur ve vasküler invazyona yer açmak için Hipertrofik Tabakadaki matriksin büyük bir bölümü yıkılır. Osteoblastlara farklılaşacak olan kemik iliği kök hücreleri ve osteojenik progenitörler, invaze olan kapiller aracılığıyla bu bölgeye gelirler. Son olarak ise, bu Hipertrofik Tabakanın altında kemik oluşumu meydana gelir (53).

Büyüme sırasında kondildeki hücrelerden sentezlenen, endojen faktörlerle ifade edilen bir takım olaylar dizisi mevcuttur. Kondrosit ve kondroprogenitor hücrelerden sentezlenen Sox9, kondrositlerin farklılaşmasını ve kıkırdak matriks formasyonunu düzenler. Kondrositlerin maturasyonundan sonra, hipertrofik kondrositler tarafından,

endokondral ossifikasyonun başlaması için öncül olan Tip X kollajen oluşturulur. Endokondral ossifikasyon sırasında hipertrofik kondrositler, Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF) sentezler ve VEGF, maksimum kemik yapımı esnasında pik yapar. Kondrositler ve osteoblastlarda bulunan Core Binding Factor alpha 1 (Cbfa1), kondrositlerin maturasyonu, kemik matriksi depozisyonu ve osteoblastların farklılaşması aşamalarında görevlidir. Mandibulayı öne getiren Bite Jumping Apareyi, Parathroid hormon-related protein (PTHrP), Indian hedgehog (Ihh), VEGF, Sox9, Tip X ve Tip II kollajen ekspresyonunu stimule ederek mandibular kondiler büyümeyi yönlendirir (54).

2.6. Maloklüzyonlar

Maloklüzyon, dişlerin hatalı dizilimi, çenelerin malpozisyonu veya bunların kombinasyonunu içerir; şiddetine göre kişinin yüz estetiğini etkiler. Modern ortodontinin babası Dr. Edward Angle, 1900'lü yılların başında, 1. molarların pozisyonuna göre ideal dental oklüzyonu tariflemiştir. İdeal dental ilişkide, üst 1. moların meziobukkal kusp tepesi, mandibular 1. moların bukkal oluşuna oturur. Sınıf I maloklüzyonda, ideal molar ilişki mevcutken çarpışıklık veya diastemalar görülebilir. Sınıf II hastalarda ise; mandibular dişler, karşıt maksiller dişlerin daha distalinde konumlanmış olup, Sınıf III maloklüzyonda; mandibular dişler, maksiller dentisyonun mezialinde konumlanır (55).



Şekil 2.3. A) Sınıf I oklüzyon B) Sınıf I maloklüzyonu C) Sınıf II maloklüzyonu D) Sınıf III maloklüzyonu (56)

2.6.1. Sınıf II maloklüzyonların prevalansı

Sınıf II maloklüzyonlar, ortodonti kliniğinde en yaygın görülen maloklüzyonlardan birisidir (5). Mandibular retrüzyon, Sınıf II maloklüzyonların en yaygın karakteristiğidir. Sınıf II maloklüzyona sahip beyaz populasyonun %80'inde problem mandibular retrüzyondur. Geri kalan %20'sinde ise, problem maksiller gelişim fazlalığıdır (56, 57).

1989-1994 yılları arasında ABD'de yapılan "Ulusal Sağlık ve Beslenme Değerlendirme Çalışması"nda çocuk (8-11 yaş arası), genç (12-17 yaş arası) ve yetişkinlerde (18-50 yaş arası) maloklüzyon epidemiyolojisini belirlemek amacıyla, 14.000 bireyden veriler elde edilmiştir. Bulgulara göre, çocuk ve gençlerin %30'u normal oklüzyona, %50-55'i Sınıf I maloklüzyona, yaklaşık %15'i Sınıf II maloklüzyona ve %1'den azı ise Sınıf III maloklüzyona sahiptir (56). Proffit ve ark. ise yapmış oldukları çalışmada, ortodontik tedavi görenlerde Sınıf II maloklüzyon prevalansın ortalama %20-30 olduğunu bildirmişlerdir (5).

7 mm ve üzeri overjete sahip şiddetli Sınıf II maloklüzyonlu bireyler, Amerika Birleşik Devletlerinin yaklaşık 1 milyonluk nüfusunu oluşturmaktadır ve bu rakama, her yıl ortalama 24,000 yeni vaka eklenmektedir (58).

2.6.2. Sınıf II maloklüzyonların etiyojisi

Sınıf II maloklüzyonlar, multifaktöriyel etiyojiye sahip olup; ailesel geçiş, deformiteler, irksal karakteristikler, genetik ve kraniyofasiyal kompleksteki kemiklerin büyüklük ve pozisyonu gibi faktörlerin iskeletsel büyümeyi etkilemesi sonucu meydana gelebilir (40).

Ionescu ve ark. çevresel etkenlerin kraniyofasiyal yapılar üzerinde önemli bir role sahip olduğunu bildirmiştir. Çevresel etkenler, çiğneme kaslarının gelişimini etkileyen çiğneme bozuklukları, solunum, yutkunma, konuşma gibi fonksiyon anormalileri, parmak emme, dudak emme, dilin yanlış konumlandırılması gibi zararlı alışkanlıklar şeklinde 3 ana başlığa ayrılabilir (59). Dil ve dudaklardaki dengesiz kas kuvveti, üst keserlerin proklinasyonuna veya alt keserlerin retroklinasyonuna neden olarak overjet dediğimiz alt ve üst keserler arasındaki mesafenin artmasına neden olabilir (60).

İlaçlar, alkol ve virüsler gibi teratojenler de kraniyofasiyal gelişimi etkilemektedir. İntrauterin dönemde veya büyüme gelişim sırasında meydana gelen travmalar, anormal çene gelişimine neden olabilmektedir (56). Kronik hastalıklar, uzamış açlık durumları veya aşırı stres, büyüme gelişimi etkileyen diğer faktörlerdendir. Alerjiler, büyük tonsiller gibi nazofarengal havayolunu etkileyen faktörler de maloklüzyonun diğer nedenleri arasında yer almaktadır (59).

2.6.3. Sınıf II maloklüzyonların özellikleri

Sınıf II maloklüzyonlar, maksiller ve mandibular dental arklar arasındaki antero-posterior yöndeki uyumsuzluklarla karakterizedir. Maloklüzyonun şiddeti, çeşitli dental ve iskeletsel faktörlere bağlı olarak değişiklik gösterebilir (61).

McNamara'nın 1981 yılında yaptığı çalışmada, dental olarak Sınıf II divizyon 1 ve 2 maloklüzyona sahip 8-10 yaşları arasındaki çocuklara ait 277 sefalometrik film değerlendirilmiştir. Vakaların ortalama %10'unda retrüviz mandibula, normal konumda maksilla, normal pozisyonda maksiller ve mandibular dişler ile artmış vertikal yüz yüksekliği olduğu bulunmuştur. Bu vertikal yüz yüksekliği artışına, daha çok anteriorda rastlanıldığı rapor edilmiştir. McNamara bu çalışmayla, Sınıf II maloklüzyonların, daha çok mandibular yetmezlikten kaynaklandığını bildirmiştir (57). Bu nedenle, tedavi seçenekleri maksiller distalizasyondan çok mandibular ilerletmeyi gerektirmektedir ve farklı fonksiyonel aparey tipleriyle mandibular büyüme arttırılabilir (62).

Alt çene geriliğine bağlı Sınıf II maloklüzyonlarda genel olarak, konveks bir profil, normal nazolabial açı, prokline maksillar kesiciler, protrüze alt dudak ve belirgin bir labiomentel kıvrım mevcuttur. Ayrıca mandibula, geriye ve aşağı rotasyon yaparak, kısa ramus yüksekliğine ve mandibular düzlem açısının artmasına yol açar (63).

2.6.4. Sınıf II maloklüzyonların tedavi seçenekleri

Tedavi seçenekleri yaşa, maloklüzyonun şiddetine, hastanın büyüme potansiyeline ve şikayetine göre çeşitlilik göstermektedir. Bazı tedavi protokolleri, üst molarların distalizasyonu ve üst premolarların çekimi gibi maksiller dental arkın tedavisine odaklanırken; fonksiyonel apareylerle mandibulanın büyümesinin stimüle edilmesini ve

iskeletsel olarak mandibulanın ileri atılımını hedefleyen tedavi seçenekleri de mevcuttur (58).

1920 yılında Angle ve takipçileri Sınıf II hastaların tedavisinde sınıf II elastikleri kullanmaya başlamışlardır. Onlara göre sınıf II elastikler, dental değişikliklerin yanı sıra, mandibulanın büyüme gelişimini uyarmakta ve maksillaninkini ise frenlemektedir (56). Charles Tweed de, Angle'ın görüşünü destekler nitelikte çekime karşı çıkmış ve çekimden uzak durmuştur; fakat, takip eden yıllarda başarısız sonuçlar ve yüksek nüks oranları olduğunu görmüştür. Ardından Tweed 1940 yılında, diş çekimi seçeneğini sunmuş ve çekim, Sınıf II maloklüzyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır (3).

Son dönemlerde, geçici ankraj aygıtları (TAD) gibi yeni nesil tedavi metodları da kullanılmaktadır. Özelleşmiş kemik vidaları ya da mini plaklar ile iskeletsel ankraj sağlanabilir ve cerrahi prosedürlere olan ihtiyaç azaltılabilir (64).

Şiddetli iskeletsel uyumsuzluk bulunan hastalarda ise, ortodontik tedavi tek başına yeterli olmayabilir ve ortognatik cerrahi gerekebilir (58).

2.6.4.1. Maksiller distalizasyon

Sınıf II maloklüzyonların en eski tedavi seçeneklerinden birisi, ekstraoral ankraj ile maksillanın distalizasyonudur (56). Headgearin hem iskeletsel, hem de dental etkileri bulunmaktadır. Headgear, son derece güvenli ve efektif bir aparey olsa da, bazı olumsuz özelliklere sahiptir. Yan etkilerinden birisi, maksiller molarların ekstrüzyonudur (65).

Maksilla, sefalometride iyi pozisyondaysa ve yumuşak doku profili iyiye, ortopedik etkiye daha az ihtiyaç duyulur. Eğer maksiller molarların sadece dental olarak distalizasyonu gerekliyse, Pendulum, Magnets, Wilson distalizasyon arkları gibi hareketli veya sabit apareyler kullanılabilir (56).

2.6.4.2. Mandibular protraksiyon

Bazı hastalarda, maksilla ideal pozisyondayken, mandibulada yetersizlik mevcuttur ve bu, yumuşak doku profiline de yansımaktadır. Bu durumda ideal tedavi şekli, mandibulanın ileri alınmasıdır. Eğer Sınıf II maloklüzyon hafifse, iyi kullanılmış

elastikler tam bir düzelme sağlayabilir. Hastaya Twin Block, Bionator ve Frankel gibi bazı hareketli apareyler kullanılabilir. Bu tedavi seçeneklerinin hepsinde, ideal Sınıf I kanin ve molar ilişkisinin sağlanabilmesi için hastanın kooperasyonu gerekmektedir (56).

2.7. Fonksiyonel Apareyler

2.7.1. Tanım ve tarihçe

Fonksiyonel apareyler, mandibulayı aşağıda ve önde konumlandırarak mandibular büyümeyi arttıran bir grup aparey olarak tarif edilebilir. 1879 yılında Kingsley, “Bite jumping apareyi” olarak adlandırılan diş destekli bir aparey geliştirmiş olup, alt çeneyi önde tutmayı amaçlamıştır. Kingsley’in bu tasarımı, literatürde en eski fonksiyonel aparey olarak kabul edilmektedir (66).

2.7.2. Fonksiyonel apareylerin tedavi zamanlaması

2000 yılında Baccetti ve ark.’nın (67), fonksiyonel apareylerin iskeletsel ve dental etkilerini sefalometrik olarak karşılaştırdıkları çalışmada, Sınıf II hasta gruplarına büyüme atılım döneminde veya öncesinde Twin-Block apareyi uygulanmıştır. Bu çalışmaya göre, Sınıf II maloklüzyonların fonksiyonel tedavisinde en ideal tedavi zamanı, büyüme hızının pik yaptığı pubertal dönemdir. Çeşitli çalışmalarda, pubertal dönemde yapılan fonksiyonel tedavilerin, daha erken yaşlarda yapılan tedavilere göre daha başarılı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir. Pubertal dönemde yapılan fonksiyonel tedavi ile molar ilişkisinin iskeletsel olarak düzeltiminin daha fazla olduğu, kondilin daha fazla posterior büyüme gösterdiği, ramus yüksekliği ve mandibular uzunluğun daha fazla arttığı bildirilmiştir (68).

Günümüzdeki çalışmalar, tedavi etkilerinin maksimum olması ve tedavi sonrası retansiyon süresinin kısaltılması için tedavi zamanlamasının çok önemli olduğunu belirtmektedir (67).

2.7.3. Sınıf II maloklüzyonlarda fonksiyonel apareylerin mekanizması

Fonksiyonel apareyler, kondiler büyümeyi yeniden yönlendirerek etki gösterirler. Baccetti ve ark. (Twin-Block) ve Fatlin ve ark. (Bionator) tarafından gerçekleştirilen her iki çalışmada da, fonksiyonel aparey tedavisinin ardından kondilin, condylon noktası üzerinden geçerek posterior repozisyon yaptığı rapor edilmiştir (67, 69). Baccetti ve ark.

pubertal pik döneminde Twin-Block kullanan hastalarda, kondilin superio-posterior yönde büyüdüğünü ve daha posteriora olacak şekilde yeniden konumlandığını bulmuşlardır. Ayrıca, kondilin bu pozisyonel değişiminin gonial açının artmasıyla sonuçlandığını ve total mandibular uzunlukta artış meydana geldiğini bildirmişlerdir (67).

Fonksiyonel apearelerle mandibula, öne getirilerek mandibular kondilin fossaya doğru ilave büyüme göstermesi beklenir. Yumuşak dokuların elastisitesi, maksillaya karşı reaktif kuvvet oluşturur ve maksiller büyümeyi kısıtlar (70). İskeletsel etkiye ek olarak, fonksiyonel apeareler alt dentisyonda protrüziv kuvvet oluşturur ve üst dentisyonda retraksiyon kuvvetleri meydana gelir.

Sınıf II maloklüzyonların fonksiyonel apeareler ile tedavisinde diğer bir teori ise, iskeletsel değişimden ziyade alveolar kemiğin kayması şeklinde dental değişimin olduğuna dairdir. Baccetti ve ark. Twin-Block apeareyi artmış overjete sahip büyüme atılım evresinde olan hastalarda kullanmışlar ve overjet düzeltiminin hem iskeletsel (%54), hem dental (%46) olarak sağlandığını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada, aktif fonksiyonel tedavinin ardından mandibular keserlerde proklinasyon artışı gözlenmiştir (67).

Diğer bir alternatif görüş ise fonksiyonel apearelerin mandibular büyümeyi teşvik etmesidir. Cozza ve ark. karşılaştırılan 32 grubun 23'ünde mandibular uzunluğun (Co-Gn/Pg) klinik olarak önemli miktarda arttığını (yaklaşık 2 mm) bildirmiştir (71). Chen ve ark. ise, Co-Gn veya Co-Pg uzunluklarına baktığında, kontrol ve tedavi grupları arasında fark olmadığını rapor etmiştir (72). Birbirine ters bu sonuçlar, hasta popülasyonunun büyüme mekanizmalarındaki değişkenliğe bağlı olabilir (71).

2.7.4. Fonksiyonel apearelerin sınıflaması

Fonksiyonel apeareler, sabit veya hareketli intraoral apearelerdir. Genel olarak 3 gruba ayrılırlar:

Tip I: Doku destekli hareketli apeareler olup sadece Frankel Fonksiyonel apeareyi bu gruptadır (73).

Tip II: Diş destekli hareketli apareylerdir ve aktivatör, bianator ve twin-block apareyleri bu gruptadır. İskeletsel ve dental etkiler amacıyla kullanılmakta olup mandibula, apareylerle aşağı ve önde tutulur. Kaslarda mandibulayı orjinal konumuna getirmek için aktivite artışı meydana gelir ve bu da yumuşak dokularda gerilme meydana getirir (70).

Tip III: Diş destekli sabit apareylerdir ve Herbst, MARA, Jasper Jumper, Forsus FRD Sabbagh Universal Spring (SUS) bu grupta yer almaktadır (61).

2.7.4.1. Monoblok apareyi

1902 yılında, Pierre Robin tarafından glossoptosis sendromlu hastaların tedavisi için geliştirilmiştir. Kingsley'in plağına benzemekte olup lingual kaideler içermektedir (66).

2.7.4.2. Aktivatör

1935 yılında Andresen ve Häupl, "Norwegian Sistemi" olarak bilinen tasarımlarını tanıtmışlardır. Aparey, dudak ve dil ile aktive edildiği için aktivatör ismi verilmiştir. Fonksiyonel uyarılar, apareyler aracılığıyla dişlere ve iskelet sistemine iletilmektedir (66).

Aktivator, morfolojik diş anomalisi olan hastalarda, yaş ve dental gelişim safhalarından bağımsız olarak kullanılabilir (3).

2.7.4.3. Bionator

1964 yılında, Balters tarafından Andresen'in apareyinden daha az hacimli olacak şekilde modifiye edilmiştir. Balters, apareyin hacmini azaltarak hastaların daha rahat takmalarını sağlamıştır, böylece hastalar, apareyi hem geceleri, hem de gündüzleri takabilmişlerdir. Bu apareylerin kullanılabilmesi, stomatognatik sistemin doğal uyarılarına bağlı olduğu için, hastalarda musküler disfonksiyonun olmaması gerekmektedir (66).

2.7.4.4. Fonksiyonel Regülatör

Fränkel apareyi, Rolf Frankel tarafından 1957 yılında geliştirilmiş olup tek gerçek doku destekli apareydir. Bu aparey, II. Dünya Savaşı'ndaki askerlerde kullanılarak geliştirilmiş olup, tedavi sonrasında stabil sonuçların elde edilebilmesi için öncelikle

orofasiyel ve nöromusküler sistemin düzeltilmesi gerektiğini savunmuştur (74). İstlenen iskeletsel değişikliklerin ancak nöromusküler sistemin normal fonksiyonunun sağlanmasıyla elde edileceğine inanmıştır. Bu apareylerin dezavantajı, Bianator ve Aktivatörden daha hacimli olması ve daha fazla tel dizaynı içerdiği için distorsiyona daha yatkın olmasıdır (75).

Frankel 2 apareyi, Sınıf II maloklüzyonların tedavisi için kullanılan türüdür. Mandibulayı ileride konumlandırılan bu aparey, bukkal yastıkları aracılığıyla bukkal kasların baskısını azaltırken, labial arklar aracılığıyla da alt dudağın baskısını kısıtlar. Frankel, apareyin dudak ve yanak egzersizleriyle kullanılmasını önermiş ve apareyin gündüzleri de kullanılmasının gerekli olduğunu vurgulamıştır (3).

2.7.4.5. Twin Block

1977 yılında William J. Clark, alt ve üst posterior dişleri kaplayan 2 ayrı plaktan oluşan ve 45-70° açıyla birbirine temas eden okluzal ısırma blokları içeren Twin Block apareyini tanıtmıştır (76). Üst ısırma blokları, üst 2. premolarların mezial kenarına kadar uzatılarak bukkal segmentin okluzal yüzeyini kaplar. Alt ısırma blokları ise, alt 2. premolarların distal kenarına kadar uzatılır. Isırma blokları temas ettiğinde, istenen proprioseptif uyaran oluşur ve mandibula öne getirilerek büyümesi uyarılır. Apareyin konforlu yapısı nedeniyle, tüm gün takılabilmesi ve hastanın kolayca alışması mümkündür. Kilit mekanizmaları, mandibular hareketlere izin verdiği için çiğneme esnasında da kullanılabilir. Bu durum, ortopedik kuvveti artırır ve tedaviye yanıtı iyileştirir.

Twin Block tedavisi 2 aşama içerir. Birincisi aktif faz, ikincisi ise destekleme fazıdır. Aktif faz yaklaşık 6-12 ay sürmekte olup sagittal ark ilişkilerini düzeltilir. Molar ilişkileri bu aşamanın sonunda Sınıf I ilişkiye getirilir, fakat bazen premolar bölgesinde lateral open bite'lar oluşabilir (76). İkinci aşamada ise amaç, oklüzyonun oturmasını ve elde edilen düzelmenin devamlılığının sağlanmasıdır. Bu faz yaklaşık 4-6 ay sürer ve bunu 3-6 aylık retansiyon periyodu takip eder (77). Tedavinin etkili olabilmesi için hastanın apareyini düzgün kullanması çok önemlidir. Bu nedenle, kooperasyon problemi olan hastalar için, aparey yapıştırılarak sabit olarak da kullanılabilir (76).

2.7.5. Fonksiyonel apareyler ile Sınıf II düzeltiminde iskeletsel ve dental etkiler

2.7.5.1. Hayvan çalışmalarında tedavinin etkileri

Son yıllarda fonksiyonel apareylerin mandibular büyümeye etkileriyle ilgili pek çok hayvan çalışması yapılmıştır. 1984 yılında Hinton ve McNamara, maymunlarda yaptıkları çalışmada, mandibulanın önde konumlandırılmasıyla glenoid fossanın posteriorunda kemik yapımı ve temporal kemikte adaptasyon olduğunu göstermişlerdir (78). Yapılan çeşitli hayvan çalışmalarının sonuçları, fonksiyonel değişimlere bağlı olarak iskeletsel adaptasyon meydana geldiğini desteklemektedir. İyi bir okluzal kapanış elde edildikten veya büyüme tamamlandıktan sonra apareyler çıkarıldığında, uzun dönemde bu adaptif değişimlerin stabil olduğu rapor edilmiştir (68).

2.7.5.2. Klinik çalışmalarda tedavinin etkileri

Sınıf II maloklüzyonların fonksiyonel apareylerle düzeltimiyle şunlar elde edilmektedir:

- Maksillanın öne büyümesi sınırlandırılır,
- Maksiller molarların mezial hareketi engellenir veya distalizasyonu sağlanır,
- Maksiller keserlerin retroklinasyonu ve mandibular uzunluk artışı sağlanır,
- Mandibular molarların mezial hareketi ve mandibular keserlerin proklinasyonu sağlanır.

“Headger-etkisi” olarak tariflenen maksiller büyümenin sınırlandırılması, kullanılan fonksiyonel apareyin tipine bağlıdır. Mills ve McCulloch, Twin Block tedavisinin SNA açısını azalttığını göstermiştir (79). Çalışmaların çoğunda kontrol grubuna göre Twin Block apareylerinin mandibular uzunluğu 2-4.2 mm arttırdığı (79), Herbst apareyinin ise 1.3-3.5 mm arttırdığı bildirilmiştir (80). Çeşitli çalışmalar, fonksiyonel aparey tedavilerinin ardından, mandibular molarların 1.2-1.7 mm mezial hareket ve mandibular keserlerin 1.8-7.9° proklinasyon gösterdiğini bildirmiştir (79).

2.8. Lazer

2.8.1. Lazerin tanımı ve tarihçesi

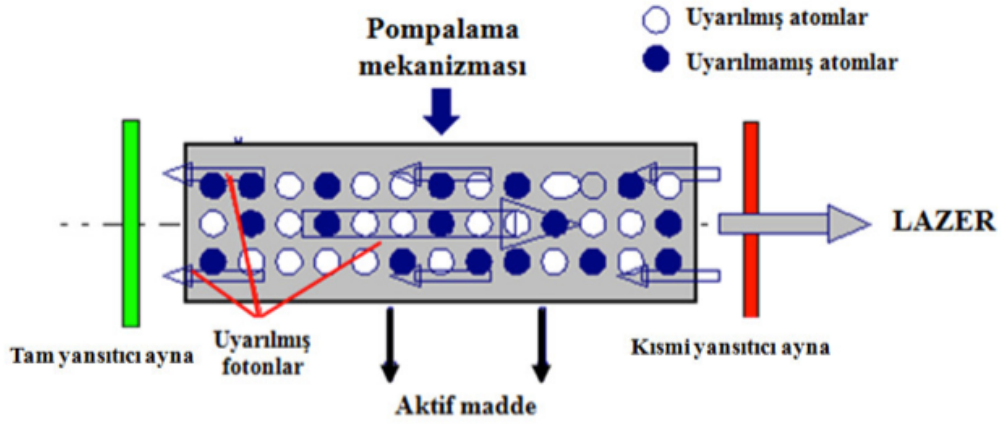
“Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation”, yani “Radyasyonun uyarılmış emisyonu ile ışığın güçlendirilmesi” (81) kelimelerinin baş harflerinden meydana gelen lazer tanımı, 1957 yılında Gordon Gould tarafından yapılmış olup elektromanyetik radyasyonun kısa dalga boyu ve odağındaki formu olarak tarif edilmiştir (82).

1916 yılında Einstein, uyarılmış salınımı tanımlayarak lazer kavramının temellerini atmıştır. 1958 yılına kadar teorik bilgi seviyesinde kalan lazer kavramı, Schalow ve Townes tarafından MASER (Microwave Amplification by Stimulated Emission of Radiation) teorisinin tanımlanmasıyla önem kazanmaya başlamıştır (83). Deneysel olarak ilk lazer, 1960 yılında Theodore Harold Mainman tarafından, kromiyum oksit ile kaplı alüminyum oksitten yapılmış sentetik bir yakut (ruby) kristalinden üretilmiştir. Tıpta çeşitli amaçlarla kullanılmakta olan lazer sistemleri, 1990 yılında Amerikalı diş hekimi Terry Myers’in, Neodmiyum: Yttrium Alüminyum Garnet (Nd:YAG) lazeri geliştirmesiyle birlikte diş hekimliğinde de kullanılmaya başlanmıştır (84).

2.8.2. Temel lazer fiziği

Uzayda yayılım gösteren bir enerji olan elektromanyetik radyasyonun, en küçük formuna foton denmekte olup frekans ve dalga boyu ile ifade edilmektedir (85). Atomların enerji absorbe etmeleri sonucu daha yüksek enerji düzeyine çıkma özelliği, lazerlerin çalışma mekanizması için çok önemlidir. Pompalama sistemi ile dışarıdan aktarılan enerji, aktif maddeyi uyarır ve atomları kararsız hale getirir. Atomların elektronları bir üst seviyeye çıkar ve eski seviyelerine dönerken foton yayarlar (86). Belirli bir enerjiye sahip foton, uyarılmış bir atoma çarparsa bu foton ikinci atomun da uyarılmasına yol açar. Böylece ikinci foton, kendisine çarpan ilk fotonla aynı enerjiye ve aynı hareket yönüne ulaşır. Söz konusu enerji transferinde oluşan fotonlar, eşit enerji düzeyine ve frekansa sahip olup aynı yönde hareket ederler. Böylece lazer, diğer ışık kaynaklarından farklı olarak monokromatizm, kolimasyon ve koherens özelliklerini bir arada bulunduran yüksek bir enerji kaynağı haline gelir (84, 85, 87).

Lazer sistemleri temel olarak aktif maddeyi içeren rezonans odası (optik kavite), pompalama sistemi ve optik parçalardan oluşurlar. Bu parçalar dışında cihazlar soğutma sistemi, iletim apareyi vs. gibi mekanik parçalara da sahiptirler (84, 88).



Şekil 2.4. Lazerin oluşumu (84)

2.8.3. Lazer ışınlarının temel özellikleri

2.8.3.1. Monokromatizm

Lazer kaynağının ürettiği ışık tek bir dalga boyundan ve tek renkten oluşur, buna lazerin monokromatik özelliği denir. Lazerin biyolojik ve klinik etkileri açısından bu özellik oldukça önemlidir (85).

2.8.3.2. Kollimasyon

Lazer ışığı, kaynağından çıktıktan sonra şekli ve doğrultusunda herhangi bir değişiklik olmadan aynı yönde hareket eder ve bu, lazer ışığını oluşturan tüm dalgaların birbirine paralel olmasından kaynaklanır (85). Lazer ışını doğrusal, güçlü ve konsantredir. Buna lazerin paralellik özelliği denir (84). Bu özellik, küçük odak alanlarına bile yüksek enerji iletimi yapabilmesini sağlar (85).

2.8.3.3. Kohorens

Lazer ışığı koherenttir ve bütün fotonlar aynı fazda bulunur (84). Kohorens terimi, lazer kaynağından çıkan tüm ışık dalgalarının eş fazlı bir ışık demeti oluşturduklarını

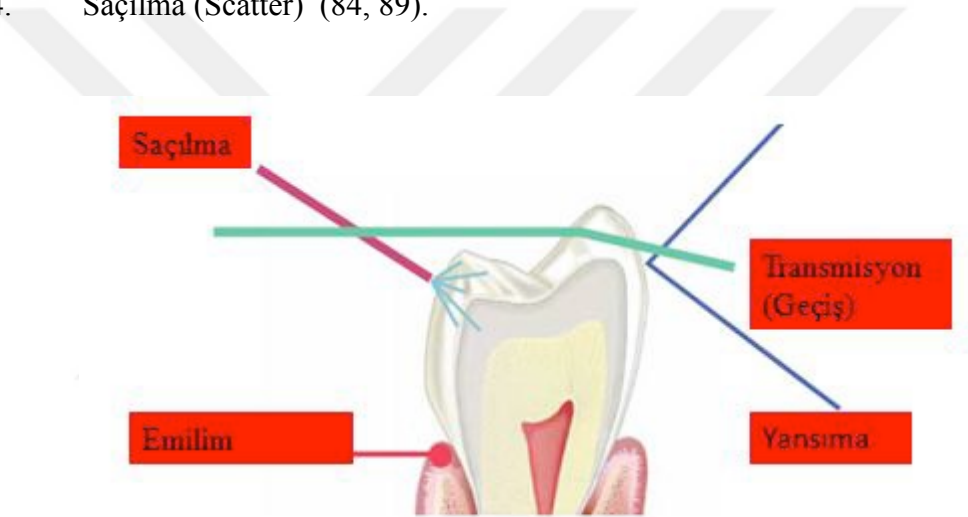
anlatmaktadır. Eş fazlı terimi ise, demeti oluşturan tüm dalgaların aynı frekansta olduğunu ve aynı fazda titreştiklerini ifade eder (85).

2.8.4. Lazer doku etkileşimleri

2.8.4.1. Optik etkileşimler

Lazer ışığının doku ile etkileşimi dokunun optik özelliklerine göre dört farklı şekilde gerçekleşir:

1. Emilim (Absorbsiyon)
2. Geçiş (Transmisyon)
3. Yansıma (Refleksiyon)
4. Saçılma (Scatter) (84, 89).



Şekil 2.5. Lazer ışını diş dokusu etkileşimleri (90)

Emilim (Absorbsiyon)

İlk ve en çok istenilen doku lazer etkileşimi olup dokunun yapısal özelliklerine, lazerin dalga boyuna ve yayılım tipine göre, lazer ışığını hedef doku içerisine geçmesidir. Dokular içerisinde bulunan ve spesifik bir dalga boyuna sahip lazer ışığını absorbe eden yapılar “kromofor” olarak adlandırılır. Lazer ışığının dokudaki penetrasyon derinliği absorpsiyon miktarı ile ters orantılıdır (87).

Geçiş (Transmisyon)

İkinci etkileşim, lazerin derindeki hedef doku içerisine yüzeysel dokularla herhangi bir etkileşime girmeden geçmesi ve hedef doku aralığında etkisini göstermesidir (84, 89). Penetrasyon derinliği, lazer radyasyonunun belirli bir dalga boyunda dokuda ulaştığı en derin noktanın yüzeye olan uzaklığı şeklinde tanımlanabilir. Biyostimülasyon uygulamalarında, transmisyonun daha fazla olduğu dalga boyundaki lazerler tercih edilmelidir (91).

Yansıma (Refleksiyon)

Yansıma, lazer ışığının hedef dokuda herhangi bir etkileşime girmeden yüzey dokudan geri dönmesidir. Dokuların homojen olmayan yapısı lazer ışığının yansımada en önemli faktördür. Bu etkileşim, lazer güvenliği açısından önemlidir. Çürük tespit yöntemlerinde de bu özellikten yararlanır (84).

Saçılma (Scatter)

Lazer ışığının doku içerisinde saçılması, hedeflenen bölgeye istenilen miktarda enerji transfer edilmesine engel olacak ve istenilen biyolojik etki elde edilemeyecektir. Saçılan lazer ışığı komşu dokularda absorbe edilerek ısı transferine neden olarak istenmeyen hasarlara yol açabilir (84, 85).

Saçılma miktarı ve emilim miktarı ters orantılıdır. Diş hekimliğindeki dolgu materyallerinin polimerizasyonunda bu özellikten yararlanır (84).

2.8.4.2. Biyolojik etkileşimler

Dalga boyuna, enerji miktarına, ışınlama süresine ve dokuların özelliklerine bağlı olarak değişiklik gösteren lazerin dokudaki biyolojik etkileşimleri şöyledir:

Fotokimyasal etki

Fotokimyasal teoriye göre, doku kromoforları lazerin absorpsiyonunu gerçekleştirir. Bu bahsedilen kromoforlar, hücre içi veya dışı moleküller, hücre zarı molekülleri ya da enzimler olabilir. Kromoforların uyarılması, lazerin dokularda meydana getirdiği etkiler açısından önemlidir (92).

Fototermal etki

Medikal lazerler, ışık enerjisini dokuya ileterek enerjinin absorpsiyon aracılığıyla ısıya dönüşümünü sağlarlar. Bu mekanizma ile dokuda insizyon, eksizyon, koagülasyon ya da vaporizasyon yapmak mümkün olur (88).

Fotomekanik etki

Yüksek enerjiye sahip lazer ışığının yüksek frekanstaki uygulamalarında dokularda doğrusal olmayan değişiklikler gerçekleşir ve dokunun optik özellikleri değişir. Fotoablasyon ve fotoakustik etki bunlara örnektir (89).

2.8.5. Diş hekimliğinde lazer tipleri

Optik kavite içerisindeki kimyasal elementler, moleküller veya bileşikler bulunan kısma aktif ortam denir. Aktif ortam, lazer enerjisinin kaynağıdır; gaz, sıvı, kristal veya katı durumdaki yarı iletken bir madde olan aktif maddeye göre, lazerin jenerik ismi belirlenir (84).

2.8.5.1. Helyum-Neon lazerler

He-Ne lazerler, düşük doz lazer olup %80 oranında helyum ve %20 oranında neon gazı içermektedir (93). Neon aktif maddeyi oluştururken; helyum ise enerji yükleme, yani pompalama gazını oluşturmaktadır. Dalga boyu 633-655 nm olan Helyum-Neon lazer ile dokularda biyostimülatif etki oluşturulabilir. Hücre içerisinde ortaya çıkan oksijen radikallerine bağlı nekroz meydana gelebilirken, ışık kaynağına devamlı bakılması durumunda gözde harabiyet oluşabilir. Yüksek dağılım ile düşük absorpsiyon özelliğine sahiptir ve bu özelliği nedeniyle sıklıkla dermatolojide transkütan uygulamalar için kullanılmaktadır.

Kollajen liflerinin ve hücrelerin çoğalması gibi bazı histokimyasal değişiklikler meydana getirdikleri bildirilmiş olup yaralı dokuya uygulandığında kollajen sentezinde, ribonükleik asit (RNA) sentezinde ve kan akımında artışa neden olduğu, böylece iyileşmeyi hızlandırdığı düşünülmektedir. Ayrıca, ağrıların azaltmasında da kullanılmaktadır (92, 94).

2.8.5.2. Argon İyon lazerler

Aktif maddesi argon gazı olup, görülebilir spektrumun 488 nm dalga boyunda mavi ve 514 nm dalga boyunda ise mavi-yeşil renkli ışık demeti oluşturan her iki tipi de diş hekimliği pratiğinde kullanılmaktadır (95). Her iki lazer tipinde de ışık demetinin dokuya iletimi fiberoptik sistem ile sağlanır (81). 488 nm dalga boyunda yayılım gösterebilmesi için komforokinonu aktive etmesi gerekir. Komforokinon, kompozit rezin materyallerinin sertleşmesini başlatan foton indükleyicisidir (84). 514 nm dalga boyu hemoglobin, melanin, hemosiderin içeren dokulardan çok iyi soğrulurken; diş sert dokularında ve suda iyi soğrulmaz. Bu nedenle, dişeti operasyonları esnasında çok iyi hemostaz sağlarken, mine ve dentin gibi sert dokularda herhangi bir zarara yol açmaz. Yüksek vaskülarize lezyonların tedavisi için en uygun lazer tipleridir. Her iki dalga boyunda da, çürük teşhisinde kullanılabilir (96).

2.8.5.3. Karbondioksit (CO₂) lazerler

Patel tarafından 1964 yılında keşfedilmiş (97), aktif madde olarak CO₂ gazı içeren, dalga boyu 10.600 nm olan, elektromanyetik spektrumun görünmeyen kızıl ötesi kısmında bulunan lazerdir (81). Su tarafından çok iyi soğrulur, yumuşak dokuyu kolayca keserek koagüle eder ve oldukça iyi hemostaz sağlar. Dokudaki penetrasyon derinliği çok az olduğu için mukozal lezyonların tedavisinde kullanılır. Sıkı fibröz dokuları vaporeze etmek amacıyla kullanılır. Erbiyum lazerlere göre, hidroksiapatit tarafından daha yüksek oranda soğuruldukları için, diş dokusuna komşu yumuşak doku alanlarında çalışırken diş dokularının metal koruyucular ile örtülmesi gerekmektedir. Karbondioksit enerjisiyle mine ve dentin yüzeyinde erime, buharlaşma, kollajen matriks karbonizasyonu, rekristalizasyon gibi mikro yapısal değişiklikler ortaya çıkar. Devamlı modda karbondioksitin diş sert dokularında kullanımı sınırlıdır (94). Çünkü, karbonizasyon ve diş yüzeyinde çatlaklara yol açmaktadır. Atımlı karbondioksit lazerler, düşük enerjide kullanıldığında mine ve dentini aside karşı daha dirençli hale getirir. Aynı zamanda, pulpada herhangi bir termal hasara neden olmadan servikal dentin hassasiyetini önleme konusunda başarılıdır (98).

2.8.5.4. Neodmiyum: Yttrium-Alüminyum-Garnet lazerler

Nd:YAG lazer, 1964 yılında geliştirilmiş olup (99), aktif maddesi neodmiyum iyonları ile nadir elementler olan yttrium, alüminyum ve garnet kristallerinin kombinasyonu olan bir katı faz lazer türüdür. Elektromanyetik spektrumunda kızıl ötesi aralığa yakın

görünmeyen 1064 nm boyundaki dalga boyunda çalışmakta olup iletimleri optik fiberlerle sağlanır (81). Nd:YAG lazer, melanin tarafından kuvvetli bir şekilde absorbe edilirken, hemoglobin tarafından daha az absorbe edilir. Sudan % 90 oranında direkt geçiş gösterir ve herhangi bir değişikliğe uğramadan ilerler. Kısa atımlı ama yüksek pik enerji seviyesiyle dokuların debritmanında, kesiminde ve koagülasyonun sağlanmasında kullanılırlar. Nd:YAG lazerler, diş sert dokuları tarafından iyi soğurulmadığı için, dişe komşu yumuşak doku cerrahisinde kullanılması güvenlidir. Bu lazerler, defokus halinde ancak birkaç milimetreye kadar doku penetrasyonu gösterdiği için pulpal analjezi sağlamada, aftöz ülser tedavisinde ve hemostaz amaçlı da kullanılabilirler (100). Ayrıca, dişeti konturlarının düzeltilmesi, frenektomi ve gingivektomi için kullanılmaktadırlar. Diş sert dokularında, yüzey pürüzlendirme ile diş hassasiyetinin giderilmesinde kullanılırlar. Aynı zamanda başlangıç çürük lezyonlarının uzaklaştırılması ve pulpa ekstirpasyonunda kullanılmaktadırlar (101).

2.8.5.5. Erbiyum lazerler

Erbiyum lazerler elektromanyetik spektrumun görünmez kızıl ötesi kısmında yer alırlar. Farklı dalga boylarında benzer özellikler gösteren iki tipi vardır: Er:Cr:YSGG lazer ve Er:YAG lazer. 2780 nm dalga boyunda olan Er:Cr:YSGG lazerin aktif maddesi , erbiyum ve krom ile yttriyum, skandiyum, galyum ve garnet kristallerinin karışımı iken, 2940 nm dalga boyuna sahip Er:YAG lazerin aktif maddesi ise erbiyum ile yttriyum alüminyum garnet kristallerinin karışımından oluşur (81). Her iki dalga boyunun da hidroksiapatite yüksek afinite gösterirler ve yüksek oranda absorbe olurlar. Er:YAG lazerlerin affinitesi, Er:Cr:YSGG'ye göre %20 daha fazladır. Suyun mineral yapılar içerisinde ani buharlaşması, çok büyük bir hacim artışına yol açarak çevredeki materyalin tamamen parçalanmasını sağlamaktadır (102). Bu etkinin, tedavi esnasında pulpanın ısısını yaklaşık 5°C düşürülebildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (88).

Erbiyum lazerlerin, su ve hidroksiapatit tarafından absorpsiyonu çok iyidir ve bu, sert dokularda termal zarar oluşturmaksızın ablasyonun gerçekleşmesine olanak tanır. Diş ve kemik dokusunun her ikisi de hidroksiapatit ve su içerir, bu nedenle yapılan çalışmalar erbiyum lazerlerin sert dokuda gerçekleştirilen cerrahi işlemlerinde en iyi alternatif olduklarını bildirmektedir. Yumuşak dokuların cerrahisinde de başarılı sonuçlar vermektedirler. Bu lazerlerin hemostatik özellikleri sınırlıdır; çünkü cerrahi bölgesindeki kanın sadece yüzeyindeki suyu buharlaştırırlar (84). Yapılan çalışmalar,

konvansiyonel cerrahi uygulamalar ile erbiyum lazerler kullanılarak yapılan sert doku uygulamalarının ardından elde edilen iyileşme hızlarını karşılaştırmışlar. Erbiyum lazer cerrahilerinin, iyileşme hızlarının daha üstün olduğunu göstermişlerdir (103).

2.8.5.6. Galyum- Alüminyum-Arsenid (Diyot) lazerler

Aktif maddeleri yarı iletken olan diyot lazerlerin, Alüminyum-galyum-arsenid (AlGaAs) içeren versiyonları 810 nm; İndiyum-galyum-arsenid (InGaAs) içeren tipleri ise 980 nm dalga boyunda emisyon yaparlar. Yeni geliştirilen 1064 nm dalga boyunda diyot lazerler de bulunmaktadır. Portatif cihazlar olan diyot lazerler, “soft lazerler” olarak da bilinmektedirler. Bu lazerlerin, hemostaz sağlama yeteneği argon lazerler kadar hızlı olmayıp, derin dokularda iyi penetrasyon, pigmente dokularda yüksek absorpsiyon ve dişe ait sert dokularda düşük absorpsiyon özelliği gösterirler. Bu sebeple, komşu yumuşak dokuların cerrahisinde güvenli olarak kullanılabilirler. Devamlı dalga emisyon modunda kullanıldıklarında hedef dokuda meydana gelebilecek olası ısı artışını engellemek için, bu lazer sistemlerinde soğutucu sistemler bulunmaktadır (104).

Biyostimülasyon, polimerizasyon, ağrının azaltılması, sterilizasyon, dişeti operasyonları, yumuşak doku cerrahileri, koagülasyon ve pigmentasyonların giderilmesi gibi tedavilerde yaygın olarak kullanılmaktadır (81).

Ayrıca, 655 nm görünür dalga boyunda çürük derecesini niceliksel olarak hesaplayabilen diyot lazer (laser fluorescence) üretilmiştir. Düşük enerji yoğunluğundaki diyot lazerlerin, fibroblastların çoğalmasını da indüklediği bildirilmiştir (101).

2.8.6. Düşük doz lazer terapisi (DDLDT)

Düşük doz lazerler için aktif ortam gaz (eg. He-Ne lazerler) olabilir ya da galyum arsenid (GaAs) veya galyum alüminyum arsenid (GaAlAs) olabilir. Genellikle yakın kızıl ötesi spektrumda (800-1000 nm) bulunan, gücü 1 mw ile 500 mw/cm² (0.5 Watt) arasında olan düşük güçteki bu lazerlerin, doku rejenerasyonunun artırılması, ağrının ya da inflamasyonun azaltılması için kullanılması düşük doz lazer terapisi şeklinde tariflenebilir (105). Spesifik dalga boyu ve enerji seviyesine sahip bu lazerler, dokularda termal değişikliklere neden olmadan hücrenin biyokimyasal yapısını, proliferatif aktivitenin stimülasyonunu ya da inhibisyonunu etkilerler. DDLDT'nin oluşturduğu ışık

hüzmesinin (light beam) gücü az olduğu için (1-500 mW), DDLT ısı artışı, dokuda yanık oluşumu ve vaporizasyon şeklinde etki göstermez; fotokimyasal etki meydana getirir (105). Isınma etkisi gözlenmediği için bu lazerler, soğuk lazerler ya da non-termal lazerler olarak da bilinmektedir (106). Non-termal lazerlerin kullanılmasının esas avantajı, hedef dokuda fotobiyostimulasyon etkisi oluşturulurken, dokuya güvenli şekilde penetre olabilmesidir (107).

2.8.6.1. Düşük doz lazerlerin tarihçesi

M.Ö. 1400 yılında Kızılderililer, Vitiligo tedavisinde deriye bitkisel karışımları uygulayarak gün ışığı ekspozit etmişlerdir. Daha sonra Mısırlılar lökodermanın tedavisinde benzer teknikleri uygulamışlardır. 19. yy'ın sonlarında ise, günümüz fototerapisinin babası kabul edilen Dr. N.R. Finsen, dermal tüberküloz, çiçek ve kızamık tedavisinde ultraviyole ve kırmızı ışığı kullanmıştır (105).

Düşük doz lazer terapisi, 1967 yılında Budapeşte'de Endre Mester tarafından tanıtılmıştır. Düşük doz lazerler, deri kanserine etkisini incelemek için traş edilmiş farelere uygulanmış ve düşük doz lazerle tedavi edilen grupta kıl uzamasının daha fazla olduğu bulunmuştur (108). DDLT'nin medikal alanda kullanımı ise Dr. Toshio Ohshiro ile başlamıştır (109).

2.8.6.2. Düşük doz lazerlerin biyolojik sistemdeki aksiyon mekanizması

Fototerapi, ışık uygulaması içeren tedavi olarak tanımlanmaktadır. Foton olarak adlandırılan enerji partiküllerinin akışıyla oluşturulan enerjinin dokuya uygulanmasıdır. DDLT'nin biyolojik sistemde etki gösterebilmesi için, dokudaki fotoreseptör ve kromofor gibi moleküller tarafından fotonlar absorbe edilmelidir (110). Bu kromoforlar, Sitokrom c oksidaz (111) hemoglobin, melanin, myoglobin, flavinler ve flavoproteinler (107) olabilir. Mitokondri içerisindeki Sitokrom c oksidaz, düşük doz lazer uygulamalarından sorumlu temel kromofordur (107). Düşük doz lazerlerin, insan osteoblastlarının mitokondrisini etkilediği, Alkalen Fosfataz üretimini ve hücre proliferasyonunu arttırdığı ya da azalttığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.

1989 yılında, DDLT'nin aksiyon mekanizmasının, hücre solunum döngüsü tarafından ışığın absorpsiyonu esasına dayandığı bildirilmiştir (112). Elektron taşıma zincirinde enerji üretimi olayları sırasında, elektron vericileri NADH ve FADH₂ ile

elektron alıcı oksijen arasında elektron transferiyle su oluşur ve hidrojen iyonlarının bir membran boyunca transferiyle enerji üretilir. Bunlar daha sonra, ATP formunda kimyasal enerji üretiminde kullanılır. Sitokrom c oksidaz, elektron taşıma zincirinin bir komponentidir (111). Pastore ve ark. bir He-Ne lazerin Sitokrom c oksidaz enzimi üzerindeki etkilerini araştırmışlar ve lazer tedavisinden sonra Sitokrom c oksidasyonunda ve elektron transferinde artış olduğunu bulmuşlardır (113).

2.8.6.3. DDLT doku etkileşimleri

Lazer ışığının analjezik, antienflamatuar ve biostimülatif etkileri bulunmaktadır. Lazer ışığının dokuya penetrasyonunun ardından ışık, hücrelerin mitokondrileri tarafından absorbe edilerek, ATP ve sitoplazmik hidrojen iyonunun konsantrasyonunda artışa yol açan bir dizi reaksiyonu başlatır. Hücre zarının iyonlara karşı geçirgenliği değişir (114). Hücre içerisine Ca girişi artar. Lenfositlerin aktivasyonu gerçekleşir ve fibroblastlar uyarılır. Uygulanan dokuda lökositlerin fagositozu artar. Lazer absorbe edildiği dokuda mast hücrelerinde azalmaya yol açar, buna bağlı olarak histamin ve prostoglandin salgınır. Tüm bu reaksiyonların sonucunda düşük doz lazer tedavisinin antienflamatuar ve analjezik etkileri oluşmakta, iyileşme hızlanmakta, kemik hücre ve fibroblast stimülasyonu ile kan damarlanması artmaktadır (115).

Düşük doz lazer tedavisinde kullanılan lazer ışığının suda emiliminin az olmasından dolayı, ışık yumuşak ve sert dokularda 3 mm ile 15 mm arasında penetrasyon derinliğine ulaşabilir. Dokulara penetre olan enerji, eritrositlere ve kılcal damarlara saçılır, bu nedenle, düşük doz lazer uygulamalarının etkilerinin değerlendirilmesinde damarlanma ve kan elemanlarını incelemek önemlidir (81, 116).

DDLDT'nin kemik dokusu iyileşmesinin başlangıç safhasında kullanıldığı zaman kemik hücrelerinde, özellikle de osteoklastlarda etkili olduğu görülmüştür. Lazer ışığının direkt olarak osteoklastları etkilediği ve bu osteoklastların da osteoblast aktivitesine etkide bulunduğu düşünülmüştür (117). Yamada DDLDT'nin osteoblastik hücrelerde proliferasyonu, differansiyasyonu ve kalsifikasyonu arttırdığını bulmuşlardır (118). DDLDT'nin osteoblast proliferasyonuna etkisi yanında Alkalen Fosfataz aktivitesini de stimüle ettiği bildirilmiştir. Lazer ışığının uygulandığı alanda osteoblastik hücre sayısındaki artış sonucu kemik oluşumunda kısa sürede artış sağlanır (119). Dickson ve ark. doku örneklerine 10 J/cm² doz GaAlAs lazer uygulayarak ALP enzim aktivitesi

üzerine etkilerini inceleyen bir çalışma yapmışlar ve lazer uygulanan grupta ALP enzim aktivitesinin kontrol grubuna göre daha yüksek olduğunu görmüşlerdir (120).

2.8.7. Diş hekimliğinde düşük doz lazer uygulamaları

Düşük doz lazer tedavisinin diş hekimliğinde kullanım alanıyla ilgili birçok araştırma mevcuttur. Ancak, literatürde, kullanılan lazerlerin doz ve metodları pek çok farklılık göstermektedir. Düşük doz lazer tedavisinin ilk uygulamalarında 632 nm dalga boyundaki Helyum-Neon içerikli lazerler kullanılmaktaydı. Fakat son zamanlarda, 830 veya 635 nm galyum arsenid içerikli diyot lazerlerin kullanımı artmıştır (81).

Düşük doz lazerler; yara iyileşmesinde, aftöz stomatitlerin ve mukozitisin tedavisinde, pulpotomide, nöronal rejenerasyonda, post-herpetik ağrının giderilmesinde, beyazlatmada, dezenfeksiyonda (116), yanan ağız sendromunda, kronik gingivitis tedavisinde, gingivektomi, frenektomi, vestibuloplasti, detertraj ve kök yüzey temizliği (SRP), rezeksiyon ve peri-implantitis tedavilerinde, alveolar osteitis tedavisinde, diyabetli hastalarda çekim boşluğunun iyileştirilmesinde, çocuklarda kavite preparasyonu esnasında ağrının azaltılmasında ve myofasiyel ağrının azaltılmasında kullanılabilir. Ayrıca ortodontik tedaviler esnasında, ağrının ve dentin hassasiyetinin azaltılmasında etkili olduğu da gösterilmiştir (121).

2.8.8. Ortodontide düşük doz lazer kullanımı

Günümüzde diş hareketinin hızlandırılması, kemik remodelingi, bonding öncesi mine pürüzlendirilmesi, seramik braketlerin sökülmesi, ortodontik kuvvete bağlı ortaya çıkan ağrıların azaltılması ve mine demineralizasyonunun önlenmesi gibi pek çok ortodontik uygulamada lazerler kullanılmaktadır (101).

2.8.8.1. Ortodontik kuvvet uygulaması esnasındaki ağrının azaltılması

Ortodontik tedavi sırasında uygulanan mekanik kuvvetler, dişlerde 2-4 gün kadar devam edebilen ağrılara neden olabilirler (3). Çeşitli çalışmalarda, lazerin tek doz ve sık uygulama protokolünde ağrının azaltılmasında etkili olduğu rapor edilmiştir. Bunun yanında, bazı araştırmacılar lazer uygulamasının ağrı oluşumunu engellemediğini ya da en ağrılı günleri değiştirmedeğini savunsa da, lazer tedavilerinin genel olarak ağrının şiddetini ve süresini azalttığı düşünülmektedir (122).

Lazerin analjezik etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte inflamatuvar mediator salınımının inhibisyonu ile ağrının azaltıldığı düşünülmektedir. Ortodontik tedaviyi takiben periodonsiyumda salınan prostaglandin E2 (PG-E2) ve interlökin 1- β (IL1- β) gibi kimyasal mediatörlerin ağrıya neden olduğu bildirilmiştir (123). Shimizu ve ark. düşük doz lazer terapisinin, bu inflamatuvar mediatörlerin salınımını anlamlı şekilde inhibe ettiğini bulmuşlardır (124). Ayrıca, ortodontik tedavi sırasında analjezik etki hipoksik hücrelerin oksijenizasyonu ve tehlikeli ürünlerin uzaklaştırılması, membran potansiyelinin stabilizasyonu veya inflamatuvar dokudaki nörotransmitterlerin salınımının kolaylaşması ile de elde edilebilir (125). Tortamano ve ark. çalışmalarında, düşük doz lazer terapisinin ilk ark teli takıldığında ağrıyı etkili bir şekilde kontrol ettiğini, fakat ağrının başlaması üzerinde etkili olmadığını, düşük doz lazer terapisinin kontrol grubuna göre ağrı prevalansını 6-10 saat dolayında düşürdüğünü rapor etmişlerdir (126). Yapılan en son çalışmalar, 810 nm lazer ile diş hareketinin önemli miktarda arttığını ve ağrının azaldığını göstermektedir (127).

2.8.8.2. Düşük doz lazer tedavisi ile diş hareket hızının artırılması

Ortodontik tedavi süresi ortalama 2-3 yıl olup tedavi süresinin uzaması, kök rezorpsiyonu, gingivitis ve çürük oluşum riskini arttırmaktadır. Diş hareket hızının artırılmasıyla total tedavi süresi azaltılabilmektedir (122). Düşük doz lazer tedavisinin, ortodontik tedavinin süresini azaltabileceği ortaya konulmuştur (128). DDLT'nin, osteoblastların proliferasyonunu etkileyerek kemik yapımını etkilediği düşünülmektedir, fakat tam olarak hücreleri nasıl etkilediği kesin olarak bilinmemektedir. Bu remodeling hücrelerinin artmış aktivitesi, diş hareketinin hızlanmasına izin verir. Böylece, diş hareketinin kontrol edilebilir olması, ortodontik tedavinin zamanının azaltılmasına yardımcı olur (129).

Kawasaki ve Shimizu (130), düşük doz lazer uygulamasının, in vivo yapılan çalışmada deneysel diş hareketi esnasında baskı alanlarındaki osteoklast formasyonunu ve diş hareket miktarını stimule ettiğini bildirmiştir. Fujita ve ark. (131) ve Yamaguchi (132), düşük doz lazer uygulamasının, RANKL ve Macrophage-Colony Stimulating Faktör Reseptörünün (M-CSFR) ekspresyonu aracılığıyla diş hareket hızını arttırdığını bildirmiştir ki, bu bulgular, düşük doz lazer uygulamasının kemik remodelingini arttırdığını ve böylelikle ortodontik tedavi süresini kısalttığını göstermiştir.

Ortodontik diş hareket hızının çok fazla artırılmasıyla, pulpal dokuda hasar meydana gelebilmektedir. Bu durumda meydana gelen pulpal doku hasarının tamiri, DDLT ile daha hızlı sağlanabilmekte ve ortodonti hastalarının pulpal sağlıkları korunmaktadır (133). DDLT'nin diğer bir avantajı ise uygun dozlarda, diş hareketini azaltarak ankraji artırabilmesidir, böylece yine ortodontik tedavi süresi kısalmaktadır (134).

2.8.8.3. DDLT'nin ekspansiyon tedavilerinde midpalatal suturdaki kemik rejenerasyonuna stimülatif etkileri

Maksillanın ekspansiyonunun ardından midpalatal suturda elde edilen yetersiz kemik rejenerasyonu erken relapsın en önemli nedenidir. Relapsın azaltılması için, suturun ossifikasyonu tamamlanana kadar ekspansiyon apareyinin ağızda bırakılması önerilmektedir (135). Düşük doz lazer tedavisi, doku rejenerasyonunu artırır, anjiyogenik ve osteojenik yanıtları indükler, böylece, tedavi sonuçlarında yüksek stabilite elde edilmesini sağlar (136).

Bazı hayvan çalışmalarında, düşük doz lazer terapisinin midpalatal suturdaki kemik rejenerasyonuna etkisi histopatolojik ve hücresel açıdan incelenmiş olup lazer terapisinin uygulandığı bölgelerde osteoid doku oluşumunda artış olduğu (137) ve aynı zamanda düşük doz lazer terapisinin kollajen oluşumunu ve sentezini stimüle ettiği gösterilmiştir (136). DDLT'nin uygulandığı suturda ekspansiyon esnasında ve sonrasında onarım sürecinin benzer olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur (138). Saito ve Shimizu, sıçanlarda yapılan hızlı maksiller ekspansiyon esnasında, düşük doz lazerlerin sutura palatina media'daki kemik rejenerasyonunu stimüle ettiğini bildirmiştir. Yapmış oldukları çalışmada lazer tedavisinin, kemik rejenerasyonunun başlangıç aşamasında (0-2 gün) daha etkili olduğunu, daha sonraki periyotlarda (4-6 gün) benzer sonuçların ortaya çıkmadığını rapor etmişlerdir (139). Bununla birlikte, bu çalışmada DDLT'nin başarısının toplam doz, frekans ve ışının yoğunluğuna bağlı olduğu bildirilmiştir (137).

2.8.8.4. Mandibular gelişme esnasında lazer uygulanması

Son zamanlarda düşük doz lazer terapisi, immobilize olan eklem kartilajlarını ve kondrositleri stimüle etmek için kullanılmaktadır. Akai ve ark. 810 nm dalga boyunda He-Ne düşük doz lazer tedavisinin kemik ve kırıkdağı, immobilizasyondan kaynaklanan biyomekanik değişikliklerden koruduğunu bildirmişlerdir (140). Morrone ve ark. düşük

doz lazer terapisinin kemik onarımı üzerinde pozitif etkiye sahip olduğunu (141), Renno ve ark. ise 830 nm'lik lazer ışın tedavisinden sonra osteoblast proliferasyonunun anlamlı şekilde arttığını tespit etmişlerdir (129).

Seifi ve ark. düşük doz lazer uygulamaları ile kondroblastik ve osteoblastik aktivitenin artmasıyla kondiler büyüme ve mandibular ilerlemenin artacağını belirterek yaptıkları çalışmada düşük doz diyot lazer tedavisi ile mandibular uzunluğun önemli derecede arttığını tespit etmişlerdir. Sonuç olarak, düşük doz lazer uygulamaları ile iskeletsel Sınıf II düzeltiminin faydalı olabileceğini iddia etmişlerdir (142). Abtahi ve ark. okluzyonu yükselterek mandibular ilerletme yapan apaceye ek olarak 8 haftalık erkek tavşanların kondilleri üzerine düşük doz lazer uygulamışlardır. Yapılan histolojik değerlendirmelere göre, kondiler bölgedeki kemik yapımının düşük doz lazer uygulaması ile arttığını, fakat kondiler kırık kalınlıklarında herhangi bir değişiklik olmadığını bulmuşlardır (143). Oksayan ve ark. düşük doz lazer terapisi ile mandibular ilerletme apaceyi uygulamasının sıçanlarda kondiler büyümeye olan etkilerini araştırmışlar ve düşük doz lazer ile kullanılan intraoral apaceylerin kondiler büyümeyi stimüle ettiğini ve mandibular gelişimi artırdığını bildirmişlerdir (144).

2.9. Mezenkimal Kök Hücreler

Mezenkimal kök hücreler, ilk kez 1970 yılında Friedenstein ve ark. tarafından farkedilmiştir (145). Friedenstein ve ark. osteojenik kök hücreleri kemik iliğinden izole ederken, fibroblast-benzeri hücrelerin kültür kabının yüzeyine yapışma özelliğinden yararlanmışlardır. Ayrıca, bu hücrelerin fibroblastik, non-fagositik ve klonojenik özelliklere sahip olduklarını ifade eden "Koloni oluşturan birim-fibroblastik" (CFU-F) terimini literatüre kazandırmışlardır (146). Daha sonraları, bu adherent, fibroblastik ve koloni oluşturan hücreler, ilk kez Owen tarafından 1988 yılında stromal kök hücreler olarak isimlendirilmiştir (147). En son olarak da Caplan tarafından 1991 yılında mezenkimal kök hücreler olarak isimlendirilmiş ve belirli koşullar altında başka mezenkimal kökenli hücre ve dokulara farklılaşabildikleri rapor edilmiştir (148). MKH'nın ilk karakterizasyonu ise, 1999 yılında Pittenger ve ark. tarafından yapılmıştır, hücreler insan kemik iliğinden aspire edilmiştir (18).

Kök hücreler, köken aldığı dokuya göre 4 ana sınıfa ayrılırlar: Embriyonik kök hücreler (EKH), fetal kök hücreler, yetişkin kök hücreler ve umbilikal kord kök hücreleri (149).

Yetişkin kök hücreler, özelleşmiş dokuda bulunan farklılaşmamış hücreleri ifade etmektedir (150). Mezenkimal kök hücreler (MKH) ise, yetişkin kök hücrelerin bir formudur ve kendi kendini yenileyebilen, belirli bir doku hücre karakteri taşımayan ancak belirli sinyaller altında çeşitli mezenkimal dizilere farklılaşan multipotent progenitor hücrelerdir (148). Mezenkimal kök hücreler, primer olarak kemik iliğinde yer alan fakat karaciğer, adipoz doku, akciğerler, plasenta, kan ve umbilikal kord gibi diğer dokularda da bulunan multipotent yetişkin kök hücrelerdir (151). Osteoblastlar, kondrositler, myoblastlar, adipositler ve fibroblastlar gibi doku üretimi sağlayan hücelere farklılaşabilirler (152). Farklılaşmayı sağlayan bu sinyaller travma, kırık, inflamasyon, nekroz veya bir tümör olabilir (153). Kök hücreler, doku hasarının olmadığı durumlarda bile farklılaşabilirler. Embriyonik ya da erişkin kök hücrelerin blastokiste enjekte edilmesi durumunda farklı hücelere dönüşebilmesi, bunun en güzel örneğidir. Bu hücrelerin hareketlenmesi ve farklılaşması, integrin gibi transmembran proteinlerinin ekstrasellüler matriks ile etkileşmesi veya kemotaksis ile gerçekleşir (154). MKH'ler kolaylıkla hücre dışında kültür ortamında yaşatılabilirler. Bruder ve ark. tarafından MKH'lerin in vitro koşullarda çoğaltılabildikleri bildirilmiştir (18).

2.9.1. Mezenkimal kök hücrelerin tanımlanması ve yüzey belirteçleri

2006 yılında Uluslararası Hücresel Terapi Derneği (International Society for Cellular Therapy), hücrelerin MKH olarak nitelendirilebilmesi için sahip olması gereken karakteristik özellikleri şu şekilde bildirmiştir; (1) kültür ortamında hücreler plastiğe tutunmalıdır, (2) CD105, CD73 ve CD90 bulunmalı, fakat CD34, CD45, CD14 ya da CD11b, CD79 α ya da CD19 ve HLA-DR molekülleri bulunmamalıdır, (3) hücreler osteoblastlara, kondrositlere ve adipositlere farklılaşma kapasitesine sahip olmalıdır (155).

Hücresinin kök hücre olarak tanımlanması için “Self-renewal” özelliği (kendi kendilerini yenileyebilme yeteneği veya başlangıçtaki hücrenin karakterini taşıyan en azından bir benzer hücre oluşturabilme yeteneği), “Multi-lineage differentiation” özelliği (tek bir hücreden birden fazla hücre dizisine farklılaşabilme yeteneği) ve in vivo olarak herhangi bir dokunun yeniden yapımına katılma yeteneği taşıması gerekmektedir. Kök hücre plastisitesi ise, hücrenin bir sinyal yol izleyerek birden fazla hücreye dönüşebilme yeteneği olup köken aldığı dokunun dışındaki dokulara farklılaşabilme özelliğini ifade etmektedir (156).

2.9.2. MKH'lerin osteoblastik ve kondrojenik farklılaşması

MKH'lerin osteoblast ve kondroblastlara farklılaşması, kemik ve kıkırdak yapım mekanizmaları için oldukça önemli süreçlerdir. Hem osteoblast farklılaşması, hem de kondroblast farklılaşması için spesifik bir mikroçevre gerekmektedir. Osteoblastik farklılaşma için, MKH kültürünün dexamethasone, ascorbic acid-2-phosphate (AsAP) ve beta-glycerophosphate içeren besiyerinde 2-4 hafta kadar süreyle osteojenik indüksiyonu gereklidir (157). Dexamethasone, düşük dozlarda kullanıldığında MKH'lerin osteojenik farklılaşmasını stimüle edebilen bir çeşit glukokortikoid steroidtir. AsAP, farklılaşma için gerekli biyoaktif komponent iken, beta-glycerophosphate kalsiyum depozisyonunun stimülasyonu için elzemdir (152). Bu maddelerin varlığında MKH'ler, Alkalen Fosfataz (ALP) aktivitesini artırarak osteoblastik morfoloji kazanır. Osteogenezisin erken sinyalleri, kemik spesifik ALP ile enzimatik olarak ölçülebilir (17). Tip I kollajen, non-spesifik bir belirteç iken, bone sialoprotein, osteokalsin (OCN), osteopontin (OPN) ve osteonektin (ON) geç osteojenik farklılaşma belirteçleridir. Ayrıca, farklılaşma esnasında osterix (Osx), corebinding factor $\alpha 1$ gibi osteogenezis belirteçlerine de rastlanmaktadır (158).

MKH'lerin kondrojenik farklılaşması için ise, (1) 3D kültür, (2) serum içermeyen besiyeri (serum-free medium) ve (3) Transforming Growth Faktör- β (TGF- β) ailesinden birinin besiyerine ilavesi gereklidir (159). Böyle bir ortamda, MKH'ler fibroblastik morfolojilerini kaybederler ve glikozaminoglikan (GAG) gibi kıkırdak spesifik embriyonik kök hücrelerin sentezi başlar. Kondrojenik farklılaşma belirteçleri ise, Tip II kollajen ve aggrecan gibi çeşitli proteoglikanlardır (152, 159).

2.9.3. MKH farklılaşmasının düzenlenmesi

MKH'lerin adipojenik veya osteojenik hücelere farklılaşmasında, transkripsiyon faktörleri ve sinyallerinin çeşitliliği önemlidir. Osteojenik ve adipojenik dizilere farklılaşmayı belirleyen sinyal kaskatları arasında yarışma mevcuttur. Adipojenik farklılaşmanın artması, osteojenik farklılaşmayı azaltır veya bunun tam tersi geçerlidir (160).

Osteoblastik farklılaşma için gerekli olan transkripsiyon faktörleri, Cbfa-1/Runx-2, osterix ve TAZ'dır. Transcriptional Coactivator with PDZ-binding Motif (TAZ),

MKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasına aracılık ederken, Cbfa-1/Runx-2 ve osterix, bu farklılaşmanın geç aşamalarında görevlidir (161). Nuclear hormone receptor peroxisome proliferator-activated Receptor (PPAR γ) ve Runx-2, TAZ adı verilen ko-aktivatörün kontrolündedir. TAZ, Runx-2 bağımlı osteojenik gen ekspresyonunu aktive ederken, PPAR γ -bağımlı adipojenik gen ekspresyonunu baskılar (162). Osteogeneziste, özellikle BMP-2 ve BMP-6 gibi BMP'ler Runx2 diye adlandırılan osteojenik geni teşvik eder (151). Runx2, Runt-domain gen ailesinin bir üyesi olup iskeletsel gelişimin erken evrelerinde mezenkimal hücrelerden salgılanır. Osteoblastların farklılaşmasının kontrolünde en temel düzenleyicidir. Osteokalsin genindeki cis-elementine tutunarak osteogeneziste anahtar rol oynar (163). Runx2, adipogenezisin düzenleyicisi olan PPAR γ 'yi baskılayarak adipogenezisi bloke eder ve osteogenezisi artırır. Aynı şekilde, PPAR γ 'nin arttığı durumlarda Runx2 bloke edilir ve adipogenezis artar (151).

Kondrojenik farklılaşma, SOX ailesine ait transkripsiyon faktörleri aracılığıyla gerçekleştirilir. Kondrositlerin farklılaşmasında Sox-9 ekspresyonu olur ve bu kondrojenik farklılaşma için şarttır (152). TGF- β , BMPs, Büyüme Farklılaşma Faktörleri (GDF) ve Wnts (farklılaşmanın erken mediatörü), MKH'lerin kondrositlere farklılaşmasında çok önemlidir (151). Kondrojenik farklılaşmanın başlangıç safhalarında kondrositler, Tip I kollajen sentezlemekteyken; olgun kondrositler ise, karakteristik olan Tip II ve IX kollajen sentezler (164). Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre (YDMKH) paletlerinin kondrojenik farklılaşması Tip X kollajen ile beraber meydana gelir ve hipertrofik kondrositler oluşur (165). Kondrojenik fenotipin devamlılığını ise, GAG ve Tip II kollajenden zengin doku matriksi sağlar (166).

2.9.4. Mezenkimal kök hücrelerin klinik uygulamaları

Özellikle ABD, Avrupa ve Doğu Asya'da MKH'ler, yaygın olarak klinik çalışmalarda kullanılmaktadır. Bu çalışmalarda, kıkırdak yaralanmaları, nörolojik, karaciğer, kemik, böbrek ve kalp hastalıkları, pulmoner hastalıklar, osteojenik hastalıklar, graft versus host hastalığı (GvHD) ile diyabet ve Chron hastalığı gibi bazı otoimmün hastalıkları üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir (167). MKH'ler, kemik ve kıkırdak tamirinde kullanılabilir (168). Ortopedide, kranyum defektlerinin (169) ve segmental kemik defektlerinin tamirinde, tendon ve artiküler kıkırdaktaki fokal defektlerin tamirinde kullanılabilirler (170). Kıkırdak doku, avasküler olduğu için kendiliğinden iyileşme yeteneği sınırlıdır. Bu nedenle, kıkırdak yaralanmaları veya osteoartrit gibi

hastalıkların tedavisinde mezenkimal kök hücreler umut vaat edicidir. Sinoviyal sıvıdan izole edilmiş mezenkimal kök hücreler, en güçlü kondrojenik özelliğe sahip hücrelerdir (171).

2.9.4.1. Kemik rejenerasyonunda MKH kullanımı

Friedenstein, Piatetzky-Shapiro ve Petrakova çalışmalarında, MKH'lerin yeni kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir (172). Kırık iyileşmesi esnasında, inflamasyon fazının ardından, MKH'ler ve kan damarları kallusun içine invaze olurlar. Mekanik uyarılar, MKH'lerin osteoblastlara farklılaşarak kemik formasyonu yapmaları için bu hücreleri duyarlı hale getirir (173). Kırık iyileşmesinde, MKH'lerin kullanımı ve uygun mekanik stimulasyonlar anahtar rol oynar (174).

Son yıllarda, açık cerrahi gerektirmeyen, enjekte edilebilen taşıyıcılar içine konan MKH'lerin etkinlikleri incelenmiştir. Siwach ve ark. tedavi sonrası kaynaşmayan kırıklarda perkutan otojen kemik iliği greftlemesi ile iyileşme sağladıklarını rapor etmişlerdir (175). Goel ve ark. da, tibiası 'non-union' olan hastalarda perkutan kemik iliği greftlemesi yapmış ve tibiada kemik iyileşmesinin gerçekleştiğini ve bununla birlikte, MKH tekniklerinin basit, az girişimsel ve düşük komplikasyon oranına sahip olduğunu bildirmişlerdir (176). Osteogenezis imperfekta hastalarında ise, MKH transplantasyonunun ardından kemik yapımının düzeldiği klinik çalışmalarla gösterilmiştir. Kemik mineral içeriği ve büyüme hızı artarken, kemik kırılma riski azalmıştır (177).

2.9.5. Mezenkimal kök hücrelerin diş hekimliğinde kullanımı

Uzun süre dişsiz olan hastalarda şiddetli kemik kayıplarında; travmalar, periodontal hastalıklar, diş çekim ve kayıpları sonrasında meydana gelen alveolar kemik kayıplarında implant ve protez yapılabilmesi için yeni kemik yapımına ihtiyaç vardır. Bu nedenle, diş hekimliğinde kök hücreler kullanılarak kayıp olan kemik ve tükürük bezi, dil, kaslar, TME gibi dokuların yerine konulması hedeflenmektedir. Periosteum kökenli hücrelerin kullanılmasıyla maksiller sinus tabanının oluşumu ve implant yerleştirilebilmesi için yeterli yeni kemik oluşumu başarılı bir şekilde elde edilmiş olup implant yerleştirilmesinin ardından post-operatif bekleme süresi azaltılmıştır (178). 2004 yılında Yamada ve ark. enjekte edilebilir formdaki Kemik İliği Kökenli

Mezenkimal Kök Hücreleri (Kİ-MKH) ve PRP karışımının immediate implantlar için alveolar kemik yapımını sağladığını rapor etmişlerdir (179). Yine aynı ekip, periodontal kemik kayıplarında, alveolar yarık osteoplastisinde ve maksiller sinus tabanı elevasyonlarında MKH'nin başarılı sonuçlar verdiğini bildirmiştir (180). Aynı şekilde YDMKH'lerin kullanımıyla da, orofasiyel kemik rejenerasyonu elde edilmiştir. Pери ve ark, implant tedavileri için vertikal kemik ogmentasyonunda YDMKH'lerin kullanımının yararlı olduğunu bildirmişlerdir (178). Ayrıca, dental pulpa kök hücreleri ve periodontal ligament kök hücreleri gibi dental kök hücrelerin (DKH) de, alveolar kemik ve dental dokuların rejenerasyonunda kullanılabilceği belirtilmektedir, fakat Kİ-MKH'lerle karşılaştırıldığında DKH'lerin uygulanabilirlikleri daha limitlidir (21).

Dahası, son dönemdeki çalışmalar Kİ-MKH'lerin direkt olarak hasarlı dokuya uygulanmasıyla veya intravenöz olarak verilmesiyle antiinflamatuvar etki elde edildiğini bildirmiştir (180).

Ek olarak, travma veya kanser gibi durumlarda kaybedilen oro-maksilofasiyel dokuların rekonstruksiyonunda, rejeneratif diş hekimliği yaklaşımları oldukça önemlidir. Kök hücre transplantasyonu ile tükürük bezlerinin rejenerasyonu, baş boyun onkolojisi için önemlidir. Radyoterapi sonucu tükürük bezlerinin fonksiyonu bozulur ve kserostomi meydana gelebilir. Fare kuyruk veninden elde edilen Kİ-MKH'lerin transplantasyonu ile radyasyon görmüş tükürük bezlerinin fonksiyonu onarılmıştır. Son dönemlerde farelerden primitive tükürük bezi kök hücreleri izole edilmektedir. Bu sonuçlar, kök hücre transplantasyonunun, fonksiyonel olarak hasar görmüş tükürük bezlerini onarabileceğini göstermiştir. Benzer şekilde, kök hücre ve doku mühendisliğindeki gelişmeler aracılığıyla, hasarlı veya rezeke edilmiş dil dokusunun rekonstruksiyonu ve normal fizyolojik fonksiyonuna devam etmesi sağlanabilir (180).

Transplante hücreler, hasarlı ya da hasta dokuyu tamir edebilir, trofik faktörler salgılayarak rejenerasyonu düzenleyebilir ve/veya direkt olarak dokunun rejenerasyonunu sağlayabilir. Kİ-MKH'ler, periodontal doku hücrelerine dönüşerek periodontal doku rejenerasyonunu güçlendirebilir. Yapılan klinik çalışmalar sonucunda, periodontal defektlerde, osteoprogenitör hücreleri ve MKH'leri içeren allograftler aracılığıyla başarılı sonuçlar elde edilmiştir (181). Son yıllarda YDMKH'lerde

karşılaştırıldığında, periodontal rejenerasyonda kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, sıçanlardaki periodontal defektlere, PRP ile karıştırılan YDMKH'ler transplante edilmiş ve yeni PDL-benzeri veya alveol kemik-benzeri yapılar elde edilmiştir. Köpek modellerinde, dental kök bifurkasyon defektlerine YDMKH'ler ve PRP karışımı transplante edilmiş ve 4. haftada transplantasyon bölgesinde epitel invazyonu engellenmiş, 8. haftada ise yeni kemik oluşumu meydana gelmiştir (181). Ayrıca, Ishizaka ve ark. çalışmalarında, köpeklerde pulpektomi sonrasında, YDMKH transplantasyonunun, kök kanalında pulpa rejenerasyonunu indüklediğini göstermiştir (182).

2.9.6. Mezenkimal kök hücrelerin ortodontide kullanımı

MKH'ler ortodonti alanında da gelecek vaad etmekte olup bu nedenle, son dönemde yeni ortodonti çalışmaları yapılmaya başlamıştır. Örneğin, Ekizer ve ark. hızlı maksiller ekspansiyonun (RME) ardından suturdaki yeni kemik oluşumunu arttırmak için, sıçanların intermaksiller sutur bölgesine, kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre uygulamışlardır. Helikal springler aracılığıyla 5 gün boyunca santral dişlere kuvvet uygulamışlardır. Histomorfometrik sonuçlara göre, tek doz Kİ-MKH uygulamasının kontrol grubuna göre osteoblast sayısını ve yeni damar oluşumunu arttığını, bunlara bağlı olarak da midpalatal suturdaki yeni kemik oluşumunun arttığını bulmuşlardır. Kİ-MKH'lerin klinik olarak uygulanması ile, RME tedavisinin ardından relaps oranının azalacağı ve daha stabil sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir. Kİ-MKH sayesinde, maksiller ekspansiyon tedavisinin süresinin kısaldığı ve relapsın önlenmesi için hastaların uzun süre aparey kullanma gereksiniminin azaldığı, hasta kooperasyonunun arttığı, hem hastanın hem klinisyenin konforunun daha fazla sağlandığı düşünülmüştür (21).

Oyonarte ve ark. MKH'lerin intraartiküler enjeksiyonu ve LIPUS (Düşük yoğunluklu Pulsed Ultrason) kullanımının gelişmekte olan sıçanlar üzerindeki etkilerini incelemişler. LIPUS ve MKH uygulamalarının hepsini sol kondile yapmışlar. Deney sonunda, sadece LIPUSla tedavi edilen sıçanların sol kondilinin daha geniş olduğunu ve alt orta hattın büyümeye bağlı olarak sağa kaydığını, fakat MKH grubunda istatistiksel olarak fark olmadığını bulmuşlardır. TME bölgesine LIPUS ve MKH uygulamasının, büyümekte olan sıçanlarda kondilin transvers yönde büyümesini stimüle ederken, tek

olarak LIPUS uygulamasının sagittal yönde kondil büyümesini arttırdığı rapor edilmiştir. MKH enjeksiyon modelinin ise sagittal yön büyümesine çok az etki ettiği görülmüştür (183). Son dönemki çalışmalar, LIPUS'un doku kültürünün farklılaşmasını ve kök hücre ekspansiyonunu arttırdığını göstermiştir. LIPUS, periostal hücre ekspansiyonunu artırır ve Kİ-MKH'lerin ekspansiyonunu ve kondrojenik dizilere farklılaşmasını stimule eder. Ayrıca, LIPUS osteoblastların matris formasyonunu artırır ve insan kök hücre apoptozisini minimize eder (184).

2.9.7. Kök hücreler için düşük doz lazer terapisi

DDLT, MKH'lerin farklılaşması ve çoğalmasında stimülasyonu sağlayabilir. Vacek ve ark. (185) ile Wang ve ark. (186), DDLT'nin insan kök hücreleri üzerindeki etkilerini in-vitro olarak incelemişler ve bu DDLT'nin kök hücrelerin proliferasyonunu teşvik ettiğini görmüşlerdir. Diğer bir ifadeyle, düşük doz lazer uygulaması ekstrinsik sinyal olarak etki ederek kök hücrelerin durumunu belirler. Vacek ve ark. in vitro Granulocyte-Macrophage Colony Forming Cell (GM-CFC) kolonilerinin büyümesi için He-Ne lazer kullanmışlar ve kök hücrelerin kapasitesinin arttığını bildirmişlerdir (185). Benzer şekilde, Choi ve ark. farelerin kemik rejenerasyonu üzerinde He-Ne lazerin MKH ile kullanımının pek çok pozitif etki sağladığını rapor etmişlerdir (13). Ayrıca, güncel literatürde, DDLT'nin kök hücrelerin farklılaşmasını ve proliferasyonunu arttırdığını, daha yüksek oranda büyüme faktörü salınımını sağladığını, alkalin fosfataz aktivitesini ve kalsiyum seviyelerini arttırdığını gösteren in vitro çalışmalar da mevcuttur (15).

Souza ve ark. ise, DDLT'nin kök hücreler üzerindeki etkisini in vivo olarak değerlendirilebilmek için planaryalardaki rejeneratif süreci incelemişlerdir (187). Ampute edilmiş solucanlarda, her gün günde 3 dakika süreyle 910 W/m^2 gücünde, 685 nm diyot lazer (35 mW) uygulamışlar ve amputasyondan sonra 4., 7. ve 15. günde histolojik inceleme yapmışlardır. Rejenerasyonun 4. gününde kök hücre sayısında önemli bir artış olduğu ve bu rejenerasyonun lazer uygulamaları ile arttırıldığı gösterilmiştir. Bu bulgular, DDLT'nin kök hücreler ve doku rejenerasyonu üzerindeki etkilerini inceleyecek çalışmaların arttırılmasını teşvik etmiştir (187).

2.10. Üzüm Çekirdeği Ekstresi (ÜÇE)

Üzümün (*Vitis vinifera*) tıbbi ve besinsel değeri binlerce yıldır bilinmektedir. Birçok antik Yunan filozofu, üzümün iyileştirici etkisinden bahsetmiştir (188). Fransızlarda, doymuş yağdan zengin besinlerin ve sigaranın fazla tüketilmesine, egzersizin ise yeterince yapılmamasına rağmen kardiyovasküler hastalıklardan ölüm oranının diğer ülkelere oranla daha az olduğu farkedilmiştir. Bu, 20. yüzyılın sonlarında ilk defa 1979'da Lancet dergisinde, Leger ve ark. daha sonra da 1992'de Renaud ve ark. tarafından "Fransız Paradoksu" olarak tanımlanmıştır. Epidemiyolojik çalışmalar bu paradoksun nedenini, içinde yüksek konsantrasyonda proantosiyanidin bulunduran kırmızı şarabın, Fransızlar tarafından fazla tüketilmesi olarak göstermiştir. Proantosiyanidinlerin ise şarabın içindeki alkolden değil, üzüm çekirdeğinden kaynaklandığı rapor edilmiştir. Üzüm çekirdeği, hem nicelik ve hem de nitelik açısından önemli bir proantosiyanidin kaynağıdır (189).

Üzüm çekirdeği ekstresi (ÜÇE), *Vitis vinifera* bitkisinden elde edilen flavonoid türevindeki önemli bir antioksidandır (190). Proantosiyanidinler, üzüm çekirdeğinin aktif bir birleşeni olup (191) karaciğerde metilasyon, dehidroksilasyon, oksidasyon, glukronik asitle veya sülfatla konjügasyon reaksiyonları ile metabolitlerine ayrılırlar (192).

Proantosiyanidinlerin, maksimum konsantrasyona ulaşma süresi 45 dakika iken, yarılanma ömrü 5 saattir (192). Sıçan çalışmalarında, proantosiyanidinlerin yüksek dozlarda (1400-1500 mg/kg/gün) bile toksik ve mutajenik etkisine rastlanmamıştır. Önerilen oral alım dozu, 50-150 mg/gün ya da 1 mg/kg/gün olup, günlük 300 mg önerenler de vardır. Doz aralığı geniş ve güvenlidir. Metabolitleri temel olarak idrar ve feçes ile az oranda da karbondioksit ile elimine edilirler. Oral uygulamadan sonra hızlı şekilde plazmada görülürler; uygulanan dozun %70'i ilk 24 saat içinde idrar ile atılır (193). ÜÇE için yapılan doz çalışmalarında erkek ve dişi albino sıçanlarda gastrik entübasyon yoluyla verilen ÜÇE'nin LD50 değerinin 5000 mg/kg'dan fazla olduğu gösterilmiştir (194).

Bugüne kadar yapılan *in vivo* çalışmalarda ÜÇE'nin herhangi bir yan etkisi bulunmamıştır. ÜÇE uzun yıllardan beri Amerika ve Avrupa'da kullanılan bir besin takviyesidir ve FDA tarafından GRAS (Genel olarak güvenli kabul edilen) statüsüne

konulmuştur (188).

2.10.1. Üzüm çekirdeği ekstresinin kullanım alanları

Flavonoidlerin antiinflamatuvar ve bağışıklık sistemini düzenleme etkilerinin olduğu bildirilmiştir. Kılcal damarlardaki kırılgenliği ve geçirgenliği azaltarak, vasküler bozukluklara karşı koruyucu olarak rol oynarlar (195). Khanna ve ark. proantosiyanidinlerin anjiyogenezisi arttırarak yara iyileşmesini hızlandırdığını bildirmişlerdir (196). Flavonoidler, diyetle alınan kolestrolün emilimini azaltarak, safra asidi salgısı ve reverse kolestrol transportunu güçlendirerek kolestrol düşürücü etki gösterir. Flavonoidler ve proantosiyanidinler, kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik etkileri ile antikarsinojenik etki gösterirler. Çeşitli epidemiyolojik çalışmalar ile, flavonoid tüketiminin koroner kalp hastalıkları, ateroskleroz ve felç riskini azalttığı gösterilmiştir. Flavonoidler, trombozis ve trombosit agregasyonunu inhibe ederek kardiyovasküler hastalıkların riskini azaltırlar (195).

Daha önceki çalışmalar, flavonoidlerin diyetdeki çözülme fraksiyonu arttırdığını ve gastrik mukozayı koruduğunu bildirmiştir. Proantosiyanidinlerin, kalsiyum iyonlarının seçici azalmasına neden olduğu, fakat toksikolojik etkileri arttırmadığı rapor edilmiştir (27). Dahası, ÜÇE kullanımının kemik formasyonunu indüklediği ve kortikal kemikte önemli artış meydana getirdiği bildirilmiştir. ÜÇE karışımlarının trabeküler kemiğin mineral içeriğini arttırması, ÜÇE'nin kemik formasyonuna etki ettiğinin göstergesi olarak kabul edilebilir (27).

Serbest radikaller, kemikteki kalsiyum rezorpsiyonunu arttırır. Flavan-3-ol ya da catechin gibi aktif proantosiyanidin birleşenleri kalsiyum emilimi için gerekli olan serbest radikalleri yakalarlar ve bu bileşenler, ÜÇE'nin antioksidan etkisinden sorumludurlar (24). Ipriflavone gibi flavonoid türevlerinin kalsiyum alımına ve kemik yapımına etkisi deneysel olarak incelenmiş olup bunlar, kemik rezorpsiyonu inhibitörü olarak osteoporozis tedavisinde kullanılmıştır (25). Çeşitli çalışmalarla proantosiyanidinlerin, kemik rezorpsiyonunu başlatan proteolitik enzimleri inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu mekanizma ile, ÜÇE'nin kemik rezorpsiyonunu inhibe etme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir (197).

Proantosiyamidinlerin, kemik dokusunu sahip oldukları antioksidan ve antiinflamatuvar özellikler sayesinde etkiledikleri düşünülmektedir. Proantosiyamidinler ile beslenen sıçanların serumunda, kontrol grubuna göre daha fazla oksidatif stres direnci olduğu in vitro olarak görülmüştür (198). ÜÇE'nin, insan ve fare preosteoklastlarının rezorpsiyonunu ve osteoklastogenezisini inhibe ettiği, osteoblast kültürlerinde osteoblast farklılaşmasını ve mineralizasyonunu arttırdığı gösterilmiştir (199).

Ayrıca, literatürde ÜÇE'nin mandibula üzerindeki etkilerini değerlendiren çalışmalar da mevcuttur. Kamitani ve ark. yaptıkları çalışmada, ÜÇE tedavisinin sıçan mandibulasında hem kemik direncini, hem de kemik formasyonunu arttırdığını bulmuşlardır (27). Ishikawa ve ark. ise, düşük doz kalsiyum diyetiyle mandibular kondilde kemik güçsüzlüğü oluşturulan sıçanlarda, üzüm çekirdeği proantosiyamidin ekstresinin etkilerini değerlendirmişlerdir. 40 erkek Wistar sıçan, kontrol grubu, düşük kalsiyum diyeti uygulanan grup, önce düşük kalsiyum diyeti ardından yüksek kalsiyum diyeti uygulanan grup ve önce düşük kalsiyum diyeti ardından yüksek kalsiyum ile üzüm çekirdeği proantosiyamidin ekstresi diyeti uygulanan grup olarak 4 gruba ayrılmıştır. Önce düşük kalsiyum diyeti ardından yüksek kalsiyum ile üzüm çekirdeği proantosiyamidin ekstresi diyeti uygulanan grubun, diğer gruplara göre daha yüksek kortikal kemik yoğunluğuna, total kemik cross-sectional alanına, kortikal kemik cross-sectional alanına, kortikal kemik mineral içeriğine, total kemik yoğunluğuna ve total kemik mineral içeriğine sahip olduğu bildirilmiştir. Üzüm çekirdeği proantosiyamidin ekstresi ile kombine edilmiş yüksek kalsiyum diyeti uygulaması, mandibular kondilde kemik güçsüzlüğünün tedavisinde daha etkili bulunmuş olup ÜÇE'nin sıçan mandibular kondilinde ilave kemik formasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (24). Kritik büyüme döneminde ÜÇE'nin mandibular kondildeki kemik formasyonuna etkisi rapor edilmiş olup (27), endokondral kemikleşme esnasında mandibular kondil kıkırdağına olan etkileri henüz değerlendirilmemiştir (24).

2.11. Kullandığımız İmmunohistokimyasal Belirteçler

2.11.1. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF)

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), uzun kemiklerde ve kondilde endokondral kemikleşme sırasında sentezlenen önemli bir düzenleyicidir. Mandibular kondildeki kondrositler, VEGF sentezleyerek neovaskülarizasyonu stimule ederler ve kırıkdağın kemik ile yer değiştirmesini başlatırlar. Kondildeki VEGF ekspresyonu, yeni kemik yapımını arttırarak mandibulanın önde konumlanma miktarını arttırır. Mekanik uyarılara mandibular kondilin vereceği büyüme cevabında, VEGF ekspresyonunun yeni kemik yapımı ile korelasyonu oldukça önemlidir. (200).

Anjiyogenez (kan damarlarının invazyonu) ile osteogenezis yakından ilişkilidir. Kan damarlarının invazyonu, osteojenik mezenkimal hücreleri mineralizasyon bölgesine getirir. Bu hücreler, daha sonra osteoblastlara farklılaşarak osteogenezis yapar. Yapılan bir çalışmada, farelere sistemik olarak verilen çözünür reseptör kimerik (chimeric) protein ile VEGF inaktive edilerek kan damarlarının invazyonu baskılanmıştır. Böylece, trabeküler kemik yapımı, hipertrofik kondrosit bölgesinin genişlemesiyle engellenmiştir. VEGF, hipertrofik kırıkdağın neovaskülarizasyonunda ve kondildeki endokondral kemikleşmenin düzenlenmesinde önemli rol oynar (54).

2.11.2. Osteonektin (ON)

Osteonektin (ON), SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) veya basement-membrane protein 40 (BM-40) olarak da bilinmektedir. Osteonektin, kemikteki kalsiyuma bağlanan bir glikoproteindir. Kemik formasyonu sırasında osteoblastlardan sentezlenir. Mineralizasyonu başlatır ve mineral kristal formasyonunu arttırır. ON, kemik kalsiyumu gibi kollajene de affinite göstermektedir (201). Kollajene bağlanarak hidroksi apatit kristal formasyonunu arttırdığı bildirilmiştir (202). ON, immature kemikte bol miktarda bulunmakta olup kollajen mineralizasyonunu arttırmaktadır (201).

Aktif osteoblastlarda ve kemik iliği progenitor hücrelerinde, hipertrofik kondrositlerde, odontoblastlarda, periodontal ligament ve gingival hücrelerde yüksek miktarda ON bulunmaktadır. Özellikle osteoid doku ve yüksek turnover gösteren dokularda daha

fazla rastlanılmaktadır (203). Damarlanma mekanizması kemikleşmenin gerçekleşmesi için oldukça önemlidir ve Osteonektin, anjiyogenezisi artırır (204).

2.11.3. Tip II kollajen

Tip II kollajen, kondilin kıkırdak matriksinin temel komponentidir. Endokondral ossifikasyonda oldukça önemlidir. Kondrosit-spesifik belirteç olup mandibulanın önde konumlandırılmasıyla artış gösterdiği bildirilmiştir (205).

Mandibulanın önde konumlandırılması, Sox-9 ve Tip II kollajen ekspresyonunu artırarak, mandibular kondildeki kıkırdak matriks formasyonunu ve kondrosit farklılaşmasını artırır (206).

2.11.4. STRO-1

STRO-1, mezenkimal/ stromal kök hücre belirteçidir. İnsan CD34 + kemik iliği hücresi popülasyonu ile aşılardan üretilmiştir. İnsan kemik iliğindeki stromal elementler tarafından eksprese edilen bir hücre yüzey antijenini tanımlayabilir. STRO-1, insan kemik iliği stromal hücre prekürsörlerinin tanımlanması, izolasyonu ve fonksiyonel karakterizasyonu için önemli bir antikordur (207).

STRO-1, adipozit, osteoblast ve kondrositlere farklılaşma potansiyeline sahip progenitor hücrelerin ekspresyonunun ayırt edilmesinde kullanılmaktadır. Kıkırdağın, yaralanma sonrası kendi kendini tamir etme yeteneğine sahip çok sayıda STRO-1 pozitif kondrosit içerdiği çalışmalarda gösterilmiştir (208).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmamız için Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Hayvan Denepleri Yerel Etik Kurulu'ndan 02/02/2016 tarih ve 77.637.435-02 karar no ile onay alınmıştır. Çalışmamız yine aynı üniversitenin deney hayvanları laboratuvarından temin edilen ağırlıkları 250±50 gram arasında 45 adet 6 haftalık erkek Wistar albino sıçan ile yapılmıştır. Deney sonunda yapılan sakrifikasyon ile elde edilen alt çene sol kondiline ait histolojik kesitler aynı üniversitenin Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında incelenip değerlendirilmiştir.

3.1. Araştırmada Kullanılan Malzemeler

3.1.1. Araştırmanın deney safhasında kullanılan malzemeler

- Silikon Ölçü Maddesi (Heraeus, Optosil Comfort, Hanau/Almanya)
- Silikon Ölçü Maddesi Aktivatörü (Heraeus, Optosil Comfort, Hanau/ Almanya)
- Essix Plak (Clear Advantage, TX/ ABD)
- Sert Alçı (Elite Model, 165744, Zhermack, Rovigo/ İtalya)
- Lak (Keram-Keramik, Presidentblue, İstanbul/ Türkiye)
- Krom Kobalt Metal (Türkiye)
- Kompozit seti (3M™ ESPE™ Z100™ Restorative dispenser for capsule, Monrovia, CA / ABD)
- Self Etch Primer (Transbond Plus Self Etching Primer, 359651, 3M, Monrovia, CA/ ABD)
- Led Işık Cihazı (Valo, Ultradent, Utah/ ABD)
- 970 nm Diyot Lazer (SiroLaser Xtend, Sirona/ İtalya)
- Dijital Tartı

- 2 adet Cerrahi Makas
- 2 adet Cerrahi Portegü
- Oral Gavaj Sondası, İtem No:18061-75 (Fine Science Tools, Heidelberg Germany)
- Fotoğraf Makinası (Sony alpha 6000, Japan)
- Koruyucu Gözlük
- U100 Tek Kullanımlık İnsulin Şırıngası (BD Micro-Fine™, İstanbul/ Türkiye)

3.1.2. Araştırmada kullanılan farmakolojik ajanlar

- Ketamin hidroklorür (Ketalar-Eczacıbaşı, İstanbul/ Türkiye)
- Xylazine (Rompun-Bayer, Leverkusen/ Almanya)

3.1.3. Araştırmanın histolojik değerlendirilmesinde kullanılan malzemeler

- EDTA Solüsyonu (Merck, Darmstad/ Almanya)
- %10'luk Formalin Solüsyonu (Merck, Darmstad/ Almanya)
- %5'lik Formik Asit Solüsyonu (Tekkim, Bursa/ Türkiye)
- Masson Trikrom (Surgipath, Peterborough/ ABD)
- Xylene (Leica, 400811/ Wetzlar/ Almanya)
- Doku Tespit Makinası (Thermoscientific, ExcelsiorES/ ABD)
- Lam (Patolab, 165008/ Çin)
- Parafin (Leica,Wetzlar/ Almanya)
- Parafine Gömme Makinası (Thermoscientific, Histostar/ Waltham, Massachusetts/ ABD)
- Mikrotom Bıçağı (Feather, 12031985P, Osaka/ Japonya)

- Mikrotom Cihazı (Leica RM2255, Wetzlar/ Almanya)
- Işık Mikroskobu (Leica DM5000 B, Wetzlar/ Almanya)
- Görüntü Analiz Programı (Leica Qwin.Plus, Cambridge/ İngiltere)
- Distile su
- Saf Alkol (Etil Alkol) (Sigma-aldrich, Darmstad/ Almanya)
- Alkol 96% (Sigma-Aldrich, Darmstad/ Almanya)

3.2. Çalışma Gruplarının Tanımlanması

Deneyimizde kontrol grubunda 3, deney gruplarında ise 42 adet olmak üzere toplamda 45 adet erkek Wistar sıçan kullanılmıştır. 42 adet Wistar sıçanı, 7 adet deney grubuna eşit miktarda (6'şar adet) dağıtılmıştır. Ayrıca, çalışmanın başında 2 tane de erkek Wistar sıçan kök hücre eldesi amacıyla kurban edilmiştir. Deney ve kontrol grubunda bulunan sıçanlar herhangi bir ayırım göstermeksizin rastgele olacak şekilde gruplara dağıtılmıştır. Deney ve kontrol grubunda bulunan tüm sıçanlar deney süresince ısı (18-22° C), nem kontrolü (%40–%60) ve 12 saat gece 12 saat gündüz siklusu sağlanan (sabah 7, akşam 7) odada aynı şartlar içinde muhafaza edilmişlerdir.

Denekler çalışma protokolü gereği toplam 8 gruba ayrılmışlardır:

GRUP 1: Üç adet sıçandan meydana gelen kontrol grubudur. Bu gruptaki sıçanlarda herhangi bir apacey ya da herhangi bir kök hücre, lazer veya üzüm çekirdeği uygulaması yapılmamıştır. Diğer gruplardaki sıçanların kondil histolojik yapıları ile karşılaştırma yapılabilmesi için oluşturulan kontrol grubudur.

GRUP 2: Kök hücre, düşük doz lazer veya üzüm çekirdeği uygulaması yapılmış olan gruplarla karşılaştırma yapabilmek için oluşturulan, ağız içi apacey (AİA) taşıyan sıçanlardan meydana getirilen gruptur.

GRUP 3: Ağız içi apacey taşıyan ve intraoral gavaj yöntemiyle 300 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstresi uygulanmış sıçanlardan meydana getirilen gruptur.

GRUP 4: Ağız içi aparey taşıyan ve kondil bölgesine 8 J/cm^2 (0.5 watt, 16 sn boyunca) düşük doz lazer uygulanmış sıçanlardan meydana getirilen gruptur.

GRUP 5: Ağız içi aparey taşıyan ve kondil bölgesine 8 J/cm^2 düşük doz lazer (0.5 watt, 16 sn boyunca) uygulaması ile birlikte, intraoral gavaj yöntemiyle 300 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstresi uygulanmış gruptur.

GRUP 6: Ağız içi aparey taşıyan ve intraoral gavaj yöntemiyle 300 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstresi ile birlikte, kondil bölgesine 1×10^6 hücre / 100 ul besiyeri kök hücre uygulanmış gruptur.

GRUP 7: Ağız içi aparey taşıyan ve kondil bölgesine 8 J/cm^2 düşük doz lazer (0.5 watt, 16 sn boyunca) ile birlikte, 1×10^6 hücre / 100 ul besiyeri kök hücre uygulanmış gruptur.

GRUP 8: Ağız içi aparey taşıyan ve kondil bölgesine 8 J/cm^2 düşük doz lazer (0.5 watt, 16 sn boyunca) ile birlikte, 1×10^6 hücre / 100 ul besiyeri kök hücre ve aynı zamanda intraoral gavaj yöntemiyle 300 mg/kg/gün üzüm çekirdeği ekstresi uygulanmış gruptur.

Tüm denekler, 30 günlük deney sonunda kurban edilmiştir.

Düşük doz lazer, kök hücre ve üzüm çekirdeği ekstresi uygulamalarının amacı, AİA taşıyan sıçanlarda bu uygulamaların tek başına veya beraber kullanımlarıyla birlikte kondil kırıkdağının büyüme ve remodelingi üzerine etkilerinin var olup olmadığını belirlemektir.

Deney grupları bu şekilde oluşturulduktan sonra, denekler, her deney grubu tek bir kafese yerleşecek şekilde, toplamda 8 farklı kafese yerleştirilmiştir. AİA ve diğer uygulamaların olası yan etkileri nedeniyle meydana gelebilecek ağırlık kayıplarının önlenmesi amacıyla denekler, toz pelet ile suyun karıştırıldığı standart soft diyet ile Ad libitum olarak beslenmişlerdir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışma gruplarının tanımlanması

<i>Gruplar</i>	<i>Denek Sayısı</i>	<i>Aparey</i>	<i>Lazer</i>	<i>Kök Hücre</i>	<i>Üzüm Çekirdeği</i>
<i>G 1</i>	3	YOK	YOK	YOK	YOK
<i>G 2</i>	6	VAR	YOK	YOK	YOK
<i>G 3</i>	6	VAR	YOK	YOK	VAR
<i>G 4</i>	6	VAR	VAR	YOK	YOK
<i>G 5</i>	6	VAR	VAR	YOK	VAR
<i>G 6</i>	6	VAR	YOK	VAR	VAR
<i>G 7</i>	6	VAR	VAR	VAR	YOK
<i>G 8</i>	6	VAR	VAR	VAR	VAR

3.3. Ağız İçi Aparey (AİA) Uygulaması

3.3.1. Ölçü alınması ve ağız içi apareyin hazırlanması

İlk olarak bir silikon bazlı ölçü maddesi (Heraeus, Optosil Comfort, Hanau/ Germany) ile sıçanların alt keser dişlerinin ölçüsü alınmıştır. Alınan bu ölçüler, alt çeneyi önde konumlandırarak AİA yapılması için laboratuvar ortamında hazırlanmış krom kobalt modellerin elde edilmesinde kullanılmıştır (Resim 3.1). Daha sonra, hazırlanan bu krom kobalt modeller üzerinde 1 mm kalınlığındaki Essix plaktan (Clear Advantage, Orthotechnology.TC/ USA) yaklaşık olarak 50 adet AİA yapılmıştır (Resim 3.2).



Resim 3.1. Alınan ölçülerden elde edilen krom kobalt model



Resim 3.2. Elde edilen krom kobalt modellere basılan 1 mm kalınlığındaki Essix plak

3.3.2. Ağız içi apareyin (AİA) yerleştirilmesi

Denekler, %20 oranında Lidocaine (Rompun-Bayer/ Germany) ve %80 oranında Ketamine hydrochloride (Ketalar-Eczacıbaşı/ Türkiye) karışımı ile intraperitoneal olarak anestezi altına alındıktan sonra; AİA'in temiz bir yüzeye uygulanabilmesi amacıyla sıçanların alt keser dişleri yıkanıp kurulanmıştır. Diş yüzeyi Transbond™ Plus Self Etching Primer (3M Unitek, Monrovia, California) ile asitlendikten sonra ışıklı kompozit seti (3M™ ESPE™ Z100™ Restorative dispenser for capsule, USA) ile aparey yapıştırılmıştır. Essix apareyi, alt çeneyi hem istirahat konumundayken, hem de kapanıştayken önde ve aşağıda konumlandırarak şekilde yapıştırılmıştır. Aparey yapıştırıldığında deneklerin alt keser dişleri üst keser dişlerin önünde konumlandırılmış olup anterior cross bite oluşturulmuştur. Bu haliyle denekler, alt çenesini kesinlikle geriye alamamaktadır. Ancak, sıçanlar çok güçlü kemirgenler oldukları için apareylerini aşındırmaya ve çıkarmaya çalışmaktadırlar. Bu nedenle, deneklerin ağız içindeki apareylerinin durumları günlük olarak kontrol edilmiştir. Deney süresince apareylerde görülen aşınmalar nedeniyle hasara uğramış ya da konumu değişmiş apareyler mevcutsa, aynı metodlar uygulanarak yenileri ile değiştirilmiş ve alt çenenin 4 hafta boyunca istenilen pozisyonda kalması sağlanmıştır (Resim 3.3).



Resim 3.3. Deneklerin alt dişlerine çapraz kapanış sağlanacak şekilde Essix plakların yapıştırılma aşaması

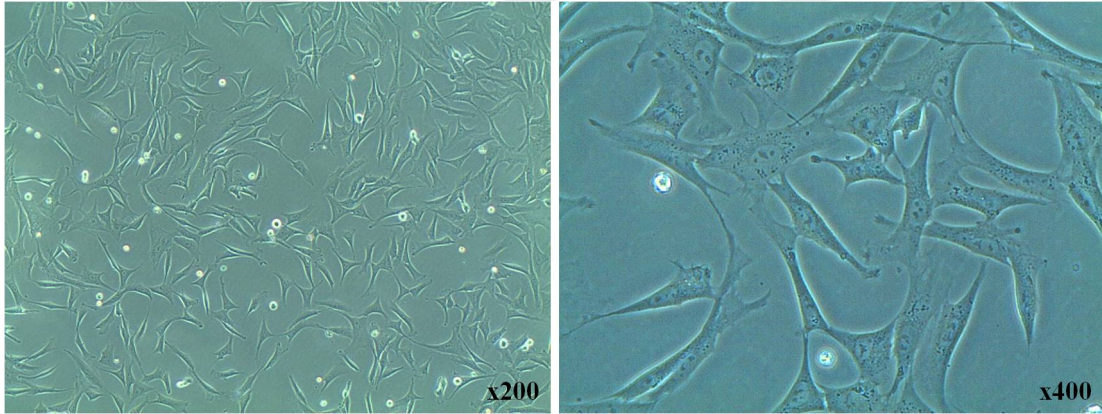
3.4. Kök Hücre Uygulaması

3.4.1. Kök hücre eldesi

İki adet sıçanın yağ dokusundan alınan hücreler, ayrıştırılmayı takiben 25 cm²'lik hücre kültür kabı içinde alınarak 37 °C'de, %5 CO₂ koşulları altında çoğalması ve konfluent olması için % 10 fetal buzağı serumu (FCS), 50 µgr/ml gentamisin, 100 UI/ml penisilin, 100 UI/ml streptomisin, 100 UI/ml amfoterisin içeren DMEM kültür ortamına bırakılmıştır. Üç gün süreyle yağ doku kaynaklı kök hücrelerin hücre kültür kabına yapışmaları sağlanmış ve iki günde bir kültür vasatı değiştirilerek hücreler, 3. pasaja (P3) kadar çoğaltılmıştır. Uygulama sonrası kök hücrelerin dokuda belirlenebilmesi amacıyla, hücre çoğalmasını gösteren timidin analogu 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) yöntemi ile işaretleme yapılmıştır.

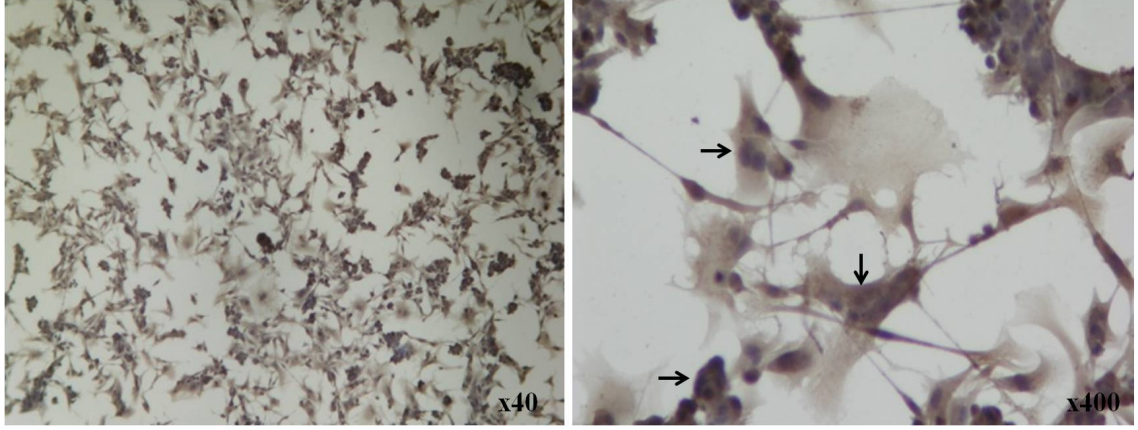
3.4.2. YDMKH Tanımlanması

Yağdan alınan doku, kültür ortamında tutundurulup çoğaltılmıştır. YDMKH besiyeri ortamında konfluent oluncaya kadar kültüre edilmiş ve üçüncü pasaja getirilerek deneylerde kullanılabilir hale getirilmiştir (Resim 3.4).

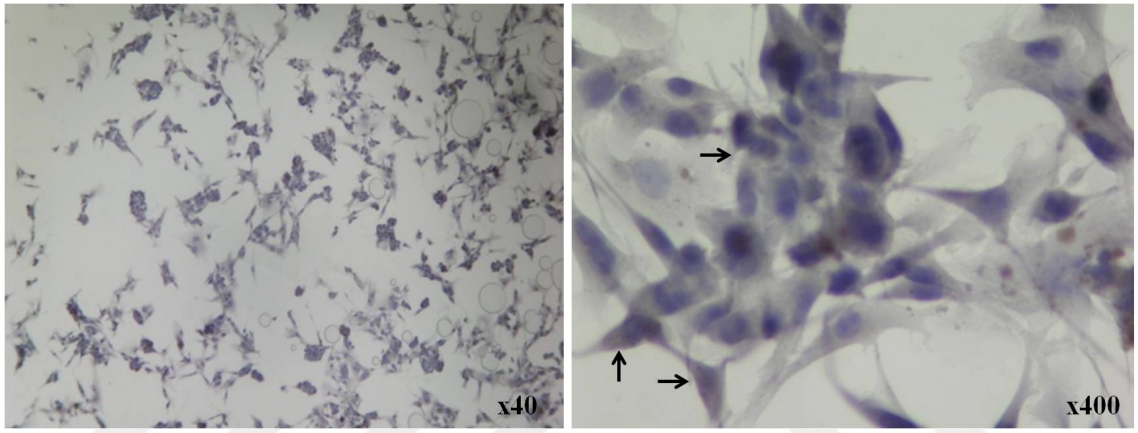


Resim 3.4. YDMKH için kültür ortamında yerleşip, çoğalmış 3. pasajdaki hücrelerin inverted mikroskop görüntüleri

YDMKH deneylerde kullanılabilir hale getirildikten sonra karakterizasyonu sağlanmıştır. MKH, belirteç olarak STRO-1 pozitifliği ve CD45 negatifliği açısından immunohistokimyasal olarak doğrulanmıştır (Resim 3.5).



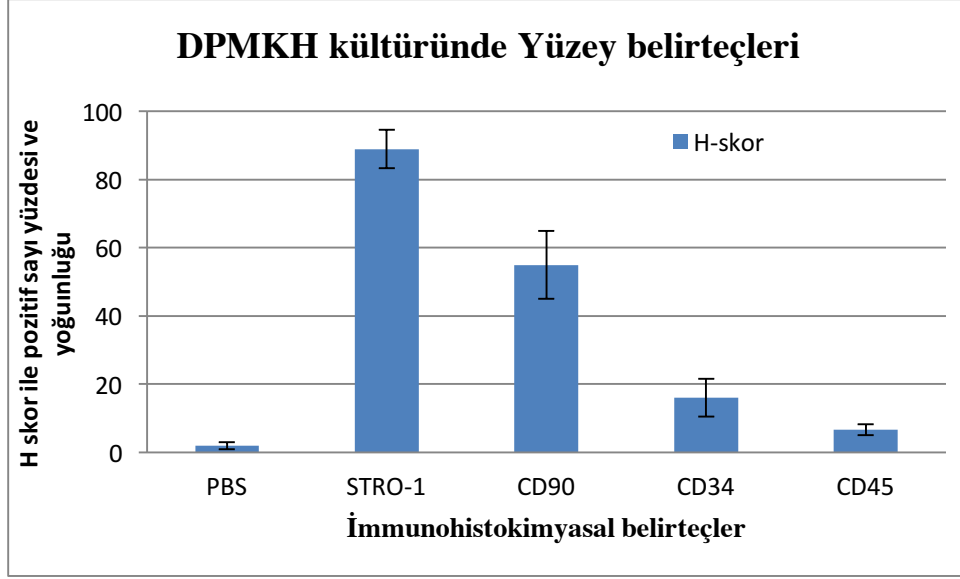
STRO-1



CD45

Resim 3.5. DPMKH STRO-1 antikor ile boyanmış pozitif ve CD45 ile boyanmamış negatif immunohistokimya görüntüleri ile tanımlamalarının yapılması sağlanmıştır.

Hücrelerin boyanmaları üzerinden yapılan skorumla ile büyük çoğunluğunun MKH oldukları işaretlenerek gösterilmiştir (Şekil 3.1.)



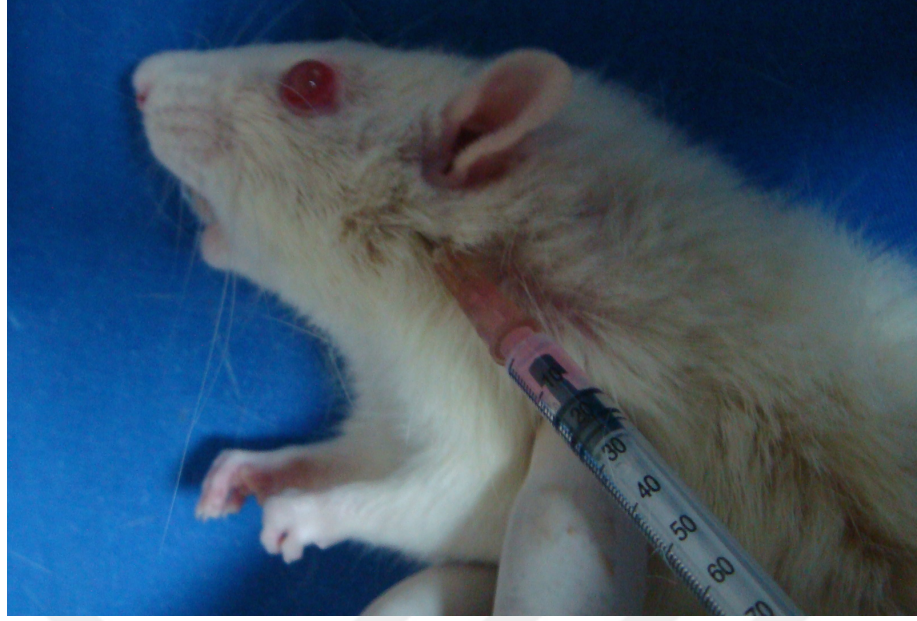
Şekil 3.1. DPMKH STRO-1, CD90, CD34 ve CD45 tanımlanmasının skorlama ile analizinde hücrelerimizin tanımlamaları doğrulanmıştır.

3.4.3. Kök hücre uygulanması

Mezenkimal kök hücre (MKH) uygulaması, 1×10^6 hücre / 100 ul besiyeri ile her iki kondilin temporamandibular eklemine intraartiküler olarak enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir (Tablo 3.2). İşlem genel anestezi altında yapılmıştır.

TME'nin lokalizasyonunun yapılabilmesi için, öncelikle mandibula öne doğru manipüle edilmiş ve TME, göz lateral kantusunun yaklaşık 5-10 mm posteriorunda palpasyonda hissedilmiştir. İlgili bölge sabit kalemle işaretlenmiştir. 30 gauge enjektör, temporal kemiğin zigomatik çıkıntısının posteriorundan (eklem fossasının çatısı) girecek şekilde yerleştirilmiştir ve daha sonra medioanterior olarak eklem boşluğuna doğru enjektör hareket ettirilmiştir. Ardından kök hücre eklem boşluğuna yavaşça enjekte edilmiştir (Resim 3.6).

Ayrıca lokal uygulamayı takiben haftada bir kez aynı gün ve saatte olacak şekilde birer kez 1×10^6 hücre / 100 ul besiyeri dozunda kök hücre intraperitoneal olarak tekrar uygulanmıştır (Tablo 3.2).



Resim 3.6. Deneklere kök hücre enjeksiyonu

3.5. Üzüm Çekirdeği Ekstresi Uygulaması

3.5.1. Üzüm çekirdeği ekstresi hazırlanması

Çalışmada kullanılan kara üzüm çekirdeği (*Vitis vinifera* L.) Denizli ilinden toplanmıştır. Sağlıklı tohumlar seçilerek kurutulmuş ve mekanik parçalayıcıda küçük parçalar haline getirilmiştir. Parçalanmış tohumlar 100'er gram tartılarak Soxhlet Cihazının (Gerhardt EV 14) kartuşlarına yerleştirilmiştir. Soxhlet cihazında her kartuş için 500 mL saf etil alkol (Merck) ile 50-60 °C'de 6 saat özütlemeye tabi tutulmuştur. Elde edilen özütler Whatman no: 4 ile filtre edildikten sonra yüksek vakum altında Rotary Evaporatörde (Heildolph Heizbad HB Digit) 40° C'de yoğunlaştırılmıştır. Elde edilen özütler +4° C'de deney başlayana kadar muhafaza edilmiştir.

3.5.2. Üzüm çekirdeği ekstresi uygulanması

Üzüm çekirdeği ekstresi, 300 mg/kg/gün olacak şekilde distile su ile karıştırılarak intraoral gavaj yöntemiyle sistemik olarak verilmiştir. Üzüm çekirdeği ekstresinin özelliklerinin kaybolmaması için ekstre +4° C'de saklanmış ve üzüm çekirdeği ekstresinin su ile karışımı günlük olarak hazırlanmıştır. Karışım hazırlanırken 5mg/ml/kg sabit oranı kabul edilmiştir. Her sıçanın ağırlığına göre belirlenen miktarda karışım verilmiştir (Resim 3.7 ve Tablo 3.2).



Resim 3.7. Deneklere intraoral gavaj yöntemiyle üzüm çekirdeği ekstresi uygulaması

3.6. Lazer Uygulaması

Bu çalışmada, kondil bölgesine gūnaşırı gūnde 1 kez olacak şekilde 8 J/cm^2 (0.5 watt, 16 sn boyunca) düşük doz diyot lazer uygulaması toplam 15 kez yapılmıştır. Aparentlerin yerleştirilmesini takiben 4., 5., 7. ve 8. gruplardaki deneklere lazer uygulanmıştır. Lazer uygulamasından önce sıçanlar tek el ile güzelce sabitlenerek kondil, nazikçe ideal konumuna getirilmiş ve lazer, her iki kondilin TME bölgesine uygulanmıştır (Resim 3.8 ve Tablo 3.2).



Resim 3.8. Deneklere düşük doz lazer uygulaması

Tablo 3.2. DDLT, MKH ve ÜÇE uygulamaları

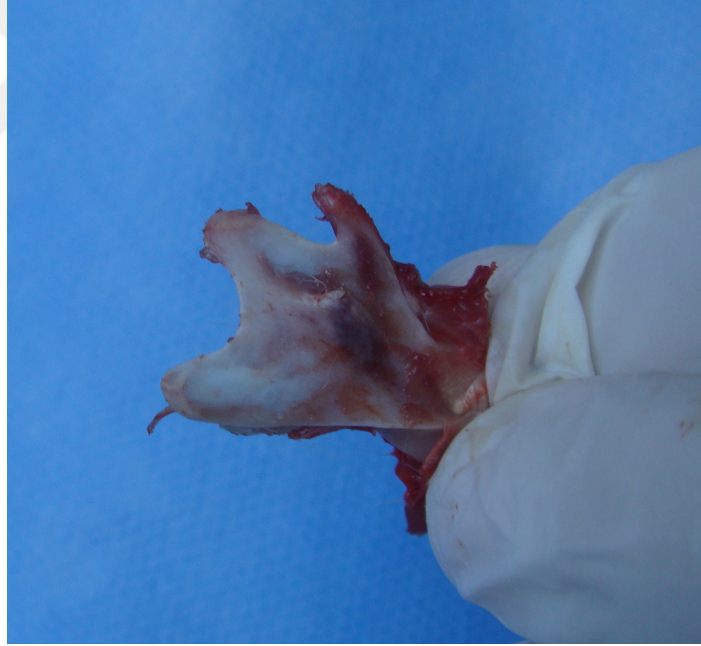
Yapılan İşlem	Uygulama Yolu	Doz	Uygulanan Günler	Toplam Uygulama Sayısı
MKH	Lokal (intraartiküler enjeksiyon)	1×10^6 UI/ml.	0. gün	Başlangıçta tek doz
	Sistemik (intreperitonal enjeksiyon)	1×10^6 UI/ml.	0.-7.-14.-28. günler	Her hafta tek doz - Toplam 4 doz
DDLT	Lokal	8 J/cm ²	0.- 2.- 4.- 6.- 8.- 10.-12.- 14.- 16.- 18.- 20.-22.- 24.- 26.- 28. günler	Gün aşırı 1 kez- Toplam 15 kez
ÜÇE	Sistemik (intraoral gavaj)	300 mg/kg/gün	Deney süresince her gün tek sefer	Toplam 30 kez

3.7. Ağırlık Takibi

Deneklerin ağırlıkları, deneyin başlangıcından itibaren deney sonuna kadar haftalık olarak ölçülmüştür. Ölçümler, deney grupları ile kontrol grubunun büyümelerini incelemek ve karşılaştırmak için kaydedilmiştir.

3.8. Sakrifikasyon

Deneklere 4 haftalık deney süresinin sonunda, yüksek dozda anestezi verilerek ötenazi işlemi yapılmıştır. Öncelikle mandibula kafa bölgesinden disseke edilerek ayrılmıştır. Hemen ardından ise, mandibula sağ ve sol olmak üzere iki parçaya ayrılarak %10'luk Formalin Solüsyonuna (Merck, Darmstad/Germany) konularak histomorfometrik analiz yapılması için histoloji laboratuvarına gönderilmiştir. Çalışmamızda, histomorfometrik analiz yapmak için sol mandibula kullanılmıştır (Resim 3.9 ve Resim 3.10).



Resim 3.9. Diseke edilmiş kondile ait görüntü



Resim 3.10. Diseke edilmiş sol mandibulanın görünümü

3.9. Histomorfometrik Analizi

Uygulamalar sonrasında örnekler çıkartıldıktan sonra % 10'luk tamponlanmış formalin solüsyonunda 24–72 saat fikse edilmiş, daha sonra %10'luk EDTA içerisinde dekalsifiye edilmiştir. Dekalsifikasyon işleminden sonra örnekler akar suda yıkanmış ve rutin doku takip prosedürünü takiben parafin bloklara gömülmüştür (Tablo 3.3).

Parafin bloklardan mikrotom ile yaklaşık 5 µm kalınlığında kesitler alınmıştır. Bu kesitler, her bir adezivli lamda 3–4 adet olacak şekilde dizilmiştir. Her bir örnekten kondilin posterior bölgesinde 6 kesit alınmıştır. Daha sonra elde edilen bu kesitler üzerinde yapılan ölçümlerin ortalaması alınmıştır. Kondilin dış lateral yüzeyinden, kırkıdak ve subkondral yapıların daha net incelenebilmesi için 200-250 mikron arasında trimleme yapılmıştır. Her 100 mikronda bir parasagittal olarak 5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Kesitler, 56 °C derecede etüv içinde deparafinize edildikten sonra çeşme suyunda yıkanıp histopatolojik inceleme için Hemotoksilen–Eozin ve Masson Trikrom boyası ile boyanmıştır (Tablo 3.4).

Tablo 3.3. Hızlı doku takibi ve parafine gömme protokolü

<i>YAPILAN İŞLEM</i>	<i>KULLANILAN MADDE</i>
1.TESPİT	%10 FORMALİN
2.DEKALSİFİKASYON	EDTA SOLÜSYONU
3-DEHİDRASYON	ALKOL
4-ŞEFFAFLAŞTIRMA	KSİLEN
5-İNFİLTASYON	PARAFİN
6-PARAFİNE GÖMME	PARAFİN

Tablo 3.4. Masson Trikrom boyama protokolü

<i>YAPILAN İŞLEM</i>	<i>KULLANILAN MADDE</i>
1.DEPARAFİNİZASYON	KSİLEN
2.REHİDRATASYON	%96 ALKOL %80 ALKOL %70 ALKOL %50 ALKOL
3.YIKAMA	DİSTİLE SU
4.BOYAMA	MASSON TRİKROM
5.YIKAMA	AKAR SU %50 ALKOL %70 ALKOL %80 ALKOL %96 ALKOL KSİLEN

3.10. İndirekt İmmunohistokimya Boyaması

İmmunohistokimyasal olarak dokuda yeni damar oluşumunu belirlemek için VEGF, yeni kemik oluşumunu belirlemek için Osteonektin, kök hücreleri göstermek için STRO-1, bağ doku oluşumunu göstermek için ise Tip-II Kollajen belirteçleri kullanılmıştır.

Alınan kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60°C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından % 95'ten % 60'a kadar azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile

suda 5 dakika bekletilmiştir. Dakopen ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dk %3'lük Hidrojen Peroksit (H₂O₂) uygulanmıştır. 3 defa 5'er dakika fosfat tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, bloklama amacıyla 1 saat bloklama solüsyonu ile muamele edilmiştir. Bloklama solüsyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikorlar VEGF, Osteonektin, STRO-1 ve Tip-II Kollajen ile bir gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz ikincil antikoru (85-9043 Zymed Histostain kit San Francisco,USA) ile 30'ar dakika boyanmıştır. Yine üç defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkanan kesitler, oluşturulan immunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Diaminobenzidin) ile 5 dk boyanmıştır. Mayer's hematoksilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dk yıkanan kesitler kapatma medyumu (AML060, Scytek, Logan, Utah, USA) ile kapatılmıştır. İmmunohistokimyasal değerlendirme incelenerek zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) boyanan hücreler sayılarak H-score ile değerlendirilmiştir.

3.11. İstatistiksel Yöntem

Analiz ölçümlerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde gruplar arasındaki farkın anlamlılığının değerlendirilmesinde Graphpad istatistik yazılımı kullanılmıştır. Tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ile sonuçların ortalama ve standart sapmaları değerlendirilmiştir ve p<0,05, p<0,01 ile p<0,001 olarak ifadelendirilmiştir. Gruplar arasında fark bulunması durumunda, Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farklılığı oluşturan grup istatistiksel olarak bulunmuştur. Student t-testi, grupların başlangıç ve bitim ağırlıkları açısından fark olup olmadığını değerlendirmek için kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Sıçanlar ve Kullanılan Apareylerle İlgili Gözlemsel Bulgular

Gün aşırı yapılan ağız içi muayenelerde apareyin sağlamlığı, alt ve üst keser dişlerin genel durumu, çevre yumuşak dokularda iritasyon olup olmadığı, deneklerin gıda ve su tüketim miktarlarında azalma olup olmadığı izlenmiştir. Herhangi bir problemle karşılaşılmamış olup, deneklerin 1 tanesinde uygulanan apareyde çatlama belirlenmiş ve bu aparey yenisiyle değiştirilmiştir.

4.2. Ağırlık Ölçüleriyle İlgili Bulgular

Tüm deneklerin haftalık rutin olarak ağırlıkları ölçülmüştür. Deneyin ilk günü ve denekler sakrifiye edilmeden hemen önce yapılan bu ağırlık ölçümleri Tablo 4.1 de gösterilmiştir. Grupların benzer şartları taşıması gerekliliğinden dolayı deneklerin başlangıç ağırlıkları, birbirlerine yakın olacak şekilde seçilmiştir. Deney sonunda grupların ağırlıkları değerlendirildiğinde ise, hiçbir grupta ağırlık kaybı gözlenmemiştir ($P>0,05$).

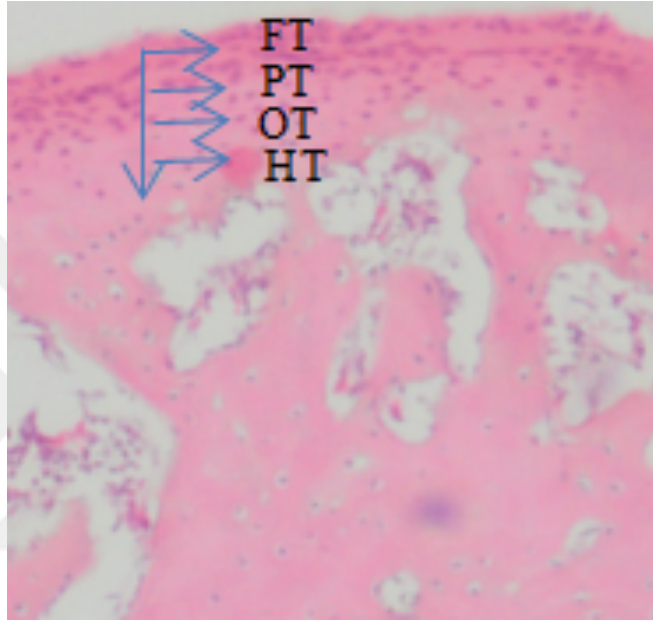
Tablo 4.1. Çalışmada kullanılan deneklerin çalışma başlangıç ve bitim ağırlık ortalamaları

Gruplar	BAŞLANGIÇ (gr.)		BİTİM (gr.)		P değeri
	Ort.	S.S	Ort.	S.S	
G1	264.66	13.01	283.33	11.06	0.826 ($P>0,05$)
G2	270.33	11.25	276.51	12.17	0.937 ($P>0,05$)
G3	266.83	14.68	269.83	16.66	0.750 ($P>0,05$)
G4	275.50	16.13	280.66	17.01	0.820 ($P>0,05$)
G5	269.16	15.72	271.50	18.74	0.881 ($P>0,05$)
G6	268.66	12.54	272.42	16.58	0.695 ($P>0,05$)
G7	262.50	12.09	267.68	14.55	0.729 ($P>0,05$)
G8	271.16	16.91	275.33	17.98	0.683 ($P>0,05$)

Ort. : Ortalama, S.s: Standart sapma

4.3. DeneY Gruplarında H-E Boyama ile Elde Edilen Bulgular

Deneklerden, 4 haftalık deneY süresinin sonunda kondil başından elde edilen, MTK ile boyanan preparatların değerlendirilmesi histomorfometrik ve immunohistokimyasal olarak yapılmıştır. Subkondral kemikteki değişimi histomorfometrik olarak ölçmek için Hipertrofik Tabakanın altında kondil kırırdağının arka bölgesinden birer kare alındı ve yeni kemik oluşumu (YKO) hesaplanmıştır.



Resim 4.1. Hemotoksilen–Eozin (H-E) ile boyanan kesitlerde kondil kırırdağı ve kırırdak altı subkondiler kemik görüntüsü (x200)

4.3.1. Yeni Osteoblast Yapımı (YOY)

Kondil kırırdağında alınan görüntülerde belirlenen standart büyütmede yapılan ölçümlerde, YOY oranının G1 ile G3, G4, G5, G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında oldukça anlamlı ($p < 0,001$) bir artış gösterdiği bulunmuştur.

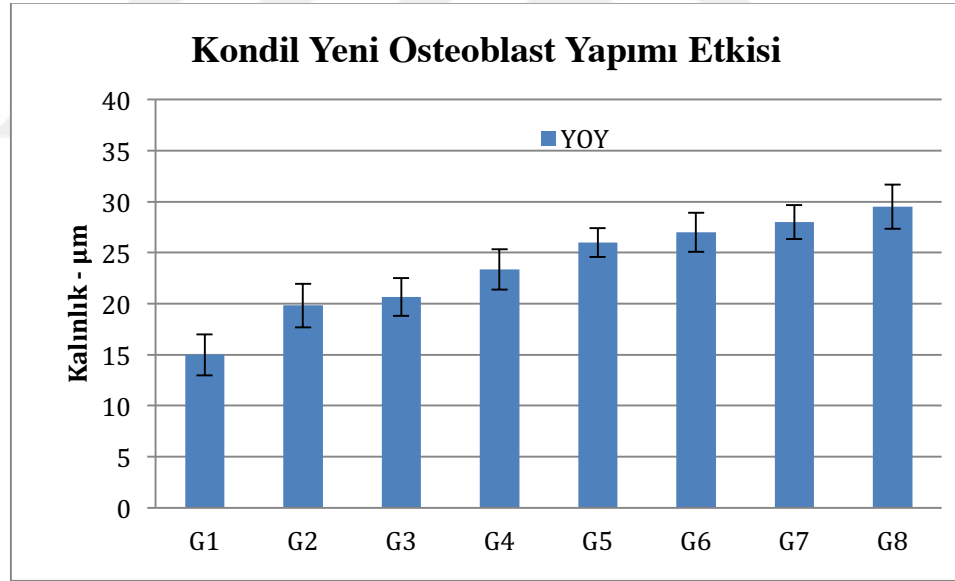
G2 ile G3, G2 ile G4 arasında fark görülmezken ($p > 0,05$), G2 ile G5, G6, G7 ve G8 arasında oldukça anlamlı ($p < 0,001$) bir fark görülmüştür. Benzer şekilde, G3 ile G5, G6, G7 ve G8 arasında oldukça anlamlı ($p < 0,001$) bir fark bulunmuştur.

G4 ile G7 arasında anlamlı ($p < 0,01$), G4 ile G8 arasında oldukça anlamlı ($p < 0,001$) bir fark olduğu görülmüştür. G7 ile G8; G5 ile G6, G7 ve G8 ; G6 ile G7 ve G8

karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3 ile Şekil 4.1).

Tablo 4.2. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni osteoblast yapımı (YOY) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama	Standart sapma
G1	15,000	2,045
G2	19,833	2,137
G3	20,668	1,862
G4	23,333	1,964
G5	26,000	1,414
G6	27,356	1,897
G7	28,211	1,675
G8	29,466	2,336



Şekil 4.1 Yeni osteoblast yapımının (YOY) grafik ile gösterilmesi

Tablo 4.3. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni osteoblast yapımı (YOY) ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Ortalama Karşılaştırma	p değeri
G1 vs G2	-4,833	p<0,05
G1 vs G3	-5,667	p<0,01
G1 vs G4	-8,333	p<0,001
G1 vs G5	-11,000	p<0,001
G1 vs G6	-12,000	p<0,001
G1 vs G7	-13,000	p<0,001
G1 vs G8	-14,500	p<0,001
G2 vs G3	-0,8333	p>0,05
G2 vs G4	-3,500	p>0,05
G2 vs G5	-6,167	p<0,001
G2 vs G6	-7,167	p<0,001
G2 vs G7	-8,167	p<0,001
G2 vs G8	-9,667	p<0,001
G3 vs G4	-2,667	p>0,05
G3 vs G5	-5,333	p<0,001
G3 vs G6	-6,333	p<0,001
G3 vs G7	-7,333	p<0,001
G3 vs G8	-8,833	p<0,001
G4 vs G5	-2,667	p>0,05
G4 vs G6	-3,667	p<0,05
G4 vs G7	-4,667	p<0,01
G4 vs G8	-6,167	p<0,001
G5 vs G6	-1,000	p>0,05
G5 vs G7	-2,000	p>0,05
G5 vs G8	-3,500	p>0,05
G6 vs G7	-1,000	p>0,05
G6 vs G8	-2,500	p>0,05
G7 vs G8	-1,500	p>0,05

4.3.2. Yeni Kemik Oluşumu (YKO)

Deneklerin kemik oluşumu değişiklikleri için histolojik kesitlerde HE boyamaları incelenmiştir. Yeni Kemik Oluşumu için kör yöntemle +1 ile +5 arası skora yapılarak oluşan yeni kemik dokusu belirlenmiştir (Resim 4.2). YKO'yu istatistiksel olarak tablo ve grafikler ile birlikte değerlendirdiğimizde, YKO değeri en fazla G8'de (p<0,001) bulunmuştur. G1 ile G2 ve G3 arasında (p<0,05), G1 ile G4

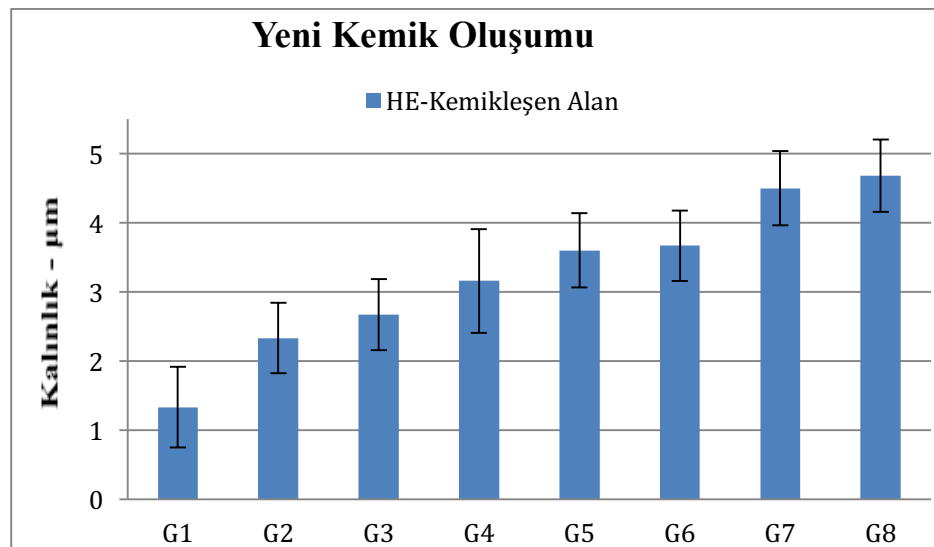
arasında ($p<0,01$) anlamlı; G1 ile G5, G6, G7 ve G8 arasında ise oldukça anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,001$).

G2 ile G3, G2 ile G4 arasında anlamlı bir fark görülmezken ($p>0,05$), G2 ile G5, G6, G7 ve G8 arasında oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark bulunmuştur. Aynı şekilde, G3 ile G7 ve G8 arasında oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark görülmüştür.

G4 ile G7 ve G8 arasında anlamlı ($p<0,01$) bir fark olduğu bulunmuştur. G7 ile G8; G5 ile G6 ve G7; G6 ile G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise, istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı ($p>0,05$) görülmüştür (Tablo 4.4, Tablo 4.5 ile Şekil 4.2).

Tablo 4.4. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni kemik oluşumu (YKO) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama	Standart sapma
G1	1.349	0.524
G2	2.380	0.407
G3	2.761	0.573
G4	3.204	0.824
G5	3.622	0.610
G6	3.710	0.533
G7	4.552	0.461
G8	4.688	0.470

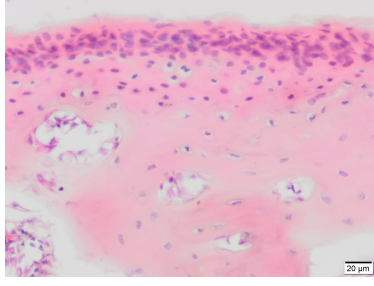


Şekil 4.2. Yeni kemik oluşumunun (YKO) grafik ile gösterilmesi

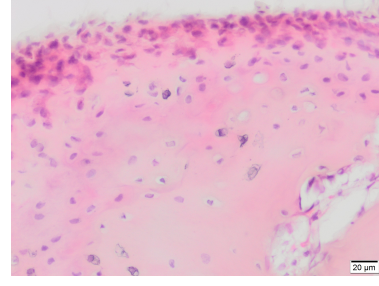
Tablo 4.5. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni kemik oluşumu (YKO) ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Ortalama Karşılaştırma	p değeri
G1 vs G2	-1.000	p<0.05
G1 vs G3	-1.333	p<0.05
G1 vs G4	-1.833	p<0.01
G1 vs G5	-2.167	p<0.001
G1 vs G6	-2.333	p<0.001
G1 vs G7	-3.167	p<0.001
G1 vs G8	-3.333	p<0.001
G2 vs G3	-0.3333	p>0.05
G2 vs G4	-0.8333	p>0.05
G2 vs G5	-1.167	p<0.05
G2 vs G6	-1.333	p<0.01
G2 vs G7	-2.167	p<0.001
G2 vs G8	-2.333	p<0.001
G3 vs G4	-0.5000	p>0.05
G3 vs G5	-0.8333	p>0.05
G3 vs G6	-1.000	p>0.05
G3 vs G7	-1.833	p<0.001
G3 vs G8	-2.000	p<0.001
G4 vs G5	-0.3333	p>0.05
G4 vs G6	-0.5000	p>0.05
G4 vs G7	-1.333	p<0.01
G4 vs G8	-1.500	p<0.01
G5 vs G6	-0.1667	p>0.05
G5 vs G7	-1.000	p>0.05
G5 vs G8	-1.167	p<0.05
G6 vs G7	-0.8333	p>0.05
G6 vs G8	-1.000	p>0.05
G7 vs G8	-0.1667	p>0.05

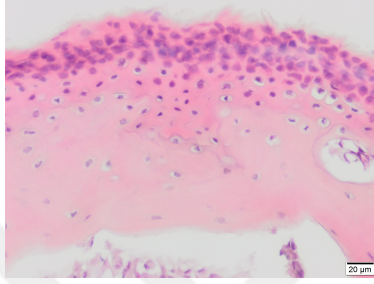
YKO ve YDO İÇİN H-E HİSTOKİMYASI İLE SKORLAMA



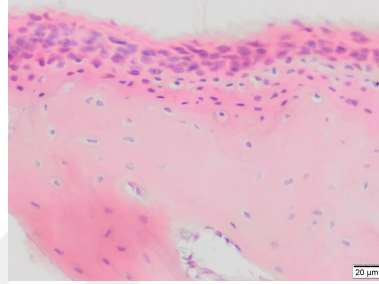
G1



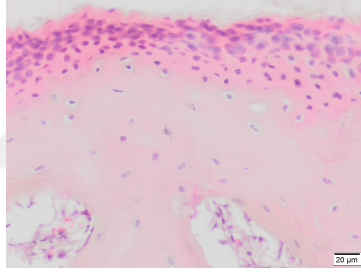
G2



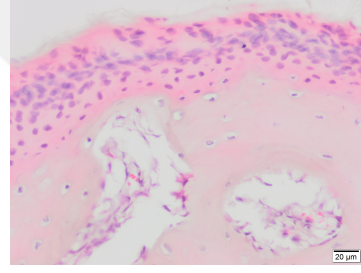
G3



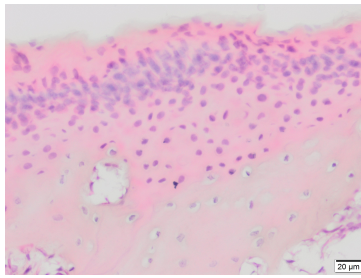
G4



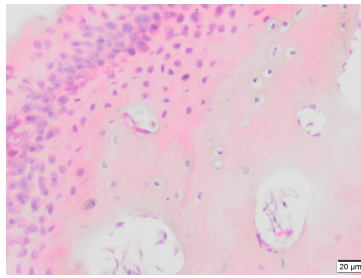
G5



G6



G7



G8

Resim 4.2. H-skor ile boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun belirlendiği incelemede yeni kemik oluşumu ve yeni damar oluşumuna ayrıntılı bakış

4.3.3. Yeni Damar Oluşumu (YDO)

Deneklerin damar oluşumu değişiklikleri için histolojik kesitlerde H-E boyamaları incelenmiştir (Resim 4.2).

YDO'yu istatistiksel olarak tablo ve grafikler ile birlikte değerlendirdiğimizde YDO değeri en fazla G8'de, en az ise G1'de bulunmuştur. G1 ile G2 arasında anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,01$). G1 ile G3, G4, G5, G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$).

G2 ile G3 arasında fark bulunmazken ($p>0,05$), G2 ile G4, G5, G6, G7 ve G8 arasında oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark görülmüştür. G3 ile G4 arasında anlamlı ($p<0,05$), G3 ile G5, G6, G7 ve G8 arasında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark olduğu bulunmuştur.

G4 ile G5 arasında anlamlı ($p<0,05$), G4 ile G6, G7 ve G8 arasında ise, oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark bulunmuştur. G5 ile G6 arasında anlamlı ($p<0,05$), G5 ile G7 ve G8 arasında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark görülmüştür.

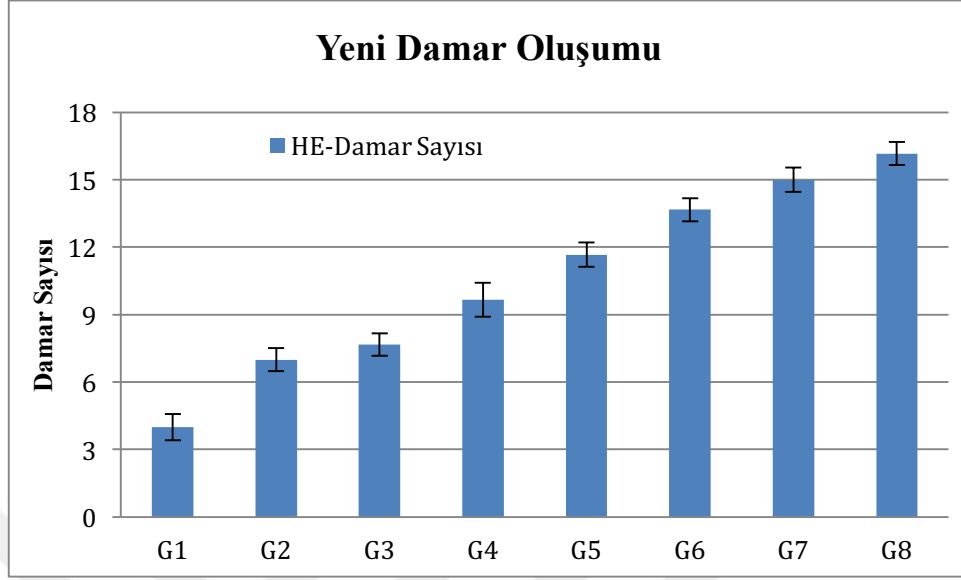
G6 ile G7, G7 ile G8 karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark ($p>0,05$) bulunmamıştır (Tablo 4.6, Tablo 4.7 ile Şekil 4.3).

Tablo 4.6. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni damar oluşumu (YDO) ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama	Standart sapma
G1	4.000	1.000
G2	7.000	0.8944
G3	7.667	0.8165
G4	9.667	1.211
G5	11.667	0.8165
G6	13.667	0.8165
G7	15.000	0.8944
G8	16.167	1.169

Tablo 4.7. Hemotoksilen–Eozin (H-E) boyamalarında yeni damar oluşumu (YDO) ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Ortalama Karşılaştırma	p değeri
G1 vs G2	-3.000	p<0.01
G1 vs G3	-3.667	p<0.001
G1 vs G4	-5.667	p<0.001
G1 vs G5	-7.667	p<0.001
G1 vs G6	-9.667	p<0.001
G1 vs G7	-11.000	p<0.001
G1 vs G8	-12.167	p<0.001
G2 vs G3	-0.6667	p>0.05
G2 vs G4	-2.667	p<0.001
G2 vs G5	-4.667	p<0.001
G2 vs G6	-6.667	p<0.001
G2 vs G7	-8.000	p<0.001
G2 vs G8	-9.167	p<0.001
G3 vs G4	-2.000	p<0.05
G3 vs G5	-4.000	p<0.001
G3 vs G6	-6.000	p<0.001
G3 vs G7	-7.333	p<0.001
G3 vs G8	-8.500	p<0.001
G4 vs G5	-2.000	p<0.05
G4 vs G6	-4.000	p<0.001
G4 vs G7	-5.333	p<0.001
G4 vs G8	-6.500	p<0.001
G5 vs G6	-2.000	p<0.05
G5 vs G7	-3.333	p<0.001
G5 vs G8	-4.500	p<0.001
G6 vs G7	-1.333	p>0.05
G6 vs G8	-2.500	p<0.01
G7 vs G8	-1.167	p>0.05

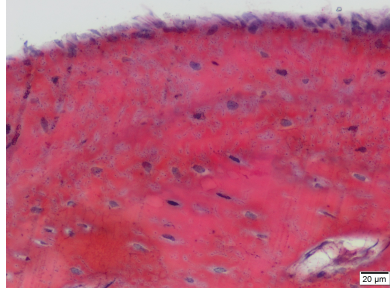


Şekil 4.3. Yeni damar oluşumunun (YDO) grafik ile gösterilmesi

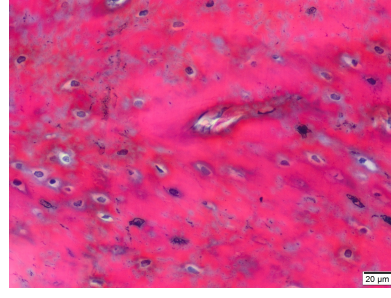
4.4. Deney Gruplarında Masson Trikrom Boyaması ile Yapılan Değerlendirmeler

Yapılan boyamalarda, YKO açısından özellikle G7 ve G8’de boyamanın fazla olduğu, diğer gruplarda ise boyamanın daha az olduğu görülmüştür. G6’da alınan sonuçların, G7 ve G8 sonuçlarına yakın olmasının kök hücre uygulamasına bağlı olduğu düşünülmüştür. Yeni oluşan kemiğin beslenmesine bağlı olarak meydana gelen YDO’nun da, yine G8’de fazla olduğu görülmüştür (Resim 4.3).

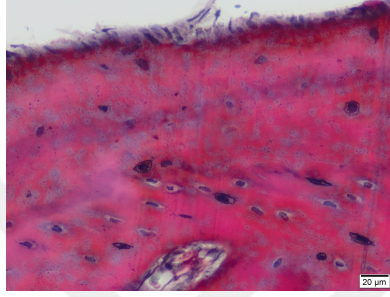
YKO ve YDO İÇİN MASSON TRİKROM HİSTOKİMYASI İLE SKORLAMA



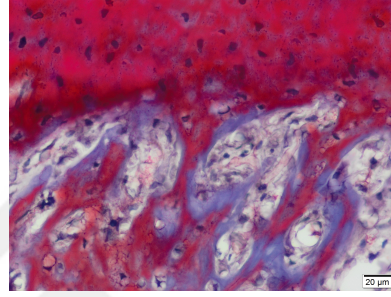
G1



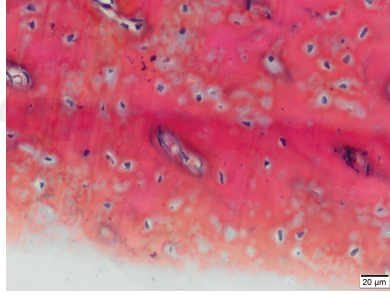
G2



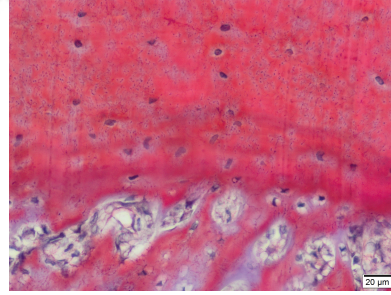
G3



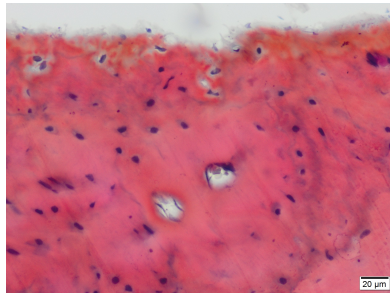
G4



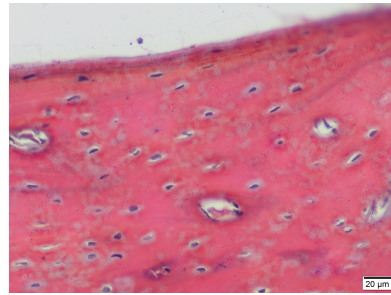
G5



G6



G7



G8

Resim 4.3. Deney gruplarının Masson Trikrom (MTK) ile histokimyasal boyama görüntüleri

4.5. Deney Gruplarında İmmunohistokimya Boyaması ile Yapılan Değerlendirmeler

Deneklere ait protein düzeyindeki değişikliklerin değerlendirilmesi için, histolojik kesitler immunohistokimyasal boyamalar ile incelenmiştir.

4.5.1. STRO-1

STRO-1 ile yapılan boyamalarda, boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğu H-skor ile belirlenmiştir. İncelemede kondildeki MKH tutulumu gösterilmiştir (Resim 4.4).

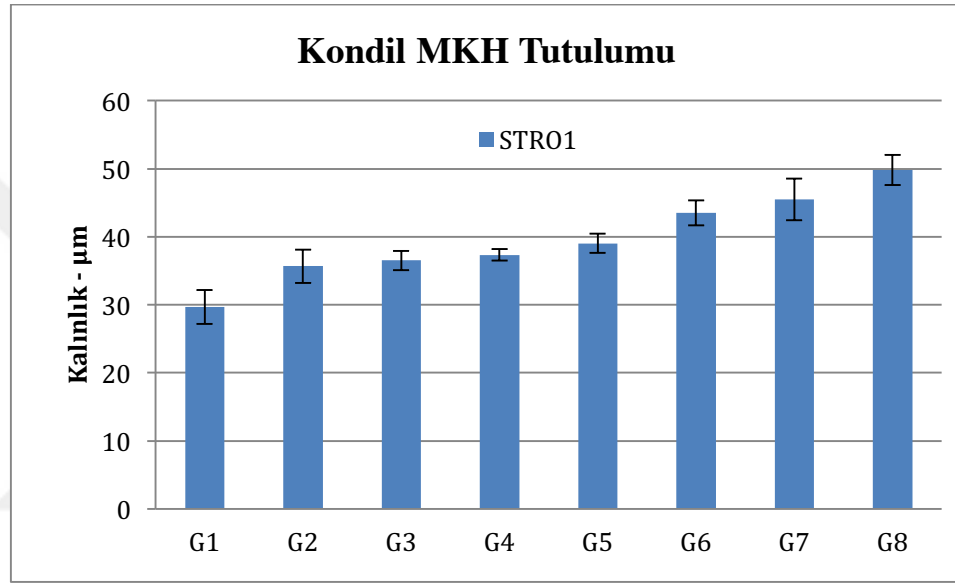
G1 ile G3, G4, G5, G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,001$).

G2 ile G3, G4 ve G5 karşılaştırıldığında anlamlı bir fark görülmezken ($p<0,05$), G2 ile G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise, oldukça anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$). G3 ile G5, G4 ile G5 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p<0,05$).

Tablo 4.8. STRO-1 ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama	Standart sapma
G1	29,667	2,517
G2	35,652	2,422
G3	36,500	1,378
G4	37,333	0,815
G5	39,000	1,414
G6	43,500	1,871
G7	45,512	3,082
G8	49,833	2,229

G3 ile G6, G7 ve G8 ; G4 ile G7 ve G8; G5 ile G7 ve G8 karşılaştırıldığında oldukça anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0,001$). G6 ile G7 arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$); G5 ile G6, G7 ile G8 arasında anlamlı ($p<0,05$), G6 ile G8 arasında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark olduğu görülmüştür (Tablo 4.8, Tablo 4.9 ile Şekil 4.4).

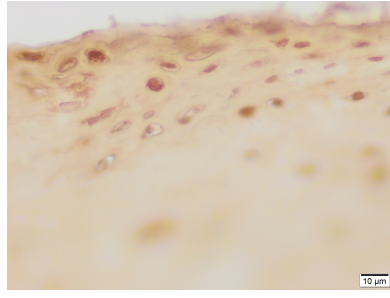


Şekil 4.4. STRO-1 ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi

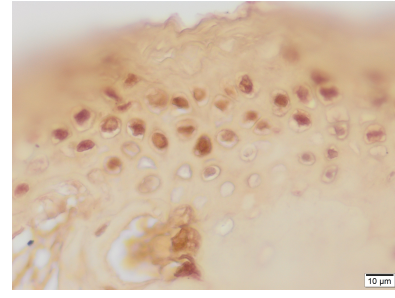
Tablo 4.9. STRO-1 ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama Karşılaştırma	p değeri
G1 vs G2	-6,000	p<0,01
G1 vs G3	-6,833	p<0,001
G1 vs G4	-7,667	p<0,001
G1 vs G5	-9,333	p<0,001
G1 vs G6	-13,833	p<0,001
G1 vs G7	-15,833	p<0,001
G1 vs G8	-20,167	p<0,001
G2 vs G3	-0,8333	p>0,05
G2 vs G4	-1,667	p>0,05
G2 vs G5	-3,333	p>0,05
G2 vs G6	-7,833	p<0,001
G2 vs G7	-9,833	p<0,001
G2 vs G8	-14,167	p<0,001
G3 vs G4	-0,8333	p>0,05
G3 vs G5	-2,500	p>0,05
G3 vs G6	-7,000	p<0,001
G3 vs G7	-9,000	p<0,001
G3 vs G8	-13,333	p<0,001
G4 vs G5	-1,667	p>0,05
G4 vs G6	-6,167	p<0,001
G4 vs G7	-8,167	p<0,001
G4 vs G8	-12,500	p<0,001
G5 vs G6	-4,500	p<0,05
G5 vs G7	-6,500	p<0,001
G5 vs G8	-10,833	p<0,001
G6 vs G7	-2,000	p>0,05
G6 vs G8	-6,333	p<0,001
G7 vs G8	-4,333	p<0,05

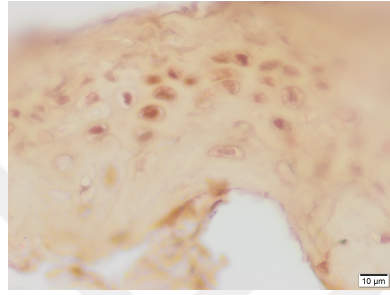
MKH İÇİN STRO-1 İMMÜNOHİSTOKİMYASI



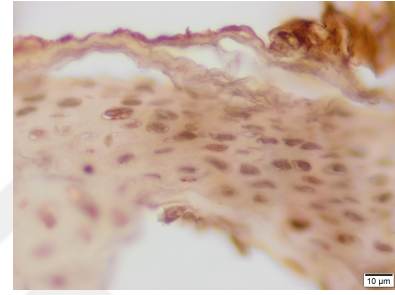
G1



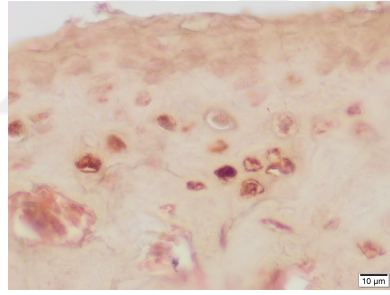
G2



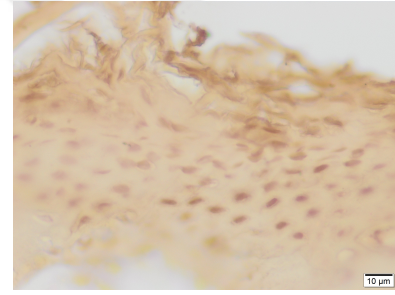
G3



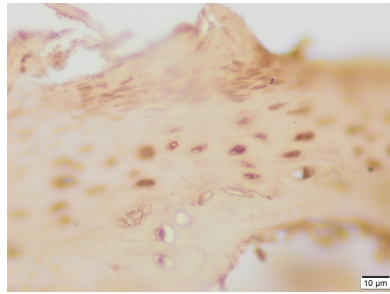
G4



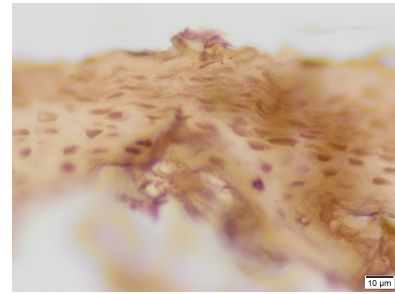
G5



G6



G7



G8

Resim 4.4. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların STRO-1 ile yapılan boyamalarında kondildeki MKH tutulumuna ayrıntılı bakış

4.5.2. Osteonektin

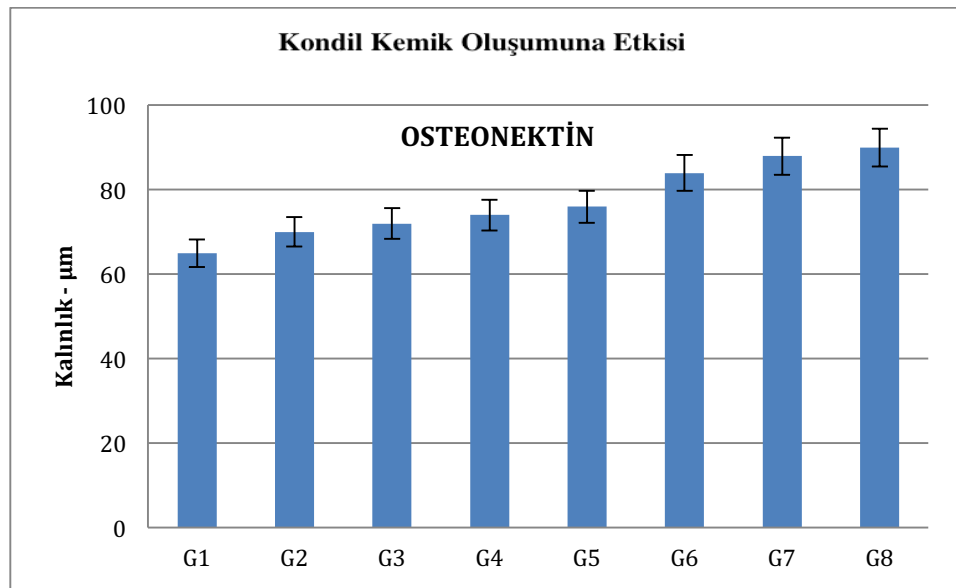
Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, Osteonektin ile yapılan boyamalarda osteoblast durumu gösterilmiştir (Resim 4.5).

G1 ile G2 arasında ($p<0,05$) ve G1 ile G3 arasında anlamlı ($p<0,01$) bir fark görülürken, G1 ile G4, G5, G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,001$).

G2 ile G3, G2 ile G4 arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$), G2 ile G5 arasında anlamlı ($p<0,01$), G2 ile G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.10. Osteonektin ölçümlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Ortalama	Standart sapma
G1	65,000	3,001
G2	70,833	3,189
G3	72,500	1,643
G4	74,510	1,049
G5	76,333	1,862
G6	84,000	2,828
G7	86,784	2,582
G8	90,830	1,536



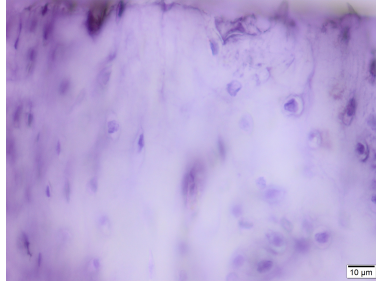
Şekil 4.5. Osteonektin ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi

G3 ile G5, G4 ile G5, G7 ile G8 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). Bununla birlikte, G3 ile G6, G7 ve G8; G4 ile G6, G7 ve G8; G5 ile G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark bulunmuştur. Son olarak, G6 ile G7 arasında anlamlı ($p<0,05$), G6 ile G8 arasında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark görülmüştür (Tablo 4.10 ve 4.11 ile Şekil 4.5).

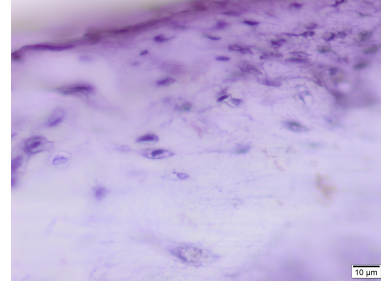
Tablo 4.11. Osteonektin ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama Karşılaştırma	p değeri
G1 vs G2	-5,833	$p<0,05$
G1 vs G3	-7,500	$p<0,01$
G1 vs G4	-9,500	$p<0,001$
G1 vs G5	-11,333	$p<0,001$
G1 vs G6	-19,000	$p<0,001$
G1 vs G7	-23,667	$p<0,001$
G1 vs G8	-25,833	$p<0,001$
G2 vs G3	-1,667	$p>0,05$
G2 vs G4	-3,667	$p>0,05$
G2 vs G5	-5,500	$p<0,01$
G2 vs G6	-13,167	$p<0,001$
G2 vs G7	-17,833	$p<0,001$
G2 vs G8	-20,000	$p<0,001$
G3 vs G4	-2,000	$p>0,05$
G3 vs G5	-3,833	$p>0,05$
G3 vs G6	-11,500	$p<0,001$
G3 vs G7	-16,167	$p<0,001$
G3 vs G8	-18,333	$p<0,001$
G4 vs G5	-1,833	$p>0,05$
G4 vs G6	-9,500	$p<0,001$
G4 vs G7	-14,167	$p<0,001$
G4 vs G8	-16,333	$p<0,001$
G5 vs G6	-7,667	$p<0,001$
G5 vs G7	-12,333	$p<0,001$
G5 vs G8	-14,500	$p<0,001$
G6 vs G7	-4,667	$p<0,05$
G6 vs G8	-6,833	$p<0,001$
G7 vs G8	-2,167	$p>0,5$

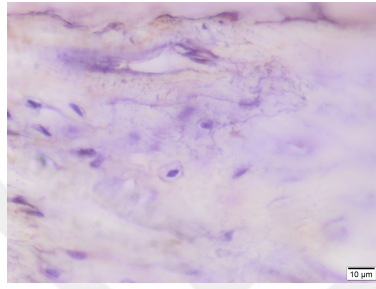
OSTEOBLAST İÇİN OSTONEKTİN İMMÜNOHİSTOKİMYASI



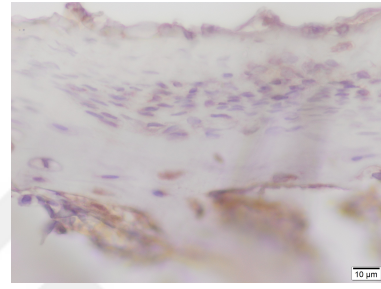
G1



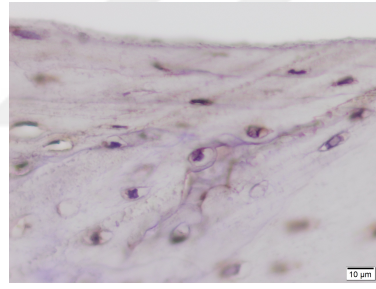
G2



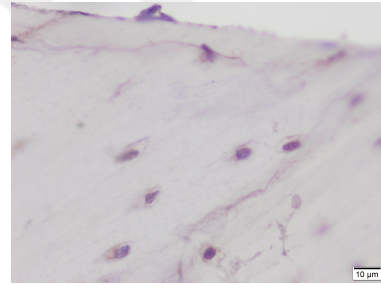
G3



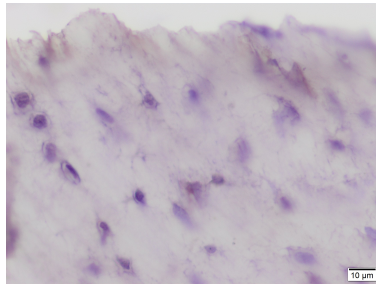
G4



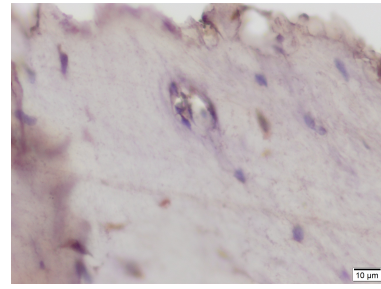
G5



G6



G7



G8

Resim 4.5. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların Osteonektin ile yapılan boyamalarında osteoblast durumuna ayrıntılı bakış

4.5.3. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF)

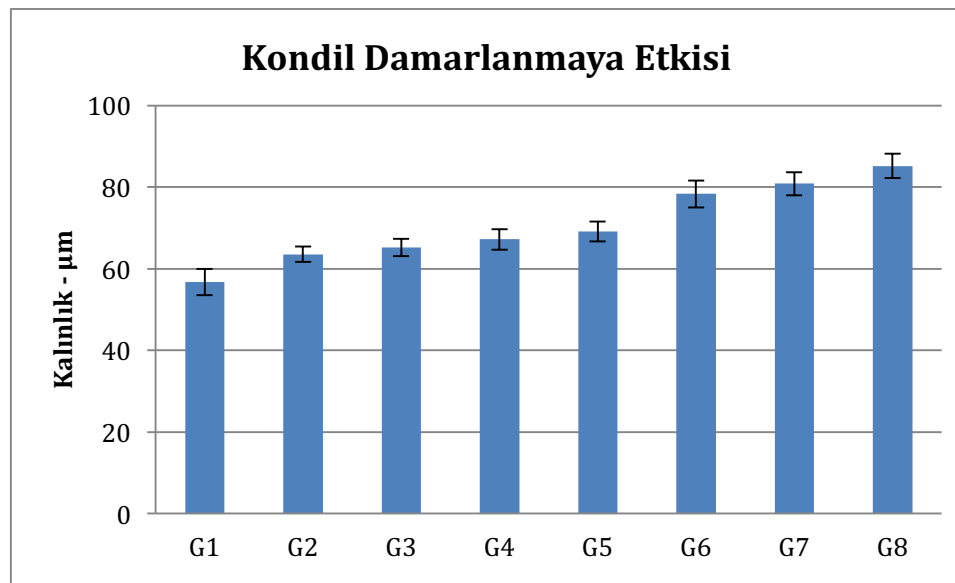
Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, VEGF ile yapılan boyamalarda Damarlanma durumu gösterilmiştir (Resim 4.6).

G1 ile G2 arasında ($p<0,05$) ve G1 ile G3 arasında anlamlı ($p<0,01$) bir fark görülürken, G1 ile G4, G5, G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı bir fark görülmüştür ($p<0,001$).

G2 ile G3, G2 ile G4 arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$), G2 ile G5 arasında anlamlı ($p<0,05$), G2 ile G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark olduğu bulunmuştur.

Tablo 4.12. VEGF ölçümlerinin istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama	Standart sapma
G1	56,898	3,215
G2	63,525	1,871
G3	65,167	2,137
G4	67,169	2,568
G5	69,171	2,401
G6	78,337	3,266
G7	80,536	2,858
G8	85,272	2,600



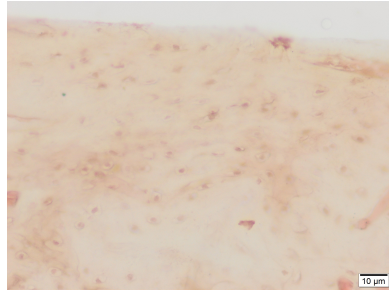
Şekil 4.6. VEGF ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi

G3 ile G5, G4 ile G5, G6 ile G7, G7 ve G8 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmemiştir ($p>0,05$). Ayrıca, G3'ün, G4'ün ve G5'in G6, G7 ve G8 karşılaştırmasında oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark bulunmuştur. G6 ile G8 karşılaştırıldığında ise anlamlı bir fark ($p<0,01$) olduğu görülmüştür (Tablo 4.12, Tablo 4.13 ile Şekil 4.6).

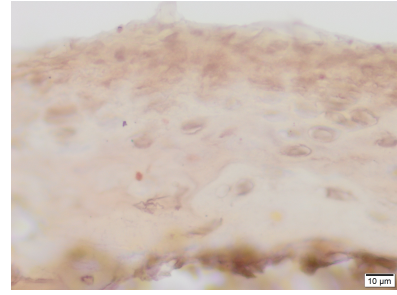
Tablo 4.13. VEGF ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama Karşılaştırma	p değeri
G1 vs G2	-6,833	$p<0,05$
G1 vs G3	-8,500	$p<0,01$
G1 vs G4	-10,500	$p<0,001$
G1 vs G5	-12,500	$p<0,001$
G1 vs G6	-21,667	$p<0,001$
G1 vs G7	-24,167	$p<0,001$
G1 vs G8	-28,500	$p<0,001$
G2 vs G3	-1,667	$p>0,05$
G2 vs G4	-3,667	$p>0,05$
G2 vs G5	-5,667	$p<0,05$
G2 vs G6	-14,833	$p<0,001$
G2 vs G7	-17,333	$p<0,001$
G2 vs G8	-21,667	$p<0,001$
G3 vs G4	-2,000	$p>0,05$
G3 vs G5	-4,000	$p>0,05$
G3 vs G6	-13,167	$p<0,001$
G3 vs G7	-15,667	$p<0,001$
G3 vs G8	-20,000	$p<0,001$
G4 vs G5	-2,000	$p>0,05$
G4 vs G6	-11,167	$p<0,001$
G4 vs G7	-13,667	$p<0,001$
G4 vs G8	-18,000	$p<0,001$
G5 vs G6	-9,167	$p<0,001$
G5 vs G7	-11,667	$p<0,001$
G5 vs G8	-16,000	$p<0,001$
G6 vs G7	-2,500	$p>0,05$
G6 vs G8	-6,833	$p<0,01$
G7 vs G8	-4,333	$p>0,05$

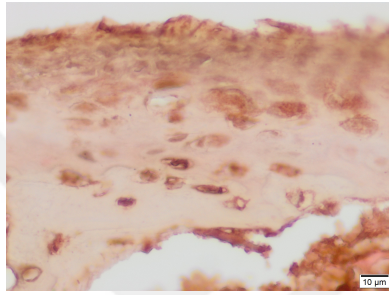
DAMARLANMA İÇİN VEGF İMMÜNOHİSTOKİMYASI



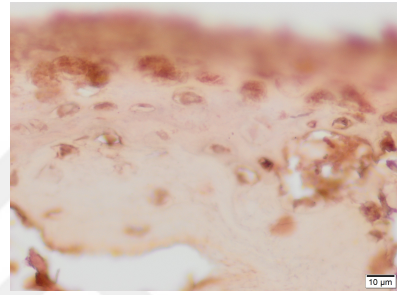
G1



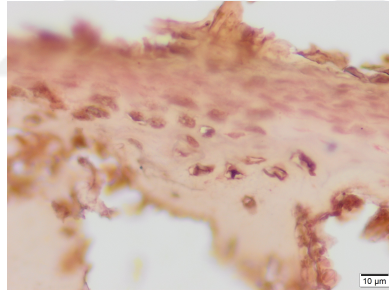
G2



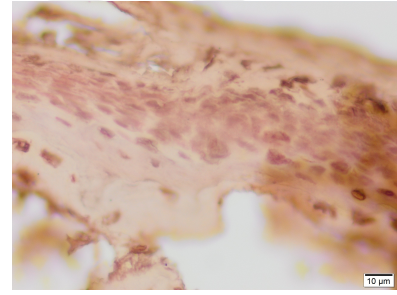
G3



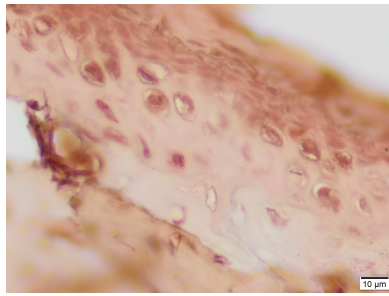
G4



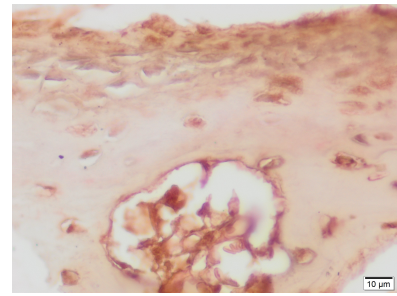
G5



G6



G7



G8

Resim 4.6. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların VEGF ile yapılan boyamalarında damarlanma durumuna ayrıntılı bakış

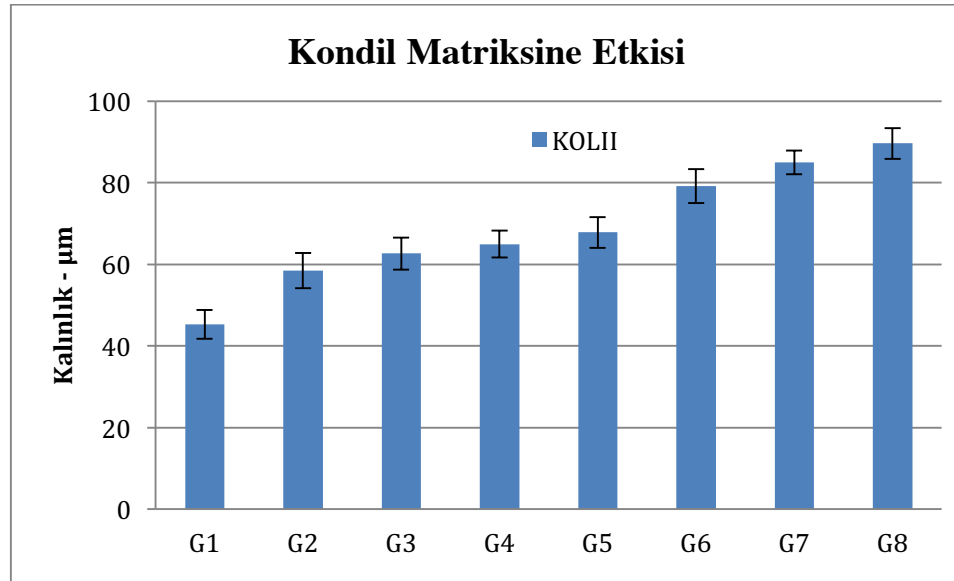
4.5.4. Tip II kollajen

Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, Tip II kollajen ile yapılan boyamalarda matriks durumu gösterilmiştir (Resim 4.7). Matriks belirteci Tip II kollajen ile yapılan immunohistokimyasal boyamalara ait H-skor analizinde, G1 ile karşılaştırıldığında diğer tüm grupların anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır ($p<0,001$).

G2 ile G3, G2 ile G4 arasında anlamlı bir fark bulunmazken ($p>0,05$), G2 ile G5 arasında anlamlı ($p<0,01$), G2 ile G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark olduğu görülmüştür.

Tablo 4.14. Tip II Kollajen ölçümlerinin istatistiksel değerlendirilmesi

Gruplar	Ortalama	Standart sapma
G1	45,323	3,512
G2	58,524	4,324
G3	62,670	3,882
G4	65,000	3,225
G5	67,833	3,817
G6	79,169	4,167
G7	85,000	2,898
G8	90,833	2,117



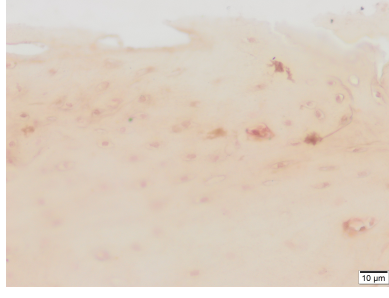
Şekil 4.7. Tip II Kollajen ölçümlerinin grafik ile gösterilmesi

G3 ile G5, G4 ile G5, G6 ile G7, G7 ve G8 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır ($p>0,05$). G6 ile G8; G3 ile G6, G7 ve G8; G4 ile G6, G7 ve G8; G5 ile G6, G7 ve G8 karşılaştırıldığında ise oldukça anlamlı ($p<0,001$) bir fark bulunmuştur (Tablo 4.14, Tablo 4.15 ile Şekil 4.7).

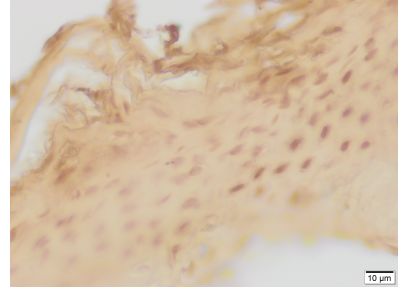
Tablo 4.15. Tip II Kollajen ölçümlerinin Tukey Kramer çoklu karşılaştırma testi ile istatistiksel değerlendirmesi

Gruplar	Ortalama Karşılaştırma	p değeri
G1 vs G2	-13,167	$p<0,001$
G1 vs G3	-17,333	$p<0,001$
G1 vs G4	-19,667	$p<0,001$
G1 vs G5	-22,500	$p<0,001$
G1 vs G6	-33,833	$p<0,001$
G1 vs G7	-39,667	$p<0,001$
G1 vs G8	-44,333	$p<0,001$
G2 vs G3	-4,167	$p>0,05$
G2 vs G4	-6,500	$p>0,05$
G2 vs G5	-9,333	$p<0,01$
G2 vs G6	-20,667	$p<0,001$
G2 vs G7	-26,500	$p<0,001$
G2 vs G8	-31,167	$p<0,001$
G3 vs G4	-2,333	$p>0,05$
G3 vs G5	-5,167	$p>0,05$
G3 vs G6	-16,500	$p<0,001$
G3 vs G7	-22,333	$p<0,001$
G3 vs G8	-27,000	$p<0,001$
G4 vs G5	-2,833	$p>0,05$
G4 vs G6	-14,167	$p<0,001$
G4 vs G7	-20,000	$p<0,001$
G4 vs G8	-24,667	$p<0,001$
G5 vs G6	-11,333	$p<0,001$
G5 vs G7	-17,167	$p<0,001$
G5 vs G8	-21,833	$p<0,001$
G6 vs G7	-5,833	$p>0,05$
G6 vs G8	-10,500	$p<0,001$
G7 vs G8	-4,667	$p>0,05$

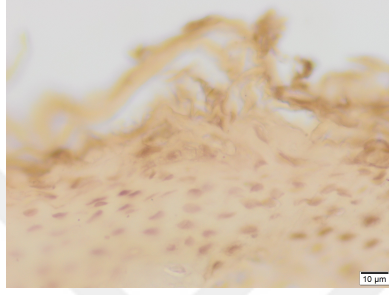
MATRİKS ETKİSİ İÇİN TİP II KOLLAJEN İMMÜNOHİSTOKİMYASI



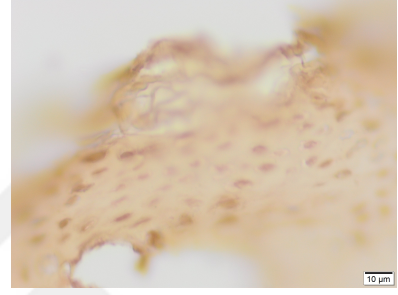
G1



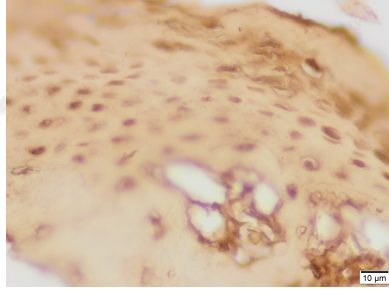
G2



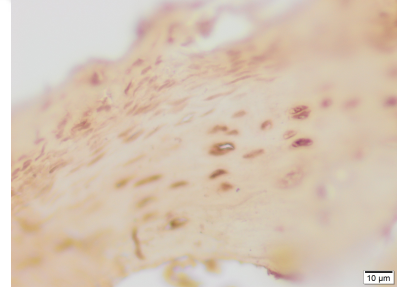
G3



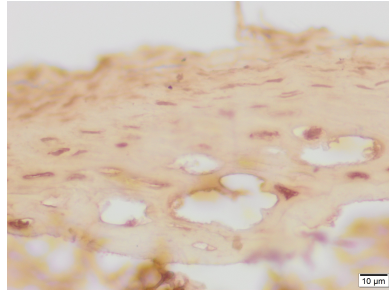
G4



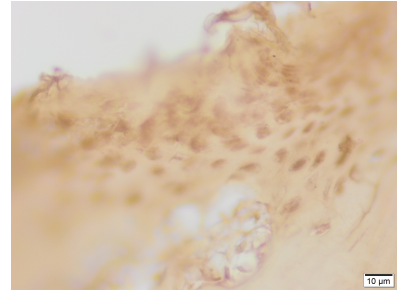
G5



G6



G7



G8

Resim 4.7. Boyanan hücre yüzdesi ve yoğunluğunun H-skor ile belirlendiği incelemede, grupların Tip II Kollajen ile yapılan boyamalarında matris durumuna ayrıntılı bakış

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

5.1. Gereç ve Yöntemin Tartışması

Çalışmamızda, AİA ile birlikte üzüm çekirdeği ekstresi, düşük doz lazer ve kök hücre uygulaması yapılan sıçanlar incelenmiştir.

Literatüre bakıldığında, alt çene kondiler bölgesi, maymun, tavşan, keçi ve domuz gibi çeşitli hayvanlar ile yapılan pek çok farklı çalışma ile değerlendirilmiştir (209). Histolojik ve morfolojik olarak, insan kondili ile sıçan kondili büyük oranda benzerlik göstermektedir (210). Chu ve ark. sıçanların TME'lerinin, morfolojik farklılıklar dışında insanlara benzer olduğunu belirtmişlerdir (211). Literatürde alt çene ilerletmesi ile sıçanların kondil bölgesinde meydana gelen değişiklikleri gösteren pek çok çalışma mevcuttur (142, 212, 213). Bu literatürlere dayanarak, deneysel çalışmamızda deney hayvanı olarak sıçanlar seçilmiştir.

Freuden, Wistar sıçanlarının pubertal döneme doğum sonrası 36 ile 66. günler arasında, ortalama ise 46,9 günlük iken girdiklerini bildirmiştir (214). Yine sıçanların, 40 ile 60. günler arasında yaklaşık 6. haftada puberteye girdiği bildirilmiştir (215). Büyüme döneminde, hücrel aktivite daha fazla olduğu için, bu dönemde uygulanan fonksiyonel tedavinin başarısı daha yüksektir (68). Literatürdeki bu çalışmaları göz önüne alarak, çalışmamızda pubertal döneme denk gelen 6 haftalık sıçanların kullanılması tercih edilmiştir.

Çalışmamızın deney süresinin belirlenmesinde, birçok literatür incelenmiştir. Oyonarte ve ark.'nın çalışma sonuçlarına göre, sıçanlarda mandibular büyümenin arttırılması 20 gün sürmüştür (10). Bununla birlikte; El-Bialy ve ark. tavşanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada, mandibular büyümenin 4 haftada arttırıldığını bildirmişlerdir (216). Khan ve ark. ise sıçanlar üzerinde yapmış oldukları çalışmada, yeni kemik yapımının 21 günde meydana geldiğini bulmuşlardır (217). Alt çene ilerletmesi yapılan çalışmalar incelendiğinde; Xiong ve ark. tarafından yapılan araştırmada, yeni kemik oluşumunun maksimum seviyeye deneyin 30. gününde

ulaştığı bildirilmiştir (218). Tek aşamalı alt çene ilerletmesinde, AİA uygulamasının 30. gününde kemik oluşumunun en üst seviyeye geldiği gösterilmiştir. Bu literatürler göz önüne alınarak, çalışmamızda alt çene ilerletme süresi 4 hafta olarak belirlenmiştir (144, 219).

Mandibuler retrognatizme sahip büyüme dönemindeki Sınıf II hastalara ait tedavi seçeneklerinden birisi, fonksiyonel apareylerin kullanılarak alt çenenin ilerletilmesidir. Apareyler sayesinde kas aktivitesinin değiştirilmesiyle, mandibular kondili etkileyen kuvvetler de değişmektedir. Bir sekonder kırıkta olan kondil kırıkdağı, mekanik uyarılara hücrel yanıt vererek aktive olabilme özelliğine sahiptir. Fonksiyonel ortodontik tedavi ile amaçlanan, mekanik uyarılar ile kondildeki hücrel aktiviteyi dolayısı ile endokondral kemikleşmeyi arttırmak ve bunun sayesinde de kondil de meydana gelen adaptif kemiksel değişiklik ile maloklüzyonu tedavi etmek ve stabil olarak korumaktır (53, 206). TME'nin fonksiyonel ve ortopedik apareylere cevabı ile ilgili çok sayıda klinik ve hayvan çalışması yapılmıştır (68, 78-80). Fonksiyonel apareylerin başarısı, TME'nin cevabına ve alt çenenin yeni pozisyonundaki adaptasyonuna bağlıdır. Bu adaptasyon, alt çene ilerletmesi sonrasında meydana gelen remodeling ile uyumludur (72). Çalışmamız için, deney hayvanlarında uygulanacak apareyin seçiminde pek çok literatür değerlendirilmiştir. Xiong ve ark. çalışmalarında, sıçanların hem alt hem de üst keser dişlerine kapanışı açmayı ve alt çeneyi öne almayı sağlayan akrilik apareyler uygulamışlardır (220). Owtad ve ark. ise sıçanlar üzerinde yaptıkları çalışmalarında, alt keser dişler üzerine, essix plaktan hazırladıkları apareyi yerleştirmişlerdir (212). Bazı çalışmalarda, AİA deneklerin üst keser dişleri üzerine yerleştirilmiştir (221). Fakat, literatürde AİA'nın üst keser dişlere yapıştırılması sonucu apareye gelen çiğneme kuvvetlerinin etkisi ile AİA'da atrizyon meydana geldiğini gösteren çalışmalar mevcuttur (212). Bu nedenle, çalışmamızda bu atrizyonu önlemek ve sıçanların üst keser dişlerinde meydana gelen sürekli uzamaya bağlı problemlerin önüne geçmek için, Owtad ve ark. gibi AİA'yı alt keser dişler üzerine yerleştirmeyi tercih ettik.

Fonksiyonel apareylerle yapılan tedavilerde tedavi süresi, kullanılan apareye göre farklılık gösterse de, yapılan çalışmalara göre bu süre ortalama 6 ile 24 ay arasındadır (9). Ortodontik tedavi gören hastaların çoğunun tedaviyle ilgili ana

şikâyeti, tedavi süresinin uzun olmasıdır. Genel tedavi süresinin uzaması ise, hasta kooperasyonunu azaltmaktadır. Son zamanlarda ortodontik tedavide yeni materyallerin ve tekniklerin kullanılmasıyla, ortodontik tedavi zamanının kısaltılması hedeflenmektedir. Örneğin çeşitli çalışmalarda, kondil bölgesinde remodelingi arttırmak ve tedavi süresini kısaltmak için, AİA'ya ek olarak büyüme faktörleri, ultrason, çeşitli kimyasal materyaller ve lazer uygulanmıştır (10, 11). Bu çalışmalar içerisinde, bizim çalışmamızda da kullanılan DDLT'nin, sağlıklı hayvanların kondil bölgesindeki remodelingi arttırdığı bildirilmiştir (10, 143). Saito ve ark.'nın sıçanlarda yaptıkları hızlı maksiller ekspansiyon tedavisinde, DDLT'nin kemik remodelingini hızlandırdığı böylece tedavi ve retansiyon süresinin kısaltılabildiği gösterilmiştir (139). Khadra ve ark. GaAlAs lazer uygulamasının sıçanların kafatası defektlerinde kemik iyileşmesi ve formasyonunu desteklediğini bildirmişlerdir (12). Saafan ve ark. ise, tavşanlarla yaptıkları çalışmada, kontrol grubuna göre lazer grubunda yeni kondiler kemik kalınlığının istatistiksel olarak artmış olduğunu göstermişler ve DDLT'nin kondiler bölgedeki endokondral kemik yapımını artırarak mandibular ilerletmeyi arttırdığını, sonuç olarak uzamış ortodontik tedavi süresinin kısaltılabileceğini bildirmişlerdir (219).

Ozawa ve ark. sıçan kalvaryasından izole ettikleri osteoblast benzeri hücelere DDLT uygulamışlar ve lazerin osteoblast farklılaşması ile hücrel proliferasyonu stimule ettiğini, böylece kemik formasyonunu arttırdığını göstermişlerdir (222). Dörtbudak ve ark. da, in vitro olarak yaptıkları çalışmada mezenkimal hücrelerden farklılaşan osteoblast hücrelerine uygulanan diyot lazer ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir (223). Pinheiro ve Gerbi, kızıl ötesi dalga boyunda ışınlanmış kemikte osteoblast proliferasyonunun, kollajen depozisyonunun ve yeni kemik formasyonunun arttırıldığını bildirmişlerdir (224). Stein ve ark. ise, in vitro olarak, osteoblast benzeri hücrelerin üzerinde DDLT'nin biyostimulatif etkiye sahip olduğunu ve bu hücrelerin çoğalıp olgunlaşmasını desteklediğini göstermişlerdir (225). Yapılan bu çalışmalardan yola çıkarak, ortodontistler düşük doz lazer terapisinin kemik ve kıkırdak oluşumunu artırmasının, ortodontik tedavide remodellingin daha kolay ve daha kalıcı olmasını sağlayabileceğini düşünmeye başlamıştır (226). Bu literatürler göz önünde bulundurularak, remodeling sürecini hızlandırmak amacıyla, çalışmamızda DDLT uygulanmıştır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, DDLT'nin uygulama dozları arasında büyük farklılıklar olduğu görülmektedir. Sun ve Tuner, DDLT'de güvenilir doz aralığını 6-10 J/cm² olarak bildirmektedirler (227). Seifi ve ark. sıçan kondilleri üzerine 904 nm dalga boyundaki diyot lazer uyguladıkları çalışmalarında, mandibular retrognatizmin düzeltilmesinde düşük doz lazer tedavisinin etkili olabileceğini bulmuşlardır (142). Andrade ve Meireles ise, 670 nm DDLT'nin sıçanlarda epifizyal büyüme üzerine olan etkisini araştırmak için 4 J/cm², 8 J/cm² ve 16 J/cm² olan lazerleri kullanmışlar ve radyolojik ve histolojik açıdan lazer grupları arasında, istatistiksel olarak anlamlı herhangi bir değişiklik bulmamışlardır (115). El-Bialy ve ark. anterior bite plane apareyi kullanılan veya kullanılmayan sıçanların alt çene büyümesine light-emitting diyot (LED) ve/veya DDLT'nin etkilerini değerlendirmiştir, 6 J/cm² yoğunluğundaki lazeri 28 gün boyunca her gün 10 dakika süreyle kullanarak pozitif sonuçlar elde etmişlerdir (228). Diğer bir çalışmada, Oksayan ve ark. deneklerin eklemelerine 8 J/cm² (0,25 watt, 20 sn boyunca) ve 10 J/cm² (0,25 watt, 25 sn boyunca) enerji yoğunluğunda lazer uygulamasında bulunmuşlar ve değişimin en çok 8 J/cm² olan grupta olduğunu bulmuşlardır (144). Bu nedenle, biz de çalışmamızda Oksayan ve ark.'nın çalışmasına benzer şekilde, 8 J/cm² (0,5 watt, 16 sn boyunca) yoğunluğunda lazer uygulamayı tercih ettik.

Biyostimülasyon çalışmalarında, düşük doz lazerlerin doz uygulama sıklığı konusunda pek çok farklı yaklaşım mevcuttur. Düşük doz lazer uygulamalarının biyostimulan etkilerinin, tekrarlayan seanslarla daha fazla artacağı savunulmuştur (229). Bu bilgi göz önüne alınarak, çalışmamızda tekrarlayan uygulamalar yapılması tercih edilmiştir. Seifi ve ark. 54 erkek Wistar Albino sıçan üzerinde yaptıkları düşük doz lazer çalışmasında uygulamalarını gınaşırı yapmayı tercih etmişlerdir (142). Bizde çalışmamızda gınaşırı uygulama sıklığıyla 30 günlük süreci tamamladık.

ÜÇE kullanımının kemik formasyonunu indüklediği, osteoblastların farklılaşmasını hızlandırdığı, kortikal kemik miktarını ve trabeküler kemiğin mineral içeriğini arttırdığı rapor edilmiştir (27). ÜÇE'nin kemik rezorpsiyonunu inhibe etmesinin nedeni, içerdikleri proantosiyanidinlerin kemik rezorpsiyonunu başlatan proteolitik enzimleri inhibe etmesi olarak düşünülmektedir (197). Ishikawa ve ark. 5 haftalık sıçanlara günlük diyetlerine ilave edilmek suretiyle sistemik olarak verdikleri güçlü antioksidan özelliğe sahip olan üzüm çekirdeği ekstresinin etken maddesi olan

proantosyanidinin alt çene kondilindeki kemik formasyonu üzerine etkilerini üç boyutlu Periferik Kantitatif Bilgisayarlı Tomografi (Peripheral Quantitative Computed Tomography- pQCT) kullanarak incelemişlerdir. Mandibular kondilin boyun kısmı taranmış ve kondil başının 0.4 mm altında, 0.1 mm aralıklarla 3 boyutlu cross-sectional kesitler alınmıştır. Herhangi bir fonksiyonel apareyin uygulanmadığı bu çalışmada, kontrol grubu, düşük kalsiyum verilen grup, yüksek kalsiyum verilen grup ve yüksek kalsiyum ile ÜÇE verilen grup karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda, üzüm çekirdeği ekstresinin, alt çene kondilindeki kemik formasyonunu daha fazla indüklediği tespit edilmiştir (24). Biz de çalışmamızda, hiçbir toksik ve yan etkisi bulunmayan, güçlü farmakolojik özellikleri olan, kemik ve kıkırdak yapılarına olumlu yönde etkisi olduğu ifade edilen üzüm çekirdeği ekstresini sistemik olarak uygulamaya karar verdik.

ÜÇE'nin önerilen oral alım dozu, 50-150 mg/gün ya da 1 mg/kg/gün olup, günlük 300 mg da önerilebilmektedir (193). Bu nedenle, çalışmamızda günlük 300 mg/kg dozda ÜÇE uygulamayı tercih ettik.

MKH'ler kemik, kıkırdak, tendon, kas, adipoz doku ve hematopoetik destekli stroma gibi pek çok mezenkimal dokuya; ayrıca, kondrosit, adiposit ve osteosit gibi çeşitli hücre tiplerine farklılaşma yeteneğine sahiptir (230). MKH'lerin farklı hücrelere dönüşebilme yeteneği, rejeneratif terapötik potansiyelin temelini oluşturur. MKH'lerin osteoblastlara farklılaşmasının, yeni kemik yapımına yardımcı olabileceği öne sürülmüş olup çeşitli hayvan çalışmalarıyla desteklenmiştir (231). MKH'ler, osteoblastlara farklılaşarak intramembranöz kemikleşme veya endokondral kemikleşme ile kemik yapımını arttırabilir (232). Friedenstein, Piatetzky-Shapiro ve Petrakova çalışmalarında, MKH'lerin yeni kemik oluşumunu ve kemik iyileşmesini hızlandırdığını göstermişlerdir (172).

MKH'ler osteoindüksiyon aracılığıyla indirekt olarak da kemik formasyonunu arttırabilir. MKH'ler, uyarıcı sitokinler ve büyüme faktörleri salgılayarak büyümeyi uyarırlar (233). Bu faktörler, konak hücrelerle bağlantı yaparak osteoprogenitör hücrelerin hücresel migrasyonunu arttırır, proliferasyonu tetikler, inflamatuvar yanıtı düzenler ve anjiyogenezisi arttırır (234). Granero-Molto ve ark.'na ait kırık iyileşme çalışmasında, farelerin kırık tibialarına yerleştirilmiş olan MKH'lerin iyileşme

potansiyeli araştırılmış ve MKH'ler ile tedavi edilen farelerde olgun kemik ve kemik kallus miktarında artış olduğu görülmüştür. Ayrıca, tibia üzerinde gerçekleştirilen biyomekanik testlerin sonucuna göre, kemik sertliği ve gerilme direnci artmıştır. MKH'lerin lokal veya sistemik olarak uygulanması ile kırık iyileşmesinin hızlandırıldığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak, transplante edilen MKH'lerin kallus hacmini, yeni kemik hacmini, hidroksiapatit içeriğini ve biyomekanik özellikleri arttırdığını bildirmişlerdir (231).

MKH'lerin aktive olması ve diğer hücelere farklılaşabilmesi için stimule edilmeleri gerekmektedir. MKH'ler, remodeling ve doku hasarlanması tarafından başlatılan uyarıcı sinyaller aracılığıyla aktive edilene kadar, non-proliferatif sessiz fazda beklerler. Stimule edildikten sonra, doku tamiri ve homeostatis için istenen hücre tipine farklılaşırlar (235). Bu nedenle çalışmamızda, fonksiyonel apareyler, düşük doz lazer ve üzüm çekirdeği ekstresi uygulamaları ile kök hücrelerin aktive edilmesi amaçlanmıştır. Abramovitch-Gottlib ve ark. 3 boyutlu biyomatiks gömülen MKH'ler üzerinde DDLT'nin etkilerini araştırmıştır (14). Lazer uygulanmış gruplarda, doku formasyonunun arttığını, fosfor seviyelerinin pik yaptığını, yeni oluşan dokuda kalsiyum ve fosfat inkorporasyonunun arttığını görmüşlerdir. Ayrıca, lazer uygulanan örneklerde ALP aktivitesinin, kültür aşamasının erken evrelerinde artış gösterdiği, geç evrelerinde ise azalma gösterdiği rapor edilmiştir. Bu çalışma, hem kristalin biyomatiks yüzey özelliklerinin hem de DDLT uygulamalarının, ex-vivo ossifikasyonu indüklediğini ve MKH'lerin kemik oluşturan hücreler üzerinde biyostimulasyon yaptığını göstermiştir. 2007 yılında Tuby tarafından yapılan çalışmada, DDLT'nin (804 nm, 1 ve 3 J/cm² GaAs diyot lazer) kardiyak kök hücrelerin (KKH) ve Kİ-MKH'lerin proliferasyonu üzerindeki etkileri incelenmiştir (236). Kontrol grubuna göre, lazer uygulanmış gruplarda uygulamanın ardından 2. ve 4. haftalarda MKH'lerin ve KKH'lerin sayısında artış olduğu gösterilmiştir. Bu çalışma, DDLT'nin MKH'lerin ve KKH'lerin in vitro proliferasyonunu arttırdığını açıkça göstermekle birlikte, sonuçlarının getirisi nedeniyle rejeneratif tıp alanında çok önemlidir. Bütün bu çalışmalar, düşük doz lazerlerin biyostimulatif etki gösterdiğini ve uygun koşullar altında kök hücre proliferasyonunu teşvik ettiğini göstermektedir.

Oyonarte ve ark. MKH'lerin intraartiküler enjeksiyonu ve LIPUS kullanımının gelişmekte olan sıçanlar üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Ultrason uygulamasının mandibular kondil büyümesini sagittal olarak arttırabileceğini, kök hücre uygulamasında ise bu değişimin çok az olduğunu; LIPUS ve MKH uygulamasının, büyümekte olan sıçanlarda kondilin transvers yönde büyümesini stimule ettiğini rapor etmişlerdir (183). MKH'lerin osteoblast ve kondroblastlara dönüşümüyle kemik ve kıkırdak yapımı arttırılabilir (22). Bu nedenle, fonksiyonel tedavilerde, MKH'lerin kemik büyümesine olan pozitif etkilerinden faydalanılabileceği düşünülerek çalışma gruplarımıza MKH uygulamaları dahil edilmiştir. MKH'lerin hem sistemik enjeksiyon, hem de lokal olarak uygulanabilmesi yeni kemik yapımında efektif olarak kullanılabilmelerini sağlamaktadır. Bu nedenle çalışmamızda, kök hücrelerin kondile lokal olarak intraartiküler yolla verilmesine ve bunun haftada birer kere intraperitoneal kök hücre enjeksiyonuyla desteklenmesine karar verilmiştir.

Literatürde, kemik iliğinden elde edilmiş mezenkimal kök hücrelerin, doku mühendisliği için umut verici olduğunu gösteren pek çok çalışma mevcuttur. Öte yandan geleneksel kemik iliği biyopsi yöntemleri, ağırlı bir işlem olduğu için genel veya spinal anestezi gerektirmekte olup artmış donör saha morbiditesi riski bulunmaktadır. Hem de bu yöntemle yeterince mezenkimal kök hücre elde edilememektedir. Miktarın bu kadar az olması, ekstra bir ex-vivo ekspansiyon işlemi gerektirmektedir ki, bu işlem zaman alıcı ve pahalıdır. Ayrıca, hücre kontaminasyonu ve hücre kaybı riski mevcuttur. Bu nedenle, hastanın konforunu bozmayan ve kolay tekniklerle hücre elde edilebilecek başka bir kaynak bulma arayışına girilmiştir (237). Günümüzde adipoz doku, MKH'lerin izolasyonu için çok tercih edilen bir kaynaktır, çünkü heterolog hücre terapisinde kullanılacak mezenkimal kök hücrelerin adipoz dokudan toplanması daha kolaydır. Zuk ve ark. ilk olarak yağ dokusundan “Yağ Doku Kaynaklı Kök Hücre” olarak adlandırılan bir kök hücre topluluğu izole etmişler ve bu hücrelerin in vitro osteojenik ve kondrojenik farklılaşma gösterebildiklerinden bahsetmişlerdir (238). İnsan adipoz-kökenli stromal hücrelerinin, doku mühendisliği uygulamaları için önemli bir potansiyele sahip olduğu çeşitli hayvan çalışmalarıyla gösterilmiştir. Yoon ve ark. sıçanlarda oluşturulan kritik boyutlardaki kafatası defektine insan yağ dokusu kaynaklı kök

hücreler uygulamışlar ve YDMKH'in kemik rejenerasyonunu ve kalitesini arttırdığını bildirmişlerdir (239). Hastalarda kemik iliğinden hücre elde edilmesi invaziv bir işlem iken, insan adipoz kök hücreleri, hastanın dermisinin altındaki yağ dokusundan elde edilmekte olup çok daha az invazivdir (240). Bu nedenlerden ötürü, çalışmamızda kök hücre kaynağı olarak adipoz dokunun kullanılması tercih edilmiştir.

5.2. Yeni Osteoblast Yapımının Tartışması (YOY)

Çalışmamızda AİA uygulaması ile osteoblast sayısının arttığı görülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre, AİA uygulaması ile mezenkimal hücrelerin aktive olduğu düşünülmüş ve AİA'nın kondroblastik ve osteoblastik aktiviteyi arttırdığı görülmüştür. Çalışmamızın sonuçlarıyla uyumlu olarak, Tang ve ark. yaptıkları çalışmada, aparey uygulamasının Runx2 sentezinde ve buna bağlı olarak osteoblast sayısında artış meydana getirdiğini rapor etmişlerdir (241).

Ekizer ve ark.'nın sıçanların intermaksiller sutur bölgesine, maksiller ekspansiyonu takiben kemik iliği kökenli mezenkimal kök hücre uyguladıkları çalışmada ise, histomorfometrik sonuçlara göre, tek doz KI-MKH uygulamasının, kontrol grubuna göre osteoblast sayısını, yeni damar oluşumunu ve midpalatal suturdaki yeni kemik oluşumunu arttırdığı bildirilmiştir (21). Bu bulgular ışığında, damarlanmadaki artışla birlikte mezenkimal hücrelerin osteoblastlara dönüşümünün arttığı ve buna bağlı olarak mandibular ilerletme miktarının arttığı düşünülmektedir.

Çalışmamızın bulgularına göre, Aparey+ÜÇE ve Aparey+DDLT kullanımıyla artan osteoblast sayısı istatistiksel olarak apareyin tek başına kullanımına göre anlamlı farklılık göstermemiştir. MKH ise, her ikisinin osteoblastlar üzerinde olan etkisini arttırmıştır. Çalışmamız sonuçlarına göre, MKH'nin osteoblast sayısını, ÜÇE ve DDLT'den daha fazla arttırdığı söylenebilir.

5.3. Yeni Kemik Oluşumunun Tartışması (YKO)

Çalışmamızda, YKO aparey kullanımı ile artmıştır. YKO ile ilgili yaptığımız histolojik incelemelerde istatistiksel olarak AİA, DDLT, MKH ve ÜÇE'nin birlikte kullanımlarında anlamlı farklılıklar görülmüştür. YKO ile AİA uygulamasının birbiriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Kondil kırırdağı, mekanik ve kimyasal

stimuluslara cevap verebildiği için (206), hem AİA uygulamasının, hem de kondil kırıkdağını etkileyen lokal ve sistemik faktörlerin YKO'yu etkilediği düşünülmüştür.

Rabie ve ark. 30 gün boyunca alt çene ilerletmesi yaptıkları çalışmalarında, kontrol grubuna göre YKO'yu en fazla aparey taşıyan grupta bulmuşlardır (8). Rabie ve ark. başka bir çalışmada, mezenkimal hücrelerin, sıçanlarda mandibulanın iki aşamalı öne alınmasıyla meydana gelen kemik formasyonu üzerindeki etkilerini değerlendirmişlerdir. Tedavinin birinci aşamasında kontrol grubuna göre, 7. ve 14. günde kondilin posterior bölgesindeki mezenkimal hücre miktarının en yüksek düzeyde görüldüğünü, en fazla kemik yapımının ise ilerletmenin 30-37. günleri arasında meydana geldiğini bildirmişlerdir. İlerletmenin 2. aşamasında ise kondildeki mezenkimal hücre sayısının, kemik yapımının ve buna bağlı olarak da kondilin büyüme potansiyelinin arttığını göstermişlerdir (22).

Taira ve ark. da, 4 haftalık sıçanlarda AİA uygulamasının, mandibula genişliğini ve ramus yüksekliğini arttırdığını saptamışlar ve bu artışın kondil ve glenoid fossanın posteriorundaki kemik yapımıyla ilgili olabileceğini rapor etmişlerdir (242).

Çalışmamızda ise, yapılan histomorfometrik inceleme sonucu YKO'da en büyük değer Aparey+ÜÇE+DDLT+MKH uygulanan grupta, en küçük değer ise kontrol grubunda bulunmuştur. Bu bulgular ışığında, alt çene ilerletmesi ile kondrogenezisten osteogenezise geçişin hızlanması sonucu meydana gelen kondiler cevap sayesinde YKO'nun artmış olabileceği düşünülebilir.

Kamitani ve ark. sıçanlara sistemik olarak verdikleri ÜÇE'nin, alt çene kondilindeki kemik formasyonu üzerine etkilerini üç boyutlu Periferik Kantitatif Bilgisayarlı Tomografi kullanarak incelemişlerdir. Herhangi bir fonksiyonel apareyin uygulanmadığı bu çalışmada, denekleri ilk 3 hafta düşük kalsiyumlu diyet ile beslemişlerdir. Çalışma sonucunda, ÜÇE'nin alt çene kondilindeki kemik formasyonunu daha fazla indüklediği tespit edilmiştir. Bizim çalışmamızda ise, ÜÇE ile apareyin YKO'ya etkisi arttırılmış; fakat, bu istatistiksel olarak gösterilememiştir. Kamitani ve arkadaşlarının deneylerinde herhangi bir aparey kullanmamış olmaları ve ÜÇE'den önce düşük kalsiyumlu diyet vermiş olmaları bu farklılığın nedeni olarak düşünülmüştür (27).

Çalışmamızda, DDLT kullanımı ile YKO'da artış sağlanmıştır, fakat bu artış istatistiksel olarak anlamlı görülmemiştir. Abtahi ve ark. ise, 8 haftalık tavşanlarda, mandibular ilerletme apareyi ve DDLT'yi birarada kullanarak kondildeki YKO ve kırıkta kalınlıklarını değerlendirmişlerdir. 3 hafta boyunca her gün TME'ye her bir noktaya 3'er dakika olacak şekilde 3 noktadan toplamda 9 dk DDLT (630 nm, 10 mW gücünde) uygulamışlardır. Yaptıkları histolojik değerlendirmelerin sonucunda, YKO'yu lazer grubunda kontrol grubuna göre anlamlı olarak daha fazla bulmuşlardır (143). Seifi ve ark. ise, 42 günlük 54 tane erkek sıçanda gerçekleştirdikleri çalışmalarında kondiler bölgeye 0, 2, 4, 6, 8 ve 10. günlerde DDLT uygulamışlar, 50 gün arayla bu protokolü tekrarladıktan sonra 120. günde sıçanları sakrifiye etmişlerdir. Sonuç olarak, kondiler bölgede, kontrol grubuna göre bilateral ve unilateral ışınlanan deney gruplarında daha yüksek osteoblast ve osteoklast aktivitesi ile artmış YKO ve remodeling görmüşlerdir (142). Gruplarımız arasında bu değişkende istatistiksel olarak anlamlı fark çıkmamasının nedeni, çalışmalar arasındaki doz, süre ve yöntem farklılığı olarak düşünülmüştür.

Cheung ve ark. ortopedi alanında yaptıkları çalışmalarında, radyografi, micro-ct ve histomorfometri sonuçlarına göre, MKH'lerin ve LIPUS'un birlikte kullanımının tek tek kullanımına veya kontrol grubuna göre kırık iyileşmesini daha fazla arttırdığını bildirmişlerdir. Kombine kullanımlarıyla, MKH'lerin rejeneratif gücünün, LIPUS'un uyardığı sitokin üretiminin ve osteojenik farklılaşmanın arttığı görülmüştür (174). Fekrazad ve ark. ise, 12 tane Yeni Zelanda tavşanının kalvaryasında 6 mm çapında 48 yuvarlak kemik defekti oluşturmuş, bu hayvanları kontrol grubu, lazer uygulanmış grup, mezenkimal kök hücre uygulanmış grup ve lazer ile kombine mezenkimal kök hücre uygulanmış grup olmak üzere 4 gruba ayırmıştır. 810 nm dalga boyunda, 0.2 W/cm² gücünde GaAlAs diyot lazer 3 hafta boyunca lazer gruplarında kullanılmıştır. Histolojik değerlendirmelerin sonucunda, DDLT uygulanmış grupta, diğer gruplara göre yeni kemik yapımında artış olduğu, MKH uygulanmış grup ve kontrol grubu arasında ise kemik formasyonu bakımından fark görülmediği bildirilmiştir. DDLT uygulanmış grupta, diğer gruplara göre inflamasyonun anlamlı şekilde azaldığı gösterilmiştir. Düşük doz lazer terapisinin kemik rejenerasyonunda efektif olduğu, fakat MKH'lerle sinerjistik etki göstermediği bildirilmiştir. Fakat, bu sonucun deney süresinin 3 hafta gibi kısa bir süre olmasından kaynaklanmış olabileceği belirtilmiştir (15). Çalışmamızın bulgularına göre ise,

DDLDT'nin tek başına kullanımıyla ÜÇE ile kullanımı arasında YKO açısından anlamlı fark görülmezken; MKH ile birlikte kullanımı YKO'yu arttırmıştır. MKH, osteoblast formasyonunu ve sayısını artırıp hızlandırabilmektedir. Bu nedenle, YKO da MKH'nin bu özelliğinin etkili olduğu düşünülmüştür.

5.4. Yeni Damar Oluşumunun Tartışması (YDO)

Çalışmamızda, aparey, DDLT, ÜÇE ve MKH kullanımı ile YDO artmıştır. Damarlanmada rol alan çeşitli sitokinler (VEGF, bFGF gibi) ve mediatörler kompleks moleküler ve biyokimyasal yollar ile etki etmekte ve çeşitli hücrel cevaplar meydana getirmektedirler (243). Yeni damar oluşumu doku onarımı, kemikleşme vb gibi bir çok fizyolojik süreç için gereklidir (244). Mandibulanın öne alınması kondilde YKO uyarısına neden olmaktadır. Bu alanda Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF) gibi büyüme faktörlerinin artmasına paralel olarak artan bir kemik oluşumunun saptanması, YDO ile YKO arasında doğrusal bir ilişkinin olduğuna işaret etmektedir.

Literatürde, mandibular ilerletmenin, erken aşamalarda glenoid fossada osteogenezisi ve yeni damar oluşumunu önemli miktarda arttırdığı rapor edilmiştir (245). Benzer şekilde bizim çalışmamızda da, YDO'da aparey kullanımı ile anlamlı, aparey ile ÜÇE, MKH ve DDLT'nin bir arada kullanımıyla ise oldukça anlamlı bir artış olduğu görülmüştür. Rabie ve ark. çalışmalarında, AİA uygulamasının damarlanmayı arttırdığını ve bunun özellikle de kondilin posterior bölgesinde meydana geldiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, bu yeni damar oluşumunun yeni kemik oluşumu için uyarıcı rol oynadığını göstermişlerdir. Farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin çoğalıp birikmesi ile endokondral kemikleşmeye neden oldukları saptanmış ve Hipertrofik Tabaka içerisine giren damarların artışının oluşan kıkırdak dokusunun kemik ile yer değiştirmesine neden olduğu düşünülmüştür (245).

Aparey+ÜÇE ile sağlanan YDO'nun, apareyin tek başına kullanımıyla meydana gelen YDO'dan istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur. Fakat, ÜÇE'nin özellikle MKH ve DDLT ile kombine kullanılmasıyla YDO'yu daha fazla arttırdığı çalışmamızın bulgularıyla desteklenmiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre, ÜÇE, MKH ile bir arada kullanıldığında YDO'yu, DDLT ile birlikte kullanımına göre daha fazla arttırmıştır.

Bizim çalışmamızın sonuçlarıyla benzer şekilde, Granero-Molto ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, hasarlı dokuya yerleştirilen MKH'lerin anjiyogenezisi arttırdığı, kemik yenilenmesini sağladığı ve iyileşmeyi hızlandırdığı gösterilmiştir (231).

5.5. STRO-1 Tartışması

MKH tutulumunu göstermek için kullanılan STRO-1'in aparey uygulamasıyla birlikte tutulumu artmıştır. Aparey kullanılan gruplar kendi arasında değerlendirildiğinde ise, ÜÇE ve DDLT'nin tek başına veya bir arada uygulandığı gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmezken; MKH uygulanan bütün gruplarda STRO-1 değerlerinde ciddi bir artış olduğu bulunmuştur. Bu da, uygulanan MKH'lerin kondil bölgesinde istediğimiz şekilde tutunduğunu ve rezorbe olmadan rejenerasyona katkı sağladığını göstermektedir.

5.6. Osteonektin Tartışması (ON)

Çalışmamızda, özellikle MKH uygulaması olmak üzere aparey, DDLT ve ÜÇE kullanımı ile ON artmıştır. Literatürdeki çalışmalar, ON'nin, kemik remodelingi için oldukça önemli olduğunu göstermiştir. Aktif remodelingin gerçekleştiği bölgeler, ON açısından oldukça zengindir. İn vitro çalışmalar, osteonektinin kollajene bağlandığını ve anjiyogenezisi, metalloproteinaz ekspresyonunu, hücre proliferasyonunu ve hücre-matriks etkileşimini düzenlediğini göstermiştir. Osteogenezis imperfekta gibi osteopenik durumlarda, osteonektin ekspresyonunun azaldığı bildirilmiştir (204).

Osteonektin sentezleyemeyen fareler ile yapılan çalışmalar, bu farelerde kemik formasyonunun ve osteoblast ile osteoklast sayılarının azaldığını, buna bağlı olarak da kemik remodelinginin azalarak osteopeni meydana geldiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, osteonektinin kemik remodelingini desteklediğini ve kemik kütlelerinin devam ettirilmesini sağladığını göstermiştir (204).

Bizim çalışmamızda ise, aparey kullanımıyla osteonektin miktarı, kontrol grubuna göre önemli miktarda artmıştır. Bu artış miktarı, aparey ile birlikte yapılan diğer tüm uygulamalarda, apareyin tek başına kullanılmasına göre daha fazla bulunmuştur.

Bununla birlikte, ÜÇE'nin DDLT ile birlikte kullanımıyla osteonektin miktarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlanmazken; ÜÇE'nin MKH ile kullanımıyla

anlamli miktarda osteonektin artışı elde edilmiştir. DDLT, MKH ile kullanıldığında ise osteonektin miktarını önemli miktarda arttırmıştır. Fakat, bu uygulamalara ÜÇE eklenmesiyle elde edilen artış, DDLT ve MKH'nın birlikte kullanımıyla elde edilen artıştan istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Çalışmamızın bulguları ışığında, MKH uygulanan bütün gruplarda osteonektin değerlerinde ciddi bir artış olduğu görülmüştür. MKH, DDLT ve ÜÇE'ye göre daha fazla osteonektin artışı sağlamıştır.

5.7. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü Tartışması (VEGF)

Çalışmamızda, özellikle MKH uygulaması olmak üzere aparey, DDLT ve ÜÇE kullanımı ile VEGF artmıştır. VEGF, yeni damar oluşumunu arttırarak perivasküler bağ dokudaki mezenkimal hücre sayısını arttırır. Ayrıca, vasküler endotelial hücreleri uyarak çeşitli büyüme faktörleri ve sitokinlerin salgılanmasına neden olur. Böylece, mezenkimal hücrelerin osteojenik farklılaşmasını uyarır. VEGF'nin artması, YDO'nun artması şeklinde yorumlanmaktadır (246). Aparey kullanımı, ÜÇE, DDLT ve MKH uygulamasıyla sağlanan YDO artışı çalışmamızda gösterilmiştir ve immunohistokimyasal olarak VEGF incelemesiyle YDO'daki bu artış protein bazında da gösterilmiştir.

Rabie ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, mandibular ilerletmenin ardından 14. günde VEGF'nin, 21. günde ise yeni kemik yapımının maksimum seviyeye ulaştığı rapor edilmiştir (245). Daha önceki yıllarda, Gerber ve ark. ise, kemik büyümesi için neovaskülarizasyonun gerekli olduğunu göstermiş ve VEGF inhibisyonunun yeni damar invazyonunu engellediğini, böylece uzun kemiklerin büyüme yerlerindeki yeni kemik yapımının bozulduğunu bildirmişlerdir (247). VEGF, uzun kemiklerde olduğu gibi glenoid fossada da kemik büyümesi için elzemdir (245).

Son dönemdeki çalışmalarda, mandibular ilerletmenin ardından, VEGF ekspresyonunda %170 oranında artış olduğu gösterilmiştir (245). Leung ve ark. iki aşamalı mandibular ilerletme tedavisi yaptıkları çalışmalarında, VEGF'nin tek aşamalı ilerletmeye göre daha fazla arttığını ve buna bağlı olarak da kondilde daha fazla kemik yapımı elde edildiğini rapor etmişlerdir (200).

İncelenen bu literatürlerle benzer şekilde bizim çalışmamızda da, VEGF aparey kullanımını ile anlamlı, Apearey+ÜÇE+MKH+DDLT kullanımıyla ise oldukça anlamlı bir artış elde edilmiştir.

Apearey+ÜÇE ile sağlanan VEGF artışının, apareyin tek başına kullanımıyla meydana gelen artıştan istatistiksel olarak farklı olmadığı bulunmuştur. Fakat, ÜÇE'nin özellikle MKH ve DDLT ile kombine kullanılmasıyla VEGF'i daha fazla arttırdığı çalışmamızın bulgularıyla desteklenmiştir. ÜÇE, MKH ile bir arada kullanıldığında VEGF'i, DDLT ile birlikte kullanımına göre daha fazla arttırmıştır.

Apearey+DDLT ve Apearey+DDLT+ÜÇE kullanımıyla elde edilen VEGF artışı istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. Bununla birlikte, DDLT, MKH ile kullanıldığında VEGF'i önemli miktarda arttırmıştır. Mezenkimal kök hücrelerin, önemli miktarda anjiyogenik ve antiapoptotik faktörler salgılaması çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz VEGF artışını desteklemektedir (248). Hayvan modellerinde, hasarlı dokuya MKH'ler enjekte edildiğinde, çevredeki hücrelerin apoptozisinin azaldığı; VEGF, FGF2 ve TGF- β gibi çeşitli büyüme faktörlerinin ise sentezinin arttığı gösterilmiştir (249). Son dönemlerde, Caplan çalışmasında perisitlerde veya perivasküler hücrelerde, MKH'lerin doğal olarak bulunduğunu bildirmiştir. Yara bölgesindeki perisit veya perivasküler hücrelerden immunomodülatör olarak da bilinen, biyoaktif trofik faktörlerin salgılandığı ve bu trofik faktörlerin, iskeminin indüklediği apoptozisi inhibe ederken, anjiyogenezisi arttırdığı rapor edilmiştir (250).

5.8. Tip II Kollajen Tartışması

Çalışmamızda, özellikle MKH uygulaması olmak üzere aparey, DDLT ve ÜÇE kullanımını ile Tip II kollajen miktarının arttığı görülmüştür. Kıkırdak, kemiğin şekillendiği bir kalıptır; kondilin adaptasyonu esnasında daha fazla kıkırdak demek daha fazla kemik oluşumu anlamına gelmektedir. Bu nedenle, Tip II kollajenin analizi, mandibular ilerletmeye verilen cevabı değerlendirmemizi sağlar (205).

Fujita ve ark. yaptıkları çalışmada, fonksiyonel aparey uygulamasının ardından Sox 9, Tip II ve Tip X kollajen sentezini değerlendirmek için, 3 haftalık 90 tane fareyi kontrol grubu, kondilektomi yapılan grup ve kondilektominin ardından fonksiyonel

aparey uygulanan grup olmak üzere 3 gruba ayırmışlardır. 4 haftalık deney süresinin ardından, kondilektomi yapılan grupta Sox 9, Tip II ve X kollajen sentezi minimalken, fonksiyonel aparey uygulanan grupta ise artış meydana geldiği gösterilmiştir. Bu kondrojenik faktörlerin sentezinin, kırıkta onarımına yardımcı olduğu rapor edilmiştir (251).

Rabie ve ark. ise, 5 haftalık sıçanlarla yaptıkları çalışmada, mandibulanın önde konumlandırılmasının, Sox 9 ve Tip II kollajen sentezi ile hızlandırıldığını ve arttırıldığını bildirmiştir. Normal büyüme esnasında Tip II kollajen ekspresyonunun maksimum seviyeye, deneyin 11. gününde ulaştığı; fakat, mandibular ilerletmenin ardından Hipertrofik Tabakanın posteriorunda, deneyin 7. gününde maksimum seviyede olduğu bildirilmiştir. Mandibular ilerletmenin ardından artan Tip II kollajen miktarının incelenmesi, kırıkta matriks formasyonunun değerlendirilmesi ve bunun kemik yapımıyla olan ilişkisinin anlaşılması için gereklidir. Bu araştırmacılar, mandibulanın önde konumlandırılmasıyla, Tip II kollajen ekspresyonunun aparey ile tedavi edilmeyen gruba göre posterior bölgede %98, orta bölgede ise %52 oranında artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. Mandibulanın ileride konumlandırılmasıyla, kırıkta major komponenti olan Tip II kollajenin sentezi dolayısıyla da kondrojenesis arttırılmıştır (206). Bizim çalışmamızda da Rabie ve ark.'nın çalışma sonuçlarına benzer şekilde, aparey kullanımıyla Tip II kollajen miktarı, kontrol grubuna göre önemli miktarda artmıştır. Özellikle MKH, DDLT ve ÜÇE'nin birlikte kullanımıyla ciddi bir Tip II kollajen artışı elde edilmiştir.

Düşük doz lazer terapisinin fibroblast proliferasyonunu ve osteoid doku miktarını arttırdığı çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir. Hücrel proliferasyonun ve hücrel farklılaşmanın stimülasyonu ile lazer tedavisi kemik oluşumunu indüklemektedir (222). Kemik onarımı sırasında daha kaliteli bir matriks oluşmasında, kollajen üretiminin etkisi olduğu bilinmektedir. DDLT uygulanan deneklerde kollajen fibrillerde artış izlenmiştir. Bu bulgu, DDLT'nin kemik onarımı üzerindeki erken dönem etkisi olarak yorumlanabilir. Bazı çalışmalarda ise, DDLT'yi takiben kollajen üretiminde artış izlenmiştir (252). Jia ve Guo çalışmalarında, He-Ne lazerin kondrosit kültürü üzerindeki biyostimülatif etkilerini incelemiş ve lazer uygulamalarının eklem kondrositlerini ve sekresyonlarını stimüle ettiğini bildirmişlerdir (253).

Bizim çalışmamızda ise, Aparey+ÜÇE'nin ve Aparey+DDLT'nin kullanımıyla artan Tip II kollajen miktarı, apareyin tek başına kullanımıyla elde edilenden istatistiksel olarak farklı bulunmamıştır. ÜÇE'nin DDLT ile birlikte kullanımıyla Tip II kollajende istatistiksel olarak anlamlı bir artış sağlanmazken; ÜÇE'nin MKH ile kullanımıyla anlamlı miktarda Tip II kollajen artışı elde edilmiştir. DDLT, MKH ile kullanıldığında ise Tip II kollajeni önemli miktarda arttırmıştır. MKH uygulanan bütün gruplarda, Tip II kollajen değerlerinde ciddi bir artış olduğu bulunmuştur. MKH, DDLT ve ÜÇE'ye göre daha fazla Tip II kollajen artışı sağlamıştır.



YKO, YDO, YOY, STRO-1, Osteonektin, VEGF ve Tip II kollajen değerleri için histomorfometrik ve immunohistokimyasal ölçümler ile istatistiksel değerlendirmeler yapıldıktan sonra aŐağıdaki sonuçlara ulaŐılmıştır:

1. Sıçanlarda deneysel olarak fonksiyonel apareyler ile mandibular kondilin yeni konumuna remodelingi ve adaptasyonu sağlanmışır.
2. STRO-1 artışı ile enjekte kök hücrenin kondil bölgesinde rezorbe olmadan tutunduğu, kalıcı ve etkili olduğu anlaşılmıştır.
3. Aparey ile birlikte özellikle Mezenkimal Kök Hücre olmak üzere, Üzüm Çekirdeği Ekstresi ve Düşük Doz Lazer Terapisi uygulamalarının birarada kullanımının yeni damar oluşumunu, hücre çoğalmasını, Tip II kollajen oluşumunu, osteoblast farklılaşmasını ve yeni kemik oluşumunu arttırdığı tespit edilmiştir.
4. Elde edilen rejenerasyona, Üzüm çekirdeği ekstresi+Mezenkimal kök hücre uygulamasının ve Düşük doz lazer terapisi+Mezenkimal kök hücre uygulamasının katkısı anlamlı şekilde saptanmıştır. Fakat, en etkili katkının, Mezenkimal kök hücre+Üzüm çekirdeği ekstresi+Düşük doz lazer terapisi uygulaması ile sağlandığı bulunmuştur.

Bizim alıŐmamızda, AİA uygulaması ile birlikte yapılan ÜÇE, DDLT ve MKH uygulamalarının kontrol grupları ile karşılaştırıldığında hem tek başlarına olumlu etki gösterdiği, hem de bir arada uygulandıklarında AİA işleme anlamlı katkılar sağladığı gösterilmiştir. MKH uygulamasının, diğer uygulamalara göre olumlu etkisinin çok daha fazla olduğu saptanmıştır. YOY, YKO ve YDO morfometrik ölçümlerinde, histolojik ve immunohistokimyasal görüntülerde ve H-skor ile yapılan analizlerde bu etki açıkça gösterilmiştir. Yapılan uygulamalarda osteoblast, kemik ve damar oluşumu, STRO-1 ile MKH varlığı, osteonektin ile kemik oluşumu, VEGF ile damarlanma, Tip II kolajen ile matriks durumu ortaya konmuş ve uygulamaların anlamlı yararlı etkileri izlenmiştir. Uygulamalar ile gerçekleşen osteoblast, kemik ve damar yapımının hücre çoğalmasıyla oluştuğu, hücrelerin fonksiyonel bir şekilde

osteoblast farklılaşmasına gittikleri ve özellikle MKH uygulamasının bunlara en çok katkıyı sağladığı anlaşılmıştır.

Bütün bu bilgiler ışığında, MKH kemik doku üretiminde ve rejenerasyonda gelecek vaadeden bir hücre kaynağıdır. Çalışmamızda MKH ile osteojenik, kondrojenik ve endotelyal farklılaşma sağlanmıştır. Fakat, klinik olarak aktif uygulamaya geçilmeden önce daha fazla hayvan çalışması ile bu çalışmanın sonuçları desteklenmelidir.



6. KAYNAKLAR

1. Meikle MC. The role of the condyle in the postnatal growth of the mandible. *Am J Orthod.* 1973;64(1):50-62.
2. Baume LJ, Derichsweiler H. Is the condylar growth center responsive to orthodontic therapy?: An experimental study in macaca mulatta. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1961;14(3):347-362.
3. Graber L, Jr RV, Vig K. *Orthodontics: Current principles and techniques.* 5th ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2011.
4. Kajikawa A, Hirabayashi S, Harii K. A new vascularized mandible heterotopic transplant model for studies on the growth of condylar cartilage. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003;61(2):234-238.
5. Proffit W, Jr HF, Moray L. Prevalence of malocclusion and orthodontic treatment need in the United States: Estimates from the NHANES III survey. *Orthod Orthognath.* 1997;13(2):97-106.
6. Ülgen M. Anomaliler, sefalometri, etioloji; Büyüme ve gelişim, tanı. 4. baskı Ankara: Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Yayınları; 2010.
7. Collett AR. Current concepts on functional appliances and mandibular growth stimulation. *Aust Dent J.* 2000;45(3):173-178.
8. Rabie ABM, Xiong H, Hägg U. Forward mandibular positioning enhances condylar adaptation in adult rats. *Eur J Dent.* 2004;26(4):353-358.
9. Bishara SE, Ziaja RR. Functional appliances: A review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1989;95(3):250-258.
10. Oyonarte R, Zárata M, Rodriguez F. Low-intensity pulsed ultrasound stimulation of condylar growth in rats. *Angle Orthod.* 2009;79(5):964-970.

11. Orajärvi M, Puijola E, Yu S-B, Liu X, Tiilikainen P, Wang M. Effect of estrogen and dietary loading on condylar cartilage. *J Orofac Pain*. 2012;26(4).
12. Khadra M, Kasem N, Haanæs HR, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP. Enhancement of bone formation in rat calvarial bone defects using low-level laser therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004;97(6):693-700.
13. Choi K, Kang BJ, Kim H, Lee S, Bae S, Kweon OK. Low-level laser therapy promotes the osteogenic potential of adipose-derived mesenchymal stem cells seeded on an acellular dermal matrix. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2013;101(6):919-928.
14. Abramovitch-Gottlib L, Gross T, Naveh D, Geresh S, Rosenwaks S, Bar I. Low level laser irradiation stimulates osteogenic phenotype of mesenchymal stem cells seeded on a three-dimensional biomatrix. *Lasers Med Sci*. 2005;20(3-4):138-146.
15. Fekrazad R, Ghuchani MS, Eslaminejad MB, Taghiyar L, Kalhori KAM, Pedram MS. The effects of combined low level laser therapy and mesenchymal stem cells on bone regeneration in rabbit calvarial defects. *J Photochem Photobiol B*. 2015;151:180-185.
16. Yalvac ME, Ramazanoglu M, Rizvanov AA, Sahin F, Bayrak OF, Salli U. Isolation and characterization of stem cells derived from human third molar tooth germs of young adults: Implications in neo-vascularization, osteo-, adipo- and neurogenesis. *Pharmacogenomics J*. 2010;10(2):105-113.
17. Yoshimura H, Muneta T, Nimura A, Yokoyama A, Koga H, Sekiya I. Comparison of rat mesenchymal stem cells derived from bone marrow, synovium, periosteum, adipose tissue, and muscle. *Cell Tissue Res*. 2007;327(3):449-462.
18. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999;284(5411):143-147.

19. Prockop DJ. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science*. 1997;276(5309):71-74.
20. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A. Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*. 2001;344(5):385-386.
21. Ekizer A, Yalvac ME, Uysal T, Sonmez MF, Sahin F. Bone marrow mesenchymal stem cells enhance bone formation in orthodontically expanded maxillae in rats. *Angle Orthod*. 2014;85(3):394-399.
22. Rabie ABM, Tsai M-JM, Hägg U, Du X, Chou B-W. The correlation of replicating cells and osteogenesis in the condyle during stepwise advancement. *Angle Orthod*. 2003;73(4):457-465.
23. Güngör PS. Low level laser therapy on human adipose tissue derived mesenchymal stem cells. 2007, Boğaziçi University, Institute of Biomedical Engineering, Master Thesis, Istanbul, (Murat Gülsoy, Semra Kahraman).
24. Ishikawa M, Maki K, Tofani I, Kimura K, Kimura M. Grape seed proanthocyanidins extract promotes bone formation in rat's mandibular condyle. *Eur J Oral Sci*. 2005;113(1):47-52.
25. Fujita T, Fujii Y, Miyauchi A, Takagi Y. Comparison of antiresorptive activities of ipriflavone, an isoflavone derivative, and elcatonin, an eel carbocalcitonin. *J Bone Miner Metab*. 1999;17(4):289-295.
26. Yahara N, Tofani I, Maki K, Kojima Y, Kimura M. Mechanical assessment of effects of grape seed proanthocyanidins extract on tibial bone diaphysis in rats. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2005; 5(2):162-169.
27. Kamitani Y, Maki K, Tofani I, Nishikawa Y, Tsukamoto K, Kimura M. Effects of grape seed proanthocyanidins extract on mandibles in developing rats. *Oral Dis*. 2004;10(1):27-31.
28. Moore K. *The Developing Human*. 9th ed. Philadelphia: WB Saunders; 2013.

29. Parfitt AM. The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data. In: Recker R. Bone histomorphometry: Techniques and interpretation. Boca Raton: CRC Press; 1983: p.143-223.
30. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239.
31. Fleisch H, Russell RGG, Straumann F. Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature*. 1966; 212(5065):901-903.
32. Noble BS, Stevens H, Loveridge N, Reeve J. Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal and pathological human bone. *Bone*. 1997;20(3):273-282.
33. Favus MJ. Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism. 6th ed. Washington: Amer Society for Bone & Mineral; 2006.
34. Ba BHS, Associate R. Enzyme histochemistry of bone and cartilage cells. *Prog Histochem Cytochem*. 1976;8(1):1-38.
35. Tomkinson A, Reeve J, Shaw RW, Noble BS. The Death of Osteocytes via Apoptosis Accompanies Estrogen Withdrawal in Human Bone 1. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(9):3128-3135.
36. Sharov VG, Sabbah HN, Shimoyama H, Goussev AV, Lesch M, Goldstein S. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*. 1996;148(1):141.
37. James IE, Walsh S, Dodds RA, Gowen M. Production and characterization of osteoclast-selective monoclonal antibodies that distinguish between multinucleated cells derived from different human tissues. *J Histochem Cytochem*. 1991;39(7):905-914.
38. Junqueira LC CeJ. Basic Histology: Text & Atlas. 11th ed. Columbus: McGraw-Hill Companies; 2005: p.142-156.

39. Scheuer L, Black S. The juvenile skeleton. 1st ed. London: Elsevier; 2004.
40. Enlow DH. Handbook of facial growth. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Company; 1990.
41. Goose DH, Appleton J. Human dentofacial growth. 1st ed. Oxford: Pergamon Press; 1982.
42. Buschang PH, Santos-Pinto A. Condylar growth and glenoid fossa displacement during childhood and adolescence. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998;113(4):437-442.
43. Enlow DH, Harris DB. A study of the postnatal growth of the human mandible. *Am J Orthod.* 1964;50(1):25-50.
44. Charles SW. The temporo-mandibular joint and its influence on the growth of the mandible. *Br Dent J.* 1925;46:845-855.
45. Moss ML. The functional matrix. *Vistas in orthodontics.* Philadelphia: Lea & Febiger; 1962:85-98.
46. Okeson JP. *Functional Anatomy and Biomechanics of the Masticatory system.* St.Louis: Mosby; 1993.
47. Zhang R, Fang H, Chen Y, Shen J, Lu H, Zeng C. Gene expression analyses of subchondral bone in early experimental osteoarthritis by microarray. *PLoS One.* 2012;7(2):32356.
48. Hunziker E, Herrmann W. Ultrastructure of cartilage. In: Bonucci E, Motta PM (Eds). *Ultrastruct Skelet Tissues.* Massachusetts: Kluwer Academic Publishers; 1990: p.79-109.
49. Low A. Proceedings of the Anatomical Society. *Journal of Anatomy and Physiology.* 1905;39:83-95.
50. Ramirez-Yañez GO, Daley TJ, Symons AL, Young WG. Incisor disocclusion in rats affects mandibular condylar cartilage at the cellular level. *Arch Oral Biol.* 2004;49(5):393-400.

51. Mizuno I, Saburi N, Taguchi N, Kaneda T, Hoshino T. The fine structure of the fibrous zone of articular cartilage in the rat mandibular condyle. *JPN J Oral Biol.* 1990;32(1):69-79.
52. Bibb CA, Pullinger AG, Baldioceda F. Serial variation in histological character of articular soft tissue in young human adult temporomandibular joint condyles. *Arch Oral Biol.* 1993;38(4):343-352.
53. Ghafari J, Degroote C. Condylar cartilage response to continuous mandibular displacement in the rat. *Angle Orthod.* 1986;56(1):49-57.
54. Ren C, Yang Y. Mandibular Condyle: Structure Properties and Growth Regulation. *Journal of Oral Science.* 2014;1(1):1-6.
55. Angle E. Treatment of malocclusion of the teeth: Angle's system. 7th ed. Philadelphia: White Dental Manufacturing Co; 1907.
56. Proffit W, Jr HF, Sarver D. Contemporary Orthodontics. 5th ed. Philadelphia: Elsevier; 2014.
57. McNamara Jr JA. Components of Class II malocclusion in children 8-10 years of age. *Angle Orthod.* 1981;51(3):177-202.
58. Bailey LJ, Proffit WR, White R (Eds). Assessment of patients for orthognathic surgery. *Semin Orthod.* 1999;5(4):209-222.
59. Ionescu E, Teodorescu E, Badarau A, Grigore R, Popa M. Prevention perspective in orthodontics and dento-facial orthopedics. *J Med Life.* 2008;1(4):397.
60. Mossey PA. The heritability of malocclusion: Part 2- The influence of genetics in malocclusion. *Br J Orthod.* 1999;26(3):195-203.
61. Baccetti T, Franchi L, Kim LH. Effect of timing on the outcomes of 1-phase nonextraction therapy of Class II malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136(4):501-509.

62. McNamara J, Brudon W, Kokich V. Orthodontics and dentofacial orthopedics. 1st ed. Ann Arbor, MI: Needham Press; 2001.
63. Mitchell L. An introduction to orthodontics. 4th ed. OUP Oxford University Press; 2013.
64. Shu R, Huang L, Bai D. Adult Class II Division 1 patient with severe gummy smile treated with temporary anchorage devices. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;140(1):97-105.
65. Ashmore JL, Kurland BF, King GJ, Wheeler TT, Ghafari J, Ramsay DS. A 3-dimensional analysis of molar movement during headgear treatment. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;121(1):18-29.
66. Moll EM. Treatment Effects of The Twin Block Functional Appliance and The Mandibular Anterior Repositioning Appliance (MARA) in Patients with Class II Malocclusions. 2012, State University Of New York, Dentistry, Master Thesis, p.68 Buffalo, (Brian Preston).
67. Baccetti T, Franchi L, Toth LR, McNamara JA. Treatment timing for Twin-block therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000;118(2):159-170.
68. Rakosi T, Graber T, Petrovic A. Dentofacial orthopedics with functional appliances. 2nd ed. St.Louis: Mosby; 1997.
69. Faltin Jr K, Faltin RM, Baccetti T, Franchi L, Ghiozzi B, McNamara Jr JA. Long-term effectiveness and treatment timing for bionator therapy. *Angle Orthod.* 2003;73(3):221-230.
70. Bishara S. Textbook of orthodontics. Philadelphia: WB Saunders; 2001.
71. Cozza P, Baccetti T, Franchi L. Mandibular changes produced by functional appliances in Class II malocclusion: A systematic review. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129(5):599e1-599e12.
72. Chen JY, Will LA, Niederman R. Analysis of efficacy of functional appliances on mandibular growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;122(5):470-476.

73. Fränkel R. The treatment of Class II, Division 1 malocclusion with functional correctors. *Am J Orthod.* 1969;55(3):265-275.
74. Moss ML, Salentijn L. The capsular matrix. *Am J Orthod.* 1969;56(5):474-490.
75. McNamara JA, Hugel SA. The functional regulator (FR-3) of Fränkel. *Am J Orthod.* 1985;88(5):409-424.
76. Clark WJ. The twin block technique: A functional orthopedic appliance system. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1988;93(1):1-18.
77. Harvold EP, Vargervik K, Chierici G. Primate experiments on oral sensation and dental malocclusions. *Am J Orthod.* 1973;63(5):494-508.
78. Graber TM. Temporal bone adaptations in response to protrusive function in juvenile and young adult rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): Hinton RJ, McNamara Jr JA. *Am J Orthod.* 1985;87(1):84-85.
79. Mills CM, McCulloch KJ. Treatment effects of the twin block appliance: A cephalometric study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998;114(1):15-24.
80. Valant JR, Sinclair PM. Treatment effects of the Herbst appliance. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1989;95(2):138-147.
81. Moritz A, Beer F, Goharkhay K, Schoop U. Oral laser application. Chicago: Quintessence Pub Co; 2006.
82. Paschotta R. Encyclopedia of laser physics and technology. Berlin: Wiley-vch; 2008.
83. Dörtbudak-Kneissl E, Dörtbudak O, Bernhart D, Haas R, Mailath-Pokorny G. Die photodynamische Therapie zur Keimreduktion bei parodontalen Erkrankungen. *Stomatologie.* 2000;97(1):1-4.
84. Coluzzi DJ. Fundamentals of dental lasers: Science and instruments. *Dent Clin North Am.* 2004;48(4):751-770.

85. Baxter CD, Waylonis GW. Therapeutic Lasers: Theory and Practice. Am J Phys Med Rehabil. 1995;74(4):327.
86. Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. Dent Clin North Am. 2000;44(4):753-765.
87. Özbayrak S. Laser Prensipleri Biyolojik Etkileri ve Dişhekimliğinde Kullanımı. İstanbul: E.S.C. ve Sharplan Lazerleri Türkiye Temsilciliği Ortadoğu A.S. Bilimsel Yayın Serisi; 1999.
88. Catone GA AIC. Laser applications in oral and maxillofacial surgery: introduction. Philadelphia: WB Saunders; 1997.
89. Frank KH. Laser light and tissue biophysical aspects of medical laser application. SPIE Lasers Med 1989;1353:37-45.
90. Van. As G, Erbium lasers in dentistry. Dent Clin North Am. 2004;48(4):1017-1059.
91. Genç G. Düşük Doz Lazer Uygulamalarının Ortodontik Diş Hareketi Üzerine Etkilerinin İncelenmesi. 2010, Hacettepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü; Doktora Tezi, 108 sayfa, Ankara.
92. Kitchen SS, Partridge CJ. A review of low level laser therapy: Part I: background, physiological effects and hazards. Physiotherapy. 1991;77(3):161-168.
93. Javan A, Bennett Jr WR, Herriott DR. Population inversion and continuous optical maser oscillation in a gas discharge containing a He-Ne mixture. Phys Rev Lett. 1961;6(3):106.
94. Reza F, Farzaneh A, Katayoun K, Nikoo T. Principle in Contemporary Orthodontics. Rijeka: Intech Open Access Publisher; 2011.
95. Gordon EI, Labuda EF, Bridges WB. Continuous visible laser action in singly ionized argon, krypton, and xenon. Appl Phys Lett. 1964;4(10):178-180.

96. Hicks J, Winn, II, Flaitz C, Powell L. In vivo caries formation in enamel following argon laser irradiation and combined fluoride and argon laser treatment: A clinical pilot study. *Quintessence International*. 2004;35(1):15-20.
97. Patel C. Interpretation of CO₂ Optical Maser Experiments. *Phys Rev Lett*. 1964;12:588.
98. Lomke MA. Clinical applications of dental lasers. *Gen Dent*. 2009;57(1):49-59.
99. Geusic JE, Marcos HM, Van Uitert L. Laser oscillations in Nd-doped yttrium aluminum, yttrium gallium and gadolinium garnets. *Appl Phys Lett*. 1964;4(10):182-184.
100. White JM, Goodis HE, Setcos JC, Eakle WS, Hulscher BE, Rose CL. Effects of Pulsed Nd: YAG Laser Energy on Teeth: A Three-Year Follow-up Study. *J Am Dent Assoc*. 1993;124(7):45-51.
101. Nalcaci R, Cokakoglu S. Lasers in orthodontics. *Eur J Dent*. 2013;7(5):119.
102. Hossain M, Nakamura Y, Yamada Y, Kimura Y, Matsumoto N, Matsumoto K. Effects of Er, Cr: YSGG laser irradiation in human enamel and dentin: ablation and morphological studies. *J Clin Laser Med Surg*. 1999;17(4):155-159.
103. Pourzarandian A, Watanabe H, Aoki A, Ichinose S, Sasaki KM, Nitta H. Comparison of early healing process of bone tissue after irradiation by Er: YAG laser and CO₂ laser. *Int Congr Ser*. 2003;1248:385–387.
104. Midda M. HP. Lasers in Dentistry. *Br Dent J*. 1991;170:343-346.
105. Miserendino LJ, Pick R. Lasers in dentistry. Chicago: Quintessence Publishing Co; 1995.
106. Bracciano AG. Physical agent modalities: Theory and application for the occupational therapist. 2nd ed. New Jersey: Slack; 2008.

107. Huang YY, Chen ACH, Carroll JD, Hamblin MR. Biphasic dose response in low level light therapy. *Dose-Response*. 2009;7(4):9-27.
108. Mester E, Szende B, Gärtner P. The effect of laser beams on the growth of hair in mice. *Radiobiol Radiother*. 1967;9(5):621-626.
109. Mester E, Mester AF, Mester A. The biomedical effects of laser application. *Lasers Surg Med*. 1985;5(1):31-39.
110. Sutherland JC. Biological effects of polychromatic light. *Photochem Photobiol*. 2002;76(2):164-170.
111. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. 1999;49(1):1-17.
112. Karu T. Laser biostimulation: A photobiological phenomenon. *J Photochem Photobiol B*. 1989;3(4):638.
113. Pastore D, Grego M, Passarella S. Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *Int J Radiat Biol*. 2000;76(6):863-870.
114. Karu TI. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation. *Lasers Life Sci*. 1988;2(1):53-74.
115. Andrade A de, Meireles A. The effects of low-level laser therapy, 670 nm, on epiphyseal growth in rats. *Sci World J*. 2012;2012:1-5.
116. Walsh LJ. The current status of low level laser therapy in dentistry, Part 1. Soft tissue applications. *Aust Dent J*. 1997;42(4):247-254.
117. Nicolau Ra JV, Rigau J. Effect of low power Ga-Al-As laser (660 nm) on bone structure anal cell activity: An experimental animal study. *Lasers Med Sci*. 2003;18:89-94.
118. Yamada K. Biological effects of low power laser irradiation on clonal osteoblastic cells (MC3T3-E1). *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1991;65(9):787-799.

119. Yaakobi T, Maltz L, Oron U. Promotion of bone repair in the cortical bone of the tibia in rats by low energy laser (He-Ne) irradiation. *Calcif Tissue Int.* 1996;59(4):297-300.
120. Dickson GR, Clingen H, Jordan GR, Linton T. The effect of low level laser therapy on alkaline phosphatase expression during fracture repair. *Laser Ther.* 1994;6:16-17.
121. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of laser in dentinal hypersensitivity treatment: A systematic review. *J Endod.* 2011;37(3):297-303.
122. Heidari S, Torkan S. Laser applications in orthodontics. *Lasers Med Sci.* 2013;4(4):151.
123. Krishnan V, Davidovitch Z. Biological mechanisms of tooth movement. 2nd ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2015.
124. Shimizu N, Yamaguchi M, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T. Inhibition of prostaglandin E2 and interleukin 1- β production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 1995;74(7):1382-1388.
125. Fujiyama K, Deguchi T, Murakami T, Fujii A, Kushima K, Takano-Yamamoto T. Clinical effect of CO2 laser in reducing pain in orthodontics. *Angle Orthod.* 2008;78(2):299-303.
126. Tortamano A, Lenzi DC, Haddad ACSS, Bottino MC, Dominguez GC, Vigorito JW. Low-level laser therapy for pain caused by placement of the first orthodontic archwire: A randomized clinical trial. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136(5):662-667.
127. Doshi-Mehta G, Bhad-Patil WA. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: A clinical investigation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;141(3):289-297.

128. Cruz DR, Kohara EK, Ribeiro MS, Wetter NU. Effects of low-intensity laser therapy on the orthodontic movement velocity of human teeth: A preliminary study. *Lasers Surg Med.* 2004;35(2):117-120.
129. Renno ACM, McDonnell PA, Parizotto NA, Laakso EL. The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation in vitro. *Photomed Laser Surg.* 2007;25(4):275-280.
130. Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.* 2000;26(3):282-291.
131. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res.* 2008;11(3):143-155.
132. Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12(2):113-119.
133. Abi-Ramia LBP, Sasso Stuani A, Sasso Stuani A, Sasso Stuani MB, de Moraes Mendes A. Effects of low-level laser therapy and orthodontic tooth movement on dental pulps in rats. *Angle Orthod.* 2010;80(1):116-122.
134. Seifi M, Shafeei HA, Daneshdoost S, Mir M. Effects of two types of low-level laser wave lengths (850 and 630 nm) on the orthodontic tooth movements in rabbits. *Lasers Med Sci.* 2007;22(4):261-264.
135. Silva Da APRB, Petri AD, Crippa GE, Stuani AS, Stuani AS, Rosa AL. Effect of low-level laser therapy after rapid maxillary expansion on proliferation and differentiation of osteoblastic cells. *Lasers Med Sci.* 2012;27(4):777-783.
136. Cepera F, Torres FC, Scanavini MA, Paranhos LR, Capelozza Filho L, Cardoso MA. Effect of a low-level laser on bone regeneration after rapid maxillary expansion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;141(4):444-450.

137. Angeletti P, Pereira MD, Gomes HC, Hino CT, Ferreira LM. Effect of low-level laser therapy (GaAlAs) on bone regeneration in midpalatal anterior suture after surgically assisted rapid maxillary expansion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109(3):38-46.
138. Santiago VCCE, Piram A, Fuziy A. Effect of soft laser in bone repair after expansion of the midpalatal suture in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2012;142(5):615-624.
139. Saito S, Shimizu N. Stimulatory effects of low-power laser irradiation on bone regeneration in midpalatal suture during expansion in the rat. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1997;111(5):525-532.
140. Akai M, Usuba M, Maeshima T, Shirasaki Y, Yasuoka S. Laser's effect on bone and cartilage change induced by joint immobilization: An experiment with animal model. *Lasers Surg Med.* 1997;21(5):480-484.
141. Morrone G, Guzzardella GA, Torricelli P, Rocca M, Tigani D, Brodano GB, Fini M, Giardino R. Osteochondral lesion repair of the knee in the rabbit after low-power diode Ga-Al-As laser biostimulation: An experimental study. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 2000;28(4):321-336.
142. Seifi M, Maghzi A, Gutknecht N, Mir M, Asna-Ashari M. The effect of 904 nm low level laser on condylar growth in rats. *Lasers Med Sci.* 2010;25(1):61-65.
143. Abtahi M, Poosti M, Saghravanian N. The effect of low level laser on condylar growth during mandibular advancement in rabbits. *Head Face Med.* 2012;8(4).
144. Okşayan R, Sökücü O, Üçüncü N. The Effects of Low-Level Laser Therapy on Condylar Growth with a Mandibular Advancement Appliance in Rats. *Photomed Laser Surg.* 2015;33(5):252-257.
145. Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Prolif.* 1970;3(4):393-403.

146. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):743-765.
147. Owen M. Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci.* 1988;1988(10):63-76.
148. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.* 1991;9(5):641-650.
149. Can A. A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk J Hematol.* 2008;25:57-59.
150. Vacanti CA. History of tissue engineering and a glimpse into its future. *Tissue Eng.* 2006;12(5):1137-1142.
151. Kolf CM, Cho E, Tuan RS. Mesenchymal stromal cells: Biology of adult mesenchymal stem cells: Regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.* 2007;9(1):1.
152. Marion NW, Mao JJ. Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol.* 2006;420:339-361.
153. Metheny-Barlow LJ, Tian S, Hayes AJ, Li LY. Direct chemotactic action of angiopoietin-1 on mesenchymal cells in the presence of VEGF. *Microvasc Res.* 2004;68(3):221-230.
154. Otto WR, Rao J. Tomorrow's skeleton staff: Mesenchymal stem cells and the repair of bone and cartilage. *Cell Prolif.* 2004;37(1):97-110.
155. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Krause DS. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-317.
156. Weissman IL. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science.* 2000;287(5457):1442-1446.
157. Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: Mesenchymal stem cells: Their phenotype, differentiation capacity,

- immunological features, and potential for homing. *Stem cells*. 2007;25(11):2739-2749.
158. Friedman MS, Long MW, Hankenson KD. Osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells is regulated by bone morphogenetic protein-6. *J Cell Biochem*. 2006;98(3):538-554.
 159. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: Clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568-584.
 160. Krishnan V, Bryant HU, MacDougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2006;116(5):1202-1209.
 161. Hughes FJ, Turner W, Belibasakis G, Martuscelli G. Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontol 2000*. 2006;41(1):48-72.
 162. Liu L, Saldanha SN, Pate MS, Andrews LG, Tollefsbol TO. Epigenetic regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity during cellular differentiation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004;41(1):26-37.
 163. Zheng H, Guo Z, Ma Q, Jia H, Dang G. Cbfa1/osf2 transduced bone marrow stromal cells facilitate bone formation in vitro and in vivo. *Calcif Tissue Int*. 2004;74(2):194-203.
 164. Tuli R, Tuli S, Nandi S, Huang X, Manner PA, Hozack WJ. Transforming growth factor- β -mediated chondrogenesis of human mesenchymal progenitor cells involves N-cadherin and mitogen-activated protein kinase and Wnt signaling cross-talk. *J Biol Chem*. 2003;278(42):41227-41236.
 165. Hennig T, Lorenz H, Thiel A, Goetzke K, Dickhut A, Geiger F. Reduced chondrogenic potential of adipose tissue derived stromal cells correlates with an altered TGF β receptor and BMP profile and is overcome by BMP-6. *J Cell Physiol*. 2007;211(3):682-691.
 166. Jin XB, Sun YS, Zhang K, Wang J, Shi TP, Ju XD. Tissue engineered cartilage from hTGF β 2 transduced human adipose derived stem cells seeded

- in PLGA/alginate compound in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008;86(4):1077-1087.
167. Keskin ZT. Contribution of mesenchymal stem cells in cell based therapies. 2010, Bilkent University, Department of Molecular Biology and Genetics, Ph.D. Thesis, p.110, Ankara, (K. Can Akçalı).
 168. Barry FP. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2003;69(3):250-256.
 169. Krebsbach PH, Mankani MH, Satomura K, Kuznetsov SA, Robey PG. Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*. 1998;66(10):1272-1278.
 170. Özgen C. Characterization And Identification Of Human Mesenchymal Stem Cells At Molecular Level. 2012, Middle East Technical University, Department of Biotechnology, Ph.D. Thesis, p.154, Ankara, (Ufuk Gündüz).
 171. Akgün I, Ünlü MC. Kıkırdak Hastalıklarında Mezenkimal Kök Hücre Uygulamaları. *Türkiye Klinikleri J Orthop & Traumatol*. 2011;4(1):95-101.
 172. Bauer TW, Muschler GF. Bone Graft Materials: An Overview of the Basic Science. *Clin Orthop Relat Res*. 2000;371:10-27.
 173. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998;355:7-21.
 174. Cheung WH, Chin WC, Wei FY, Li G, Leung KS. Applications of exogenous mesenchymal stem cells and low intensity pulsed ultrasound enhance fracture healing in rat model. *Ultrasound Med Biol*. 2013;39(1):117-125.
 175. Siwach RC, Sangwan SS, Singh R, Goel A. Role of percutaneous bone marrow grafting in delayed unions, non-unions and poor regenerates. *Indian J Med Sci*. 2001;55(6):326.
 176. Goel A, Sangwan SS, Siwach RC, Ali AM. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union. *Injury*. 2005;36(1):203-206.

177. Horwitz EM, Prockop DJ, Fitzpatrick LA, Koo WWK, Gordon PL, Neel M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999;5(3):309-313.
178. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry—part I: Stem cell sources. *J Prosthodont Res.* 2012;56(3):151-165.
179. Yamada Y, Ueda M, Hibi H, Nagasaka T. Translational research for injectable tissue-engineered bone regeneration using mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: From basic research to clinical case study. *Cell transplantation.* 2004;13(4):343-355.
180. Egusa H, Sonoyama W, Nishimura M, Atsuta I, Akiyama K. Stem cells in dentistry—Part II: Clinical applications. *J Prosthodont Res.* 2012;56(4):229-248.
181. Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q. Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials.* 2012;33(27):6320-6344.
182. Ishizaka R, Iohara K, Murakami M, Fukuta O, Nakashima M. Regeneration of dental pulp following pulpectomy by fractionated stem/progenitor cells from bone marrow and adipose tissue. *Biomaterials.* 2012;33(7):2109-2118.
183. Oyonarte R, Becerra D, Díaz-Zúñiga J, Rojas V, Carrion F. Morphological effects of mesenchymal stem cells and pulsed ultrasound on condylar growth in rats: A pilot study. *Aust Orthod J.* 2013;29(1):3-12.
184. El-Bialy T, Alhadlaq A. Current Advances in Mandibular Condyle Reconstruction. In: Mohammad Hosein Kalantar Motamedi (Eds.). *A Textbook of Advanced Oral and Maxillofacial Surgery.* Rijeka: InTech; 2013.
185. Vacek A, Bartonickova A, Vesela Z, Petrů F. Increase in colony-forming capacity of the haemopoietic stem cells in the bone marrow exposed to the He-Ne laser radiation in vitro. *Folia Biol.* 1982;28(6):426.

186. Wang L, Sun C, Ouyang Y. Proliferative effect of low energy laser and colony stimulating factor on human umbilical cord blood hematopoietic cells. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 1998;78(4):287-289.
187. Souza De SC, Munin E, Alves LP, Salgado MAC, Pacheco MTT. Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in *Dugesia tigrina* during regeneration. *J Photochem Photobiol B*. 2005;80(3):203-207.
188. Kar P, Laight D, Shaw KM, Cummings MH. Flavonoid-rich grape seed extracts: A new approach in high cardiovascular risk patients? *Int J Clin Pract*. 2006;60(11):1484-1492.
189. Özdamar MY, Yurtçu M, Toy H, Aköz M, Günel E. Renal iskemi-reperfüzyon hasarında üzüm çekirdeği proantosiyanidin ekstresinin etkisi. *Genel Tip Dergisi*. 2010;20(1).
190. Monagas M, Gómez-Cordovés C, Bartolomé B, Laureano O, Ricardo da Silva JM. Monomeric, oligomeric, and polymeric flavan-3-ol composition of wines and grapes from *Vitis vinifera* L. Cv. Graciano, Tempranillo, and Cabernet Sauvignon. *J Agric Food Chem*. 2003;51(22):6475-6481.
191. Negro C, Tommasi L, Miceli A. Phenolic compounds and antioxidant activity from red grape marc extracts. *Bioresour Technol*. 2003;87(1):41-44.
192. Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Das DK, Ray SD, Kuszynski CA. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: Importance in human health and disease prevention. *Toxicology*. 2000;148(2):187-197.
193. Chang WC, Hsu FL. Inhibition of platelet aggregation and arachidonate metabolism in platelets by procyanidins. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 1989;38(3):181-188.
194. Ray S, Bagchi D, Lim PM, Bagchi M, Gross SM, Kothari SC. Acute and long-term safety evaluation of a novel IH636 grape seed proanthocyanidin extract. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*. 2000;109(3-4):165-197.

195. Wren AF, Cleary M, Frantz C, Melton S, Norris L. 90-day oral toxicity study of a grape seed extract (IH636) in rats. *J Agric Food Chem.* 2002;50(7):2180-2192.
196. Khanna S, Roy S, Bagchi D, Bagchi M, Sen CK. Upregulation of oxidant-induced VEGF expression in cultured keratinocytes by a grape seed proanthocyanidin extract. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(1):38-42.
197. Vasänge M, Liu B, Welch CJ, Rolfsen W, Bohlin L. The flavonoid constituents of two *Polypodium* species (*Calaguala*) and their effect on the elastase release in human neutrophils. *Planta Med.* 1997;63(06):511-517.
198. Koga T, Moro K, Nakamori K, Yamakoshi J, Hosoyama H, Kataoka S. Increase of antioxidative potential of rat plasma by oral administration of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *J Agric Food Chem.* 1999;47(5):1892-1897.
199. Park JS, Park MK, Oh HJ, Woo YJ, Lim MA, Lee JH. Grape-seed proanthocyanidin extract as suppressors of bone destruction in inflammatory autoimmune arthritis. *PLoS One.* 2012;7(12):51377.
200. Leung FYC, Rabie ABM, Hägg U. Neovascularization and bone formation in the condyle during stepwise mandibular advancement. *Eur J Dent.* 2004;26(2):137-141.
201. Guweidhi A, Kleeff J, Adwan H, Giese NA, Wente MN, Giese T. Osteonectin influences growth and invasion of pancreatic cancer cells. *Ann Surg.* 2005;242(2):224-234.
202. Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell.* 1981;26(1):99-105.
203. Lane TF, Sage EH. The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* 1994;8(2):163-173.

204. Delany AM, Amling M, Priemel M, Howe C, Baron R, Canalis E. Osteopenia and decreased bone formation in osteonectin-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000;105(7):915-923.
205. Rabie ABM, Al-Kalaly A. Does the degree of advancement during functional appliance therapy matter? *Eur J Dent.* 2008;30(3):274-282.
206. Rabie ABM, She TT, Hägg U. Functional appliance therapy accelerates and enhances condylar growth. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2003;123(1):40-48.
207. Simmons PJ, Torok-Storb B. Identification of stromal cell precursors in human bone marrow by a novel monoclonal antibody, STRO-1. *Blood.* 1991;78(1):55-62.
208. Hoshiyama Y, Otsuki S, Oda S, Kurokawa Y, Nakajima M, Jotoku T. Expression Pattern and Role of Chondrocyte Clusters in Osteoarthritic Human Knee Cartilage. *J Orthop Res.* 2015;33(4):548–555.
209. Herring S. TMJ anatomy and animal models. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2003; 3(4):391.
210. Porto GG, Vasconcelos BC, Andrade ES, Silva-Junior VA. Comparison between human and rat TMJ: Anatomic and histopathologic features. *Acta Cir Bras.* 2010;25(3):290-293.
211. Chu FT, Tang GH, Hu Z, Qian YF, Shen G. Mandibular functional positioning only in vertical dimension contributes to condylar adaptation evidenced by concomitant expressions of L-Sox5 and type II collagen. *Arch Oral Biol.* 2008;53(6):567-574.
212. Owtad P, Potres Z, Shen G, Petocz P, Darendeliler MA. A histochemical study on condylar cartilage and glenoid fossa during mandibular advancement. *Angle Orthod.* 2011;81(2):270-276.

213. Zhong X, Wang H, Jian X. Expression of matrix metalloproteinases-8 and-9 and their tissue inhibitor in the condyles of diabetic rats with mandibular advancement. *Exp Ther Med*. 2014;8(5):1357-1364.
214. Freudenberger CB. A comparison of the Wistar albino and the long-evans hybrid strain of the norway rat. *Am J Anat*. 1932;50(2):293-349.
215. Sengupta P. A scientific review of age determination for a laboratory rat: How old is it in comparison with human age? *Int J Prev Med*. 2013;4(6):624–630.
216. El-Bialy T, El-Shamy I, Graber TM. Growth modification of the rabbit mandible using therapeutic ultrasound: Is it possible to enhance functional appliance results? *Angle Orthod*. 2003;73(6):631-639.
217. Khan I, El-Kadi AO, El-Bialy T. Effects of growth hormone and ultrasound on mandibular growth in rats: Micro CT and toxicity analyses. *Arch Oral Biol*. 2013;58(9):1217-1224.
218. Xiong H, Rabie AB, Hagg U. Mechanical strain leads to condylar growth in adult rats. *Front Biosci*. 2005;10(1):65-73.
219. Saafan A, Abd-El-Fattah A, Bakeer A, Khattab SM. Effect of low power diode laser on mandibular growth (experimental study). *J Dent Lasers*. 2014;8(2):50.
220. Xiong H, Hägg U, Tang G-H, Rabie ABM, Robinson W. The effect of continuous bite-jumping in adult rats: A morphological study. *Angle Orthod*. 2004;74(1):86-92.
221. Rabie ABM, Zhao Z, Shen G, Hägg EU, Robinson W. Osteogenesis in the glenoid fossa in response to mandibular advancement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2001;119(4):390-400.
222. Ozawa Y, Shimizu N, Kariya G, Abiko Y. Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. *Bone*. 1998;22(4):347-354.

223. Dörtbudak O, Haas R, Mailath-Pokorny G. Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser. *Clin Oral Implants Res.* 2000;11(6):540-545.
224. Pinheiro AL, Gerbi ME. Photoengineering of bone repair processes. *Photomed Laser Ther.* 2006;24(2):169-178.
225. Stein E, Koehn J, Sutter W, Wendtlandt G, Wanschitz F, Thurnher D. Initial effects of low-level laser therapy on growth and differentiation of human osteoblast-like cells. *Wien Klin Wochenschr.* 2008;120(3-4):112-117.
226. Pedro J De, Martin A, Blanco J. Histomorphometric study of femoral heads in hip osteoarthritis and osteoporosis. *Histol Histopathol.* 2007;22(10):1091-1097.
227. Sun G, Tunér J. Low-level laser therapy in dentistry. *Dent Clin North Am.* 2004;48(4):1061-1076.
228. El-Bialy T, Alhadlaq A, Felemban N, Yeung J, Ebrahim A, H. Hassan A. The effect of light-emitting diode and laser on mandibular growth in rats. *Angle Orthod.* 2014;85(2):233-238.
229. Pourreau-Schneider N, Soudry M, Remusat M, Franquin JC, Martin PM. Modifications of growth dynamics and ultrastructure after helium-neon laser treatment of human gingival fibroblasts. *Quintessence Int.* 1989;20(12):887-893.
230. Bianco P, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: Revisiting history, concepts, and assays. *Cell stem cell.* 2008;2(4):313-319.
231. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, Landis B, Myers TJ, O'Rear L. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem cells.* 2009;27(8):1887-1898.
232. Scotti C, Tonnarelli B, Papadimitropoulos A, Scherberich A, Schaeren S, Schauerte A. Recapitulation of endochondral bone formation using human adult mesenchymal stem cells as a paradigm for developmental engineering. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107(16):7251-7256.

233. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10(2):96-101.
234. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: Mesenchymal stem/multipotent stromal cells: The state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views. *Stem cells.* 2007;25(11):2896-2902.
235. Hirao A, Arai F, Suda T. Regulation of cell cycle in hematopoietic stem cells by the niche. *Cell cycle.* 2004;3(12):1481-1483.
236. Tuby H, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation (LLLI) promotes proliferation of mesenchymal and cardiac stem cells in culture. *Lasers Surg Med.* 2007;39(4):373-378.
237. Yoshimura K, Sato K, Aoi N, Kurita M, Inoue K, Suga H. Cell-Assisted Lipotransfer for Facial Lipoatrophy: Efficacy of Clinical Use of Adipose-Derived Stem Cells. *Dermatol Surg.* 2008;34(9):1178-1185.
238. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA, Huang JI, Mizuno H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell.* 2002;13(12):4279-4295.
239. Yoon E, Dhar S, Chun DE, Gharibjanian NA, Evans GRD. In vivo osteogenic potential of human adipose-derived stem cells/poly lactide-co-glycolic acid constructs for bone regeneration in a rat critical-sized calvarial defect model. *Tissue Eng.* 2007;13(3):619-627.
240. Bernacki SH, Wall ME, Lobo EG. Isolation of human mesenchymal stem cells from bone and adipose tissue. *Methods Cell Biol.* 2008;86:257-278.
241. Tang GH, Rabie ABM. Runx2 regulates endochondral ossification in condyle during mandibular advancement. *J Dent Res.* 2005;84(2):166-171.
242. Taira K, Iino S, Kubota T, Fukunaga T, Miyawaki S. Effects of mandibular advancement plus prohibition of lower incisor movement on mandibular growth in rats. *Angle Orthod.* 2009;79(6):1095-1101.

243. Bir SC, Kolluru GK, Fang K, Kevil CG. Redox balance dynamically regulates vascular growth and remodeling. *Semin Cell Dev Biol.* 2012;23(7):745-757.
244. Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev.* 2004;56(4):549-580.
245. Rabie ABM, Shum L, Chayanupatkul A. VEGF and bone formation in the glenoid fossa during forward mandibular positioning. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2002;122(2):202-209.
246. Shum L, Rabie ABM, Hägg U. Vascular endothelial growth factor expression and bone formation in posterior glenoid fossa during stepwise mandibular advancement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;125(2):185-190.
247. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 1999;5(6):623-628.
248. Hocking AM, Gibran NS. Mesenchymal stem cells: Paracrine signaling and differentiation during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res.* 2010;316(14):2213-2219.
249. Tögel F, Weiss K, Yang Y, Hu Z, Zhang P, Westenfelder C. Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2007;292(5):1626-1635.
250. Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: New insight. *J Pathol.* 2009;217(2):318-324.
251. Fujita T, Nakano M, Ohtani J, Kawata T, Kaku M, Motokawa M. Expression of Sox 9 and type II and X collagens in regenerated condyle. *Eur J Dent.* 2010;32(6):677-680.

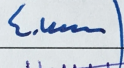
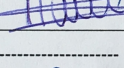
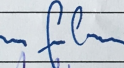
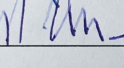
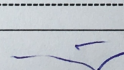
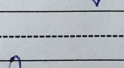
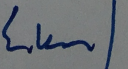
252. Pinheiro ALB. Recent studies on bone regeneration. Int Congr Ser. 2003;1248:69-72.
253. Jia YL, Guo ZY. Effect of low-power He–Ne laser irradiation on rabbit articular chondrocytes in vitro. Lasers Surg Med. 2004;34(4):323-328.



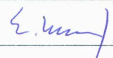
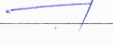
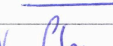


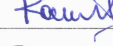
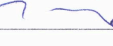
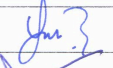


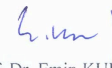
7. EKLER

EK 1: Yerel Etik Kurul Karar Metni

T.C.
Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	02 /02 /2016 / 77.637.435 - 02		
ARAŞTIRMANIN ADI	Fonksiyonel mandibular iletme apareyi kullanılan sıçanlarda sistemik üzüm çekirdeği ekstresi ve mezenkimal kök hücre kullanımı ile düşük seviyeli lokal lazer uygulamasının kondile etkilerinin değerlendirilmesi		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Doç. Dr. N. Eren İŞMAN - Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Dt. Merve Nur Eğlenen,- Prof. Dr. İbrahim Tuğlu,- Dr. Işıl Aydemir		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi <input checked="" type="checkbox"/>	Yüksek Lisans/Doktora <input type="checkbox"/>	Akademik <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	01 / 02 / 2015 / Tarih ve 02 sayılı; araştırma dosyası		
KARAR BİLGİLERİ	Araştırma dosyası incelenmiş, Yöntem kısmında, uygulanacak lazer yönteminin hayvana ve çevredekilere potansiyel zararlı etkileri ve alınacak önlemler, uygulanacak yöntemlerin ağırlı olup olmayacağı; ağrı olması beklenen işlemlerde ne gibi önlemlerin alınacağı, mesenkimal kök hücresinin nasıl uygulanacağı konusunda detaylı bilgi verilmesi gerektiğine oy birliği ile karar verilmiştir		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Hatice MAVİOĞLU Nöroloji		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon	-----	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kıvanç GÜNHAN DEHAM Müdürü		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji	-----	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Fulya OCAK Veteriner Hekim	-----	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi	-----	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Sivil Üye	-----	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.			
 Prof. Dr. Emin KURT Başkan			

T.C.
Manisa Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu

KARAR TARİH / NO	22/11 /2016 / 77.637.435 - 71		
ARAŞTIRMANIN ADI	Fonksiyonel Mandibular İlerletme Aparenti Kullanılan Sıçanlarda Sistemik Üzüm Çekirdeği Ekstresi ve Mezenkimal Kök Hücre Kullanımı ile Düşük Doz Lokal Lazer Uygulamasının Damarlanma ve Yeni Kemik Oluşumu Açısından Kondil Histolojisine Etkisi		
SORUMLU ARAŞTIRMACI	Yrd. Doç. Dr. Ayşegül GÜLEÇ- Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi		
ARAŞTIRMA EKİBİ	Dt. Merve Nur Eğlenen,- Prof. Dr. İbrahim Tuğlu,- Dr. Işıl Aydemir		
ARAŞTIRMANIN NİTELİĞİ	Uzmanlık Tezi <input checked="" type="checkbox"/>	Yüksek Lisans/Doktora <input type="checkbox"/>	Akademik <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	14 /11/ 2016 / Tarih ve 67 sayılı; 1 - Doç. Dr. N. Eren İŞMAN'IN araştırma ekibinden çıkarılması 2- araştırma adının değiştirilmesi 3 - Protokol değişikliği yapılması konulu dilekçesi		
KARAR BİLGİLERİ	Düzeltilme dilekçesi incelenmiş; araştırma başvuru formu ve gerekli ekleri ile birlikte uygulanması bilimsel ve etik açıdan UYGUN olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir		
Ünvanı/Adı/Soyadı	İmza	Araştırma İle İlişkisi Olan Üye	Toplantıya Katılmayan Üye
Prof. Dr. Emin KURT Göz Hastalıkları		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Prof. Dr. Hatice MAVİOĞLU Nöroloji		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Prof. Dr. İsmet TOPÇU Anestezi ve Reanimasyon		<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kivanç GÜNHAN DEHAM Müdürü		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Ertuğrul TATLISUMAK Anatomi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Doç. Dr. Kamil VURAL Farmakoloji		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yrd. Doç. Dr. Selim ALTAN Tıbbi Etik		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yavuz DEMİR Veteriner Hekim		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Saime ÖZKARA Sivil Toplum Üyesi		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sivil Üye		<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Etik Kurulumuzun kararı yukarıda belirtilmiştir. Araştırma Başvuru Formunun Taahhütname kısmında belirtilmiş olan hususların dikkate alınarak istenilen bilgilerin Etik Kurulumuza zamanında iletilmesi konusunda bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.			
 Prof. Dr. Emin KURT Başkan			

8. ÖZGEÇMİŞ

Merve Nur EĞLENEN, 10.10.1989 yılında Gaziantep’te doğdu. İlk okulu M.Adil Kasapseçkin İlköğretim Okulunda, lise eğitimini ise İstanbul İstek Acibadem Fen Lisesi’nde birincilikle tamamladı. 2012 yılında Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nden iyi derece ile mezun oldu. 2013 yılından itibaren Gaziantep Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ortodonti Ana Bilim Dalı’nda uzmanlık eğitimini sürdürmektedir.

Hobileri Scuba diving (SSI- Open Diver), Piyano, yüzme, pilates, fotoğrafçılık, sinema, seyahat.

Üye Olduğu Dernekler ve Meslek Kuruluşları: European Orthodontics Society, Türk Ortodonti Derneği, Dudak Damak Yarıkları Derneği