



ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKAFERD KAN DURDURUCU' NUN SIÇANLARDA  
OLUŞTURULAN PERİODONTAL DEFEKTLERİN  
REJENERASYONUNA ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Şevki GÜLER**

**Samsun  
Mayıs-2016**





ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**ANKAFERD KAN DURDURUCU'NUN SIÇANLARDA  
OLUŞTURULAN PERİODONTAL DEFİKTLERİN  
REJENERASYONUNA ETKİSİ**

**DOKTORA TEZİ**

**Şevki GÜLER**

**Danışman**

**Prof. Dr. Burcu ÇETİNKAYA**

**Samsun**

**Mayıs-2016**

T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Şevki GÜLER tarafından Prof. Dr. Burcu ÇETİNKAYA danışmanlığında hazırlanan “Ankaferd Kan Durdurucu'nun Sıçanlarda Oluşturulan Periodontal Defektlerin Rejenerasyonuna Etkisi” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 30/05/2016 tarihinde yapılan sınav ile Periodontoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. Mehmet YALIM  
Gazi Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Burcu ÖZKAN ÇETİNKAYA  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Elif Eser SAKALLIOĞLU  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Bülent AYAS  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Histoloji- Embriyoloji Anabilim Dalı

Üye : Yrd. Doç. Dr. Ferda PAMUK  
İstanbul Aydın Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji Anabilim Dalı

ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

.... / .... /.....

**Doç. Dr. Aydın HİM**  
**Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi ve tecrübesiyle bana her zaman yol gösterip destekleyen, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Burcu ÖZKAN ÇETİNKAYA'ya

Doktora eğitimim süresince bilgi ve klinik deneyimlerinden yararlandığım, bu güzel ortamda çalışmamızı sağlayan, beni evladından ayırmayan değerli hocam Prof. Dr. Gökhan AÇIKGÖZ'e,

Tüm eğitimim süresince hem klinik hem teorik bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, disiplinli ve titiz çalışmalarını örnek aldığım değerli hocam, Prof. Dr. Gonca KELEŞ'e

Çalışmalarımın yürütülmesinde bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen tüm Periodontoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyelerine,

Doktora eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum ve güzel anılar paylaştığım asistan arkadaşlarıma ve klinik çalışanlarına

Lisans ve doktora eğitimimin ilk yıllarında beni bilgi ve tecrübeleriyle aydınlatan ve destekleyen Yrd. Doç. Dr. Umut Ballı ve Yrd. Doç. Dr. Ferda PAMUK'a

Tezimin histomorfometrik incelemelerinin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Doç. Dr. Bülent AYAS'a ve Araş. Gör. Seda KIRMIZIKAN'a,

Tezimin immünohistokimyasal incelemelerinin gerçekleştirilmesindeki katkılarından dolayı Prof. Dr. Yavuz GÜLBAHAR'a, Yrd. Doç. Dr. Yonca KABAK'a

Verilerimin istatistik analizinde göstermiş olduğu yardımlarından dolayı Prof. Dr. Sevgi CANBAZ'a ve Prof. Dr. Mehmet ÇETİNKAYA'ya

Tüm hayatım boyunca olduğu gibi doktora eğitimim süresince de sonsuz sevgilerini ve özverilerini bir an bile eksik etmeden, maddi ve manevi destekleriyle bana her zaman güç veren anne ve babam Serpil & Hamdi GÜLER ve canım abim Dr. Dt. Buğra GÜLER'e

Üniversite hayatımın ilk gününden beri aynı yolda beraber yürüdüğüm, hayatın her alanında olduğu gibi tez dönemimde de desteğini eksik etmeyen, biricik eşim Dr. Dt. Derya GÜLER'e ve varlığı ile hayata umutla bakmamı sağlayan oğluma

Teşekkürlerimi borç bilirim.

\*Bu araştırma projesi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı'na PYO.DIS.1904.14.002 numarasıyla desteklenmiştir.

## ÖZET

### ANKAFERD KAN DURDURUCU'NUN SIÇANLARDA OLUŞTURULAN PERİODONTAL DEFEKTLERİN REJENERASYONUNA ETKİSİ

**Amaç:** Çalışmamızın amacı; sıçanlarda oluşturulan fenestrasyon defektlerine uygulanan Ankaferd Kan Durdurucu (AKD)'nin periodonsiyum üzerine olan etkilerini histomorfometrik ve immünohistokimyasal olarak değerlendirmek ve etkinliğini Emdogain (EMD) ile karşılaştırmaktır.

**Materyal ve Metot:** 54 adet Wistar sıçan 6 eşit gruba ayrıldı; AKD-10: 10 gün AKD, EMD-10: 10 gün EMD, Kontrol-10: 10 gün Distile su, AKD-38: 38 gün AKD, EMD-38: 38 gün EMD, Kontrol-38: 38 gün Distile su. Akut fenestrasyon defekti oluşturulup defekt bölgesine AKD, EMD ve distile su uygulanarak hayvanlar sakrifiye edildi. Histomorfometrik inceleme kapsamında defekt alanı, yeni kemik alanı, yüzdesi, yeni sement ve trabeküler kemik alanı hesaplandı. İmmünohistokimyasal inceleme kapsamında ise Osteopontin ve Kollajen-3 ekspresyonu semikantitatif olarak değerlendirildi.

**Bulgular:** 10 günlük deney gruplarının kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı daha fazla yeni kemik alanı ve yüzdesine sahip olduğu görülürken( $p<0.05$ ); 38 günlük gruplardan sadece EMD-38 grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı fazlalık bulundu( $p<0.05$ ). Yeni sement ve trabeküler kemik alanınınında AKD grubunda kontrol grubuyla benzer olduğu saptandı( $p>0.05$ ). İmmünohistokimyasal değerlendirme kapsamında AKD-10 grubunda Kollajen-3 ve Osteopontin immünreaktivitesinin kontrol grubuna göre daha fazla olduğu görüldü( $p<0.017$ ). AKD-38 grubunun ise hiçbir dokuda kontrolden farklı olmadığı saptandı( $p>0.017$ ).

**Sonuç:** Çalışmamızın sonuçları Ankaferd Kan Durdurucunun erken dönem iyileşmede etkili bir ajan olduğu fakat bu etkisini uzun dönem devam ettiremediğini düşündürmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ankaferd Kan Durdurucu, Emdogain, Fenestrasyon Defekti, Histomorfometri, Kollajen-3, Osteopontin.

Şevki GÜLER, Doktora Tezi  
Ondokuz Mayıs Üniversitesi - Samsun, Mayıs-2016

## ABSTRACT

### THE EFFECT OF ANKAFERD BLOOD STOPPER ON THE REGENERATION OF PERIODONTAL DEFECTS IN RATS

**Aim:** Our aim is to evaluate the efficacy of histomorphometrically and immunohistochemically in rat fenestration defects and to compare this effect with Emdogain

**Material and Method:** Fifty four wistar rats were equally divided into 6 group as; ABS-10 group: ABS 10 days, EMD-10 group: EMD 10 days, Control-10 group: Distilled water 10 days, ABS-38 group: ABS 38 days, EMD-38 group: EMD 38 days, Control-38 group: distilled water 38 days. After ABS, EMD and distilled water were applied to the acute fenestration defects the rats were sacrificed. Histomorphometric analysis included the measurements of new bone area, new bone percentage, new cementum and new trabecular bone area. Immunohistochemical analysis included the determination of Osteopontin and Collagen-3 expression semi-quantitatively.

**Results:** The percentage and the area of new bone were statistically higher in 10 day ABS and EMD groups compared to control ( $p<0.05$ ) while the parameters were significantly higher only in EMD-38 group compared to control ( $p<0.05$ ). New cementum and new trabecular bone area were statistically similar in ABS-38 group compared to control ( $p>0.05$ ) whereas there were significant differences between EMD-38 and control in these parameters. Collagen-3 and Osteopontin immunoreactivity were statistically higher in ABS-10 group compared to control ( $p<0.017$ ) while there were no significant differences in these immunoreactivities between ABS-38 and control ( $p>0.017$ )

**Conclusion:** The results of our study suggest that ABS seems to be an effective agent in short term healing whereas this efficacy is decreased in long term healing period.

**Keywords:** Ankaferd Blood Stopper, Collagen-3, Emdogain, Fenestration defect, Histomorphometric, Osteopontin.

Şevki GÜLER, Ph. D. Thesis  
Ondokuz Mayıs University - Samsun, May-2016

## SİMGELER ve KISALTMALAR

<b>AKD</b>	: Ankaferd Kan Durdurucu
<b>EMD</b>	: Emdogain
<b>MMP</b>	: Mine Matriks Proteini
<b>OPN</b>	: Osteopontin
<b>PL</b>	: Periodontal Ligament
<b>PGA</b>	: Propilen Glikol Aljinat
<b>SABK</b>	: Strept Avidin Biotin Peroksidaz Kompleks
<b>YDR</b>	: Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu





## İÇİNDEKİLER

<b>TEŞEKKÜR</b> .....	III
<b>ÖZET</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>SİMGE ve KISALTMALAR</b> .....	VI
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	VII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	5
2.1.Periodonsiyum.....	5
2.2.Kemik Dokusu.....	7
2.2.1.Kemik Defektleri.....	10
2.2.2.Kemik Greft Materyalleri.....	12
2.3.Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu.....	15
2.4.Doku Mühendisliği.....	17
2.5.Mine Matriks Proteinleri.....	18
2.5.1.MMP ile İlgili Deneysel Çalışmalar.....	21
2.5.2.MMP ile İlgili Klinik Çalışmalar.....	22
2.6.Ankaferd Kan Durdurucu.....	26
2.7.Ekstraselüler Matriks Proteinleri .....	28
2.7.1.Kollajen.....	28
2.7.2.Osteopontin.....	30
2.8.Araştırmanın Amacı.....	31
<b>3. MATERYAL VE METOT</b> .....	32
3.1. Araştırma Protokolü.....	32
3.2. Defektlerin Oluşturulması ve Tedavisi.....	32
3.3. Histopatolojik İnceleme.....	34
3.4. Histomorfometrik İnceleme.....	36
3.5. İmmünohistokimyasal İnceleme.....	37
3.6. İstatistiksel İnceleme.....	38
<b>4. BULGULAR</b> .....	39
4.1. Histomorfometrik Bulgular.....	39
4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular.....	44

<b>5. TARTIŞMA</b> .....	56
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	69
<b>KAYNAKLAR</b> .....	71
<b>EKLER</b> .....	88
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	90



## 1.GİRİŞ

Periodontitis; spesifik mikroorganizma veya spesifik mikroorganizma gruplarının neden olduğu, ilerleyen Periodontal ligament (PL) ve alveol kemiği yıkımıyla birlikte periodontal cep oluşumu, dişeti çekilmesi veya her ikisinin birlikte görüldüğü diş destek dokularının kronik inflamatuvar bir hastalığı olarak tanımlanmaktadır (Newman ve ark., 2007). Primer etyolojik faktör olarak mikrobiyal dental biyofilmin yer aldığı periodontal hastalık patogenezinde birçok faktör rol oynamaktadır. Bu faktörler konak savunma sistemini etkileyerek periodontitisin karakteristik özelliği olan doku yıkımına neden olurlar (Newman ve ark., 2007). Tedavi edilmediği takdirde ilerleyen destek doku yıkımı dişin kaybedilmesine neden olabilir (Bartold ve ark, 2000a). Çağdaş periodontal tedavinin amacı hastalığın ilerlemesini kontrol altına almak, kaybedilen diş destek dokularının rejenerasyonu ile hastanın doğal dentisyonunu en rahat, fonksiyonel ve estetik şekilde korumak ve idame ettirmektir (Pitaru ve ark, 1994; Wang ve Greenwell, 2001; Carranza ve ark, 2002; Pilstrom ve ark, 2005; Bartold ve ark, 2006).

Periodontal rejenerasyon; hastalık sonucu hasara uğramış periodonsiyumun tüm bileşenlerinin orijinal form ve fonksiyonunun yeniden yapılanmasını sağlayan karmaşık bir süreçtir (Garrett, 1996; Annunziata ve ark, 2005). Rejeneratif periodontal tedavilerin amacı alveol kemiği ve sementin rejenerasyonunu ve yeni bir fonksiyonel PL gelişimini indüklemektir (Wang ve Carroll, 2000; Camargo ve ark, 2002; Carranza ve ark, 2002). Günümüze kadar hasar görmüş periodonsiyumun tedavisi ile ilgili pek çok yöntem uygulanmıştır. Kimyasal maddelerle kök yüzeyi preparasyonu, çeşitli greft materyalleri (otojenik, allojenik ve ksenojenik), fiziksel bariyer yöntemleri, polipeptid büyüme faktörleri ve ataşman faktörleri periodonsiyumun rejenerasyonunu sağlamak amacıyla kullanılmaktadır (Garrett, 1996; Bartold ve ark., 2000b). Kök yüzeyine kimyasal madde uygulanması bazı araştırmalarda başarılı bulunsa da rejenerasyon sağladığı kanıtlanmamış, ayrıca bu yöntemin sıklıkla ankiloz ve kök rezorpsiyonuna neden olduğu ileri sürülmüştür (Polson ve Proye, 1983; Marks ve Mehta, 1986; Claffey ve ark, 1987; Wikesjö ve ark., 1988). Rejenerasyon amacıyla kullanılan allogreftler, ksenogreftler ve alloplastikler; defekt hacminin doldurulması için uygun olsalar da çok az osteoindüktif aktiviteye sahiptirler, yeni sement ve PL oluşumunu indükleme

kapasiteleri düşüktür, organizmaya yabancıdır ve immün cevap oluşturabilme riskleri vardır (Bartold ve ark., 2000a; Carranza ve ark, 2002). Bu greft materyalleri uygulandığında ayrıca birleşim epitelinin greft ve diş yüzeyi arasına göç ettiği ve gerçek rejenerasyonu engellediği de gösterilmiştir (Dragoo ve Sullivan, 1973). Greft materyalleri içerisinde otojen kemik en ideali olarak kabul edilmektedir (Marx, 1994). Ancak otojen greftlerin bir verici bölgeye ihtiyaç duyması, bu bölgedeki kemiğin yetersiz hacmi, greft uygulanan dişte görülebilen ankiloz, greftin hızlı rezorpsiyonu, kök rezorpsiyonu gibi dezavantajları vardır ve klinik kullanımları sınırlıdır (Laurie ve ark, 1984; Sommers ve Eisenstein, 1984; Younger ve Chapman, 1989).

Kemik greft materyallerinin rejeneratif kapasitesinin sınırlı oluşu yeni araştırmalara öncülük etmiştir. Yönlendirilmiş doku rejenerasyonunun (YDR) temelleri 1970'li yıllarda atılmıştır. İlk olarak Melcher 1976 yılında, periodontal cerrahi uygulamasını takiben, yara bölgesini dolduran hücrelerin (epitel, bağ dokusu, alveol kemiği ve periodontal membrandan kaynaklanan hücreler), meydana gelecek iyileşmenin niteliğini belirleyeceğini öne sürmüştür. Bu tarihten sonra, Caton ve ark. (1980) ve Nyman ve ark. (1982a) periodontal dokuların geleneksel tedavi yöntemlerinden sonraki iyileşmesini incelemek amacıyla deney hayvanlar üzerinde bir dizi araştırma yapmışlar ve iyileşmenin uzun birleşim epiteliyle sonuçlandığı saptamışlardır. Bunun üzerine Nymann ve ark. (1982b) yaptıkları klinik çalışmada çekim endikasyonlu tek köklü bir dişin kök yüzeyinde bir defekt oluşturup bu bölgeye milipor filtre membran uygulayarak bağ dokusu ve epitel hücrelerinin yara bölgesi ile ilişkisini kesmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda defekt bölgesinin iyileştiği ve yeni sement oluştuğunu gözlemişlerdir.

Periodontal cerrahi sonrasında, iyileşme sırasında ortama hakim olan hücre tipleri oluşacak olan yeni dokuları belirler. Bu hücrelerin proliferasyon hızları birbirinden farklıdır. Epitel ve bağ dokusu hücreleri süratle çoğalarak ortama hakim olduğundan proliferasyon hızı düşük olan PL ve kemik hücrelerinin rejenerasyonuna izin vermezler. İyileşme yumuşak dokuların bölgeyi doldurarak tamir etme çabalarıyla sonuçlanır (Melcher, 1970). Karring ve ark. (1985)'nin epitelin yara bölgesine proliferasyonu engellendiğinde, periodontal dokuların rejenere olup olamayacağını inceledikleri deneysel çalışmada, epitelle birlikte bağ dokusunun da yara bölgesinden uzaklaştırılması gerektiği vurgulanmıştır. Tüm bu öncü çalışmalar sonucunda; epitel

kaynaklı hücrelerin uzun birleşim epiteli oluşumu ile iyileşme sağladığı, bağ dokusu kaynaklı hücrelerin kök yüzeyinde bağ dokusu adezyonuna veya kök rezorpsiyonuna yol açtığı, alveol kemiği kaynaklı hücrelerin ankiloz veya kök rezorpsiyonu ile iyileşme sağladığı, PL kaynaklı hücrelerin ise kök yüzeyinde yeni sement ve sementle alveol kemiği arasında uzanan kollajen liflerle yeni ataşman oluşumu ile iyileşme gerçekleştirdiği görülmüştür (Gottlow ve ark., 1986; Karring ve ark., 1993). Günümüzde YDR uygulamasının uygun vakada ve uygun defektlerde rejenerasyon amacıyla başarıyla kullanıldığı bilinmektedir.

Daha sonraki yıllarda doku mühendisliğinin amaçları ile diş oluşumu/gelişimi sırasında meydana gelen hücresel olaylarla ilgili mevcut bilgiler birleştirildiğinde periodontal rejenerasyonun sağlanabilmesi için farklı bir fikir ortaya atılmıştır. Bu felsefeye göre odontogenez sırasında rol oynadığına inanılan spesifik faktörlerin rejeneratif periodontal tedavide kullanımı gündeme gelmiştir. Bu spesifik faktörlerden biri de Mine Matriks Proteinleri (MMP) türevleridir. MMP türevlerinin sement oluşumuna öncülük ettiği, PL ve kemik dokusunu oluşturmak için sinyaller gönderdiği ifade edilmiştir (Hammarstrom, 1997; Cochran ve Wozney, 1999; Spector, 1999).

Hertwig Epitel Kınından kaynağını alan mineyle ilişkili proteinler kök gelişimi sırasında hücresiz sement oluşumunda rol almaktadırlar. Bu proteinler aynı zamanda embriyogenez süresince PL ve alveol kemiği yapımında da görev yapmaktadırlar (Oringer, 2002). Araştırmalarda haricen kullanılan MMP türevlerinin tüm periodontal dokuların rejenerasyonunu uyardığı, sement, alveol kemiği ve PL yapımının aynen doğal oluşum sürecindeki gibi taklit edildiği, bu mekanizmanın temelinde de gelişim esnasında PL'deki matriks hücre ilişkileri çerçevesinde ortaya çıkan MMP'lerin özellikle de amelogenin birikiminin olduğu savunulmuştur (Hammarström ve ark., 1997). MMP'ler piyasaya Emdogain (EMD) (1997) ve Xelma (2004) ticari isimleriyle sunulmuştur.

Ankaferd Kan Durdurucu (AKD), Glycrrhiza Glabra (meyan), Vitis Vinifera (koruk), Alphina Officinarum (havlıcan)'un kurutulmuş yaprak ekstreleri, Urtica Dioica (ısırgan)'ın kurutulmuş kök ekstresi ve Thymus Vulgaris (kekik)'in kurutulmuş ot ekstrelerini içeren, Türk tıbbında hemostatik ajan olarak kullanılan ilk bitkisel ekstrattır. Bu bitkisel karışımın kanama durdurucu etkisinin haricinde damar endoteli, kan hücreleri, anjiyogenez, hücre proliferasyonu üzerine etkileri vardır. Bununla birlikte

anti-inflamatuar özelliğe sahip olduğu bildirilmektedir. Literatürde AKD'nin kanama durdurucu etkilerini konu alan çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen yukarıda sayılan diğer özelliklerinin araştırıldığı çalışma sayısı azdır (Goker ve ark., 2008; Arslan ve ark., 2009; Huri ve ark., 2009; Teker ve ark., 2009; Arpacı, 2010; Huri ve ark., 2010; Akarsu ve ark., 2011; İşler ve ark., 2011). Ajanın kemik dokusu iyileşmesi üzerine etkilerini inceleyen çalışmalar bulunmaktadır. AKD'nin erken dönem kemik doku iyileşmesi üzerindeki etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, yeni kemik yapımını anlamlı derecede arttırdığı, iltihap ve nekroz oranlarını anlamlı derecede düşürdüğü, sonuç olarak AKD'nin erken dönem kemik doku iyileşmesini olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Demircan ve ark., 2008). AKD'nin hücrel ve vasküler proliferasyon üzerindeki kombine etkisiyle ilgili yapılmış çalışmalarda, doku beslenmesini arttırdığı, ciltte açılan fleplerde nekroz oranını anlamlı biçimde azalttığı bildirilmiştir (Karasoy Yeşilada ve ark., 2008).

Araştırdığımız ölçüde AKD'nin periodontal doku iyileşmesi üzerinde etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ajanın anjiogenez ve hücre proliferasyonunu arttırıcı özelliklerinden hareketle deneysel olarak oluşturulan periodontal defektlerin rejenerasyonuna etki gösterebileceği çalışmamızın hipotezini oluşturmaktadır.

Çalışmamızın amacı; sıçanlarda oluşturulan fenestrasyon defektlerinde AKD'nin periodontal doku iyileşmesi üzerine etkili olup olmadığını histomorfometrik ve immünohistokimyasal yöntemlerle bir MMP olan Emdogain ile karşılaştırmalı olarak incelemek ve bu ajanın periodontal rejenerasyonu sağlayabilecek alternatif bir materyal olup olmayacağını değerlendirmektir..

## 2. GENEL BİLGİLER

Periodonsiyum; dişeti, periodontal ligament (PL), kök yüzeyini kaplayan sement ve alveol kemiğinden oluşan dokular bütünüdür. Bu dokularda meydana gelen hastalıklar periodontal hastalık olarak isimlendirilir (Lindhe ve ark., 2008). Periodontal hastalık, spesifik mikroorganizma veya mikroorganizma gruplarının neden olduğu aktif yıkım ve remisyon dönemleri gösteren, dişin vaskülarize destek dokularında kronik inflamasyon ve yıkım ile karakterize multifaktöryel bir hastalıktır (Goodson ve ark., 1982; Booth ve ark., 1998). Dünya Sağlık Örgütü tarafından periodontal hastalıklar tüm toplumlarda görülen ve oldukça yaygın olan önemli bir hastalık grubu olarak tanımlanmaktadır (Petersen, 2003). Periodonsiyumun sağlıklı olması, sağlıklı mikro yapının korunması ve bileşenlerinin birbirleriyle uyum içerisinde olması ile sağlanabilir. Periodontal hastalığın bir çeşidi olan periodontitis; kök sementi, alveol kemik, PL ve dişeti olarak adlandırılan diş destek dokularının geri dönüşümsüz bir biçimde yıkımı ile karakterizedir (Reynolds ve Meikle, 1997; Çağlayan, 2010).

Periodontal tedavinin amacı; patojen mikroorganizmaların neden olduğu dişeti iltihabının ortadan kaldırılması, hastalık sonucu kaybedilen destek periodontal dokuların hastalık öncesi konumunda yeniden oluşturulması, cep derinliklerinin azaltılmasıyla ağız hijyeninin idamesinin kolaylaştırılması ve hastanın sağlıklı ve fonksiyonel olarak kendi doğal dişlerinin ağızda tutulmasının sağlanmasıdır (Wang ve MacNeil, 1998; Carranza ve Takei, 2006). Cerrahi olmayan periodontal tedavi olarak da bilinen Faz I periodontal tedavi, periodontal hastalıkların mikrobiyal etiyojisini ve hastalık oluşumuna katkıda bulunan faktörleri ortadan kaldırmayı amaçlamaktadır. Cerrahi periodontal tedavi olarak da bilinen Faz II periodontal tedavi ise, inflamasyonun kontrolü, Faz I periodontal tedavi ile yok edilemeyen patolojik cebin eliminasyonu ve kaybedilen periodontal dokuların rejenerasyonunun sağlamayı hedefler (Çağlayan, 2010; Carranza, 2012).

### 2.1. Periodonsiyum

Periodonsiyum; dişeti, PL, kök yüzeylerini kaplayan sement ve alveol kemiği gibi dişleri destekleyen dokulardan oluşmaktadır. Periodontal dokular; yerleşimleri, doku özellikleri, hücresel ve kimyasal kompozisyonları açısından farklı olmalarına rağmen, tek bir ünite gibi birlikte görev yaparak dişlere destek sağlarlar (Bartold ve

ark., 2000). Dişeti, dişlerin alveol çıkıntılarını ve boyun kısımlarını çevreler ve anatomik özelliklerine göre serbest dişeti, yapışık dişeti ve interdental dişeti olmak üzere üç bölüme ayrılır. Serbest dişeti, dişleri bir yaka gibi saran ancak dişetin diş ile bağlantısı olmayan servikal bölümüdür. Yapışık dişeti, serbest dişeti olduğundan başlayarak mukogingival birleşime kadar uzanan alveol kemiğinin periostuna sıkıca tutunan bölümdür. İnterdental dişeti ise, dişlerin kontakt noktalarının altındaki alanı dolduran dişeti bölümüdür (Fiorellini ve ark., 2007). Dişeti, merkezde bağ dokusu ve onu çevreleyen çok katlı yassı epitelden oluşur. Epitel dokusu, morfolojik ve fonksiyonel özelliklerine göre; oral epitel, sulkuler epitel ve birleşim epiteli olmak üzere üç bölüme ayrılır. Dişeti epitelinin temel hücreleri keratinositler olup, keratinosit olmayan langerhans hücreleri, merkel hücreleri, melanositler ve enflamatuar hücreler de bulunur. Epitelin en önemli fonksiyonu dişi bir yaka tarzında çevrelemek ve daha derin periodontal dokuları korumaktır. Bu durum keratinositlerin proliferasyonu ve farklılaşması ile sağlanır. Epitelin bazal tabakasında keratinositler mitozla proliferer olur. Suprabazal tabakalarda ise mitoz nadir görülür. Prolifere olan hücreler çoğunlukla daha üst tabakalara göç ederken, çok az bir kısmı proliferer olduğu yerde kalır. Farklılaşma ise keratinizasyon adı verilen ve bazal tabakadan göç eden hücrelerde meydana gelen biyokimyasal ve morfolojik olaylar zinciridir (Fiorellini ve ark., 2007). Oral epitel, serbest dişeti ile yapışık dişeti yüzeyini kaplayan keratinize epiteldir. Sulkuler epitel, serbest dişeti kenarından birleşim epiteline kadar uzanan ve gingival sulkusun yumuşak duvarını örten, keratinize olmayan çok katlı yassı epiteldir. Morfolojik ve kimyasal özelliklerine rağmen, eğer oral kaviteye açılırsa veya sulkustaki bütün bakteriler elimine edilirse sulkuler epitelin keratinize olabilme potansiyeli vardır. Bunun aksine oral epitel, eğer dişle temas ederse keratinize olma özelliğini kaybeder. Sonuç olarak sulkustaki lokal irritasyon sulkus keratinizasyonunu engellemektedir. Birleşim epiteli gingival sulkusun tabanından apikale doğru kısa bir mesafede uzanan keratinize olmayan çok katlı yassı epiteldir. Birleşim epitelinin diş yüzeyine yapışmasına dişeti fibrilleri destek olmaktadır (Fiorellini ve ark., 2007).

Periodontal ligament ise kompleks vasküler ve sellüler bağ dokudan oluşur, diş köküyle alveol kemiğinin iç duvarı arasındaki bağlantıyı kurar. Genişliği 0,2 mm denmesine rağmen değişim gösterebilir. Periodontal boşluk fonksiyonda olmayan ya da erüpe olmamış dişlerde azalırken aşırı fonksiyon gösteren dişler de artar. Ligament



hacminin yaklaşık %70'i yoğun bağ dokusundan oluşur. Geriye kalan %30'luk kısım ise gevşek bağ dokusunu çevreleyen damarlar, sinirler ve lenflerden oluşur. Bu iki ayrı doku arasındaki denge enflamasyonla değişir. Enflamasyon hücrelerindeki gevşek bağ dokusundaki artışı ile bitişikteki yoğun bağ dokusu bozularak gevşek bağ dokusu miktarı artar (Lindhe ve ark., 2008).

Sement kök yüzeyini kaplayan mineralize bir dokudur ve kemik dokusuyla benzer özelliklere sahiptir. Sementte kan damarları, lenf damarları ve innervasyon yoktur. Fizyolojik resorbsiyon ya da remodeling de yoktur. Ancak yaşam boyu depozisyon devam eder. Sement organik matrikse gömülmüş Kollajen fiberlerden oluşur. İçeriğinin %65'inde hidroksiapatit minerali bulunur. Sement PL fibrillerinin köke ataşmanını sağlar ve hasarlı kök yüzeyinin tamirinde görev alır (Lindhe ve ark., 2008).

## **2.2. Kemik Dokusu**

Kemik dokusu, yapısında bulundurduğu farklı hücrelerin ve ara maddenin üzerine organik ve inorganik tuzların çökeldiği, bu sayede sağlamlık, esneklik gibi fiziksel özellikler kazanmış olan ileri derecede özelleşmiş bir bağ dokusu türüdür (Guyton ve Hall, 2007). Gelişimini tamamlamış kemik dokusu dişin mine tabakasından sonra dentin ile birlikte vücudun en sert dokusudur (Cirelli, 1999). Kemik, vücudun iskelet yapısını oluşturarak dokulara destek olan, yüzeyinde tutunan kaslarla birlikte vücudun hareketliliğini sağlayan beyin, omurilik ve iç organları koruyan, vücuttaki başlıca kan yapıcı doku olan kemik iliğini barındıran ve metabolizmadaki bir çok süreç için gerekli olan kalsiyum, fosfor, sodyum ve magnezyumu depolayan sert bir dokudur (Bancroft, 1996; Junguera ve ark., 1998; Gartner, 2001). Bunların yanı sıra kemik kendisini yapısal olarak tamir edebilen kütle, şekil ve yapısal özelliklerini mekanik gereksinimler doğrultusunda uyarlayabilen ve yaşam süresince istemli fiziksel aktivitelere direnç ve destek sağlayan bir sistemin temel ögesidir (Jee, 2001).

Eklem yüzeyleri dışında, tüm kemikler periost ile çevrelenmiştir. Periost kemiğe Sharpey lifleri aracılığıyla tutunur. Periost iki katmandan oluşur; periostun üst tabakası yoğun ve fibröz bağ dokusundan, kemiğe bakan alt tabakası ise kemik progenitör hücrelerden oluşur. Kemik iliği boşlukları tek tabakalı kemik progenitör hücrelerden ve osteoblastlardan oluşan endosteum ile döşenmiştir (Bancroft, 1996;

Gartner, 2001). Kemik dokusu kimyasal olarak incelendiğinde %65'ini mineral yapı, %25'ini organik matriks ve %10'unu su oluşturmaktadır. İnorganik maddelerin içeriğinde özellikle kalsiyum ve fosfat oranı yüksektir. Röntgen ışını difraksiyon yöntemi ile yapılan çalışmalarda kalsiyum ve fosforun  $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_{12}$  kompozisyonunda birleşerek hidroksiapatit kristallerini meydana getirdikleri görülmüştür (Meade ve ark., 1984; Young ve Heayh, 2000). Organik kısmın %90'ını Tip-I kollajen oluşturmaktadır. Kalan %10'luk kısımda ise matriks proteinleri, minör kollajen tipleri, lipidler ve diğer makro proteinler bulunmaktadır (Arun ve ark. 2004).

Kemik mikroskopik düzeyde incelendiğinde primer kemik dokusu ve sekonder kemik dokusu olmak üzere iki kemik tip vardır. Primer kemik; embriyonel gelişim sürecinde, kırık iyileşmesi ve onarım aşamalarında çok hızlı bir şekilde oluşan kemik dokusudur (Junqueira ve Carneiro, 2009). Organize olmamış bir yapıda olduğundan oldukça yumuşak ve dayanıklılığı azdır. Mineral içeriği az olduğundan röntgende fark edilemez. İyileşme sırasında sıklıkla Faz-1 kemik olarak bahsedilen kemik, woven kemiktir. Lameller kemiğe oranla daha fazla osteosit içerir (Junguera ve ark., 1998). Sekonder kemik ise; yetişkinlerde bulunan kemik dokusudur. Kompakt (kortikal) ve Spongioz (kansellöz) kemik olmak üzere 2 tiptir. Hemen hemen bütün kemiklerde bu iki dokuyu görmek mümkündür. Bir kemiğin dışı daima kompakt kemikten yapılmıştır. Spongioz kemik doku ise iç kısımlarda bulunur.

Kemiği oluşturan temel hücreler osteoprogenitör hücreler, osteoblastlar, osteoklastlar, osteositler ve kemik iliği hematopoetik elemanlarından oluşur (Christensen ve ark., 1994).

Osteoprogenitör hücreler; sekonder kemik dokusunun dış yüzünü örten periostun derin tabakasında, internal meduller yüzeyleri örten endosteumda bununla birlikte büyüyen kemiklerin metafizindeki kıkırdak matriksin trabeküllerinde ve Havers ve Volkmann kanallarının yüzeyinde bulunurlar. İnaktif durumda bulduklarında morfolojik olarak tanımlanmaları zordur (Amsellem ve ark., 1987; Christensen ve ark. 1994; Sikavitsas ve ark., 2001). Fonksiyonel olarak kemik yapıcı öncü hücrelerdir ve mitoz bölünme ile çoğalarak osteoblast ve osteoklastlara farklılaşırlar.

Osteoblastlar 20-50  $\mu m$  çapında kemik oluşumundan sorumlu tek çekirdekli hücrelerdir (Bain ve ark., 2010). Osteoblastlar kemik matriksinin organik bileşenlerinin (Tip-I kollajen, proteoglikanlar, glikoproteinler) yapımından sorumlu olan hücrelerdir

(Mundy, 1999; Junqueira ve ark., 2009). Osteoblastlar yeni sentez edilmiş matriks ile sarıldığında, osteosit adını alırlar (Junqueira ve ark. 2009). Kemiğin inorganik kısımlarının yapılabilmesi için canlı osteoblastlara ihtiyaç vardır. Osteoblastlar daha önceden sentezlenen kemik matriksi ile temas halindeki hücre yüzeylerinden salgılanan matriks elemanları, osteoblastlar ile kemik arasında kemiğe güç ve dayanıklılığını kazandıran osteoid adı verilen yeni matriks tabakasını oluştururlar. Osteoidler henüz mineralize olmamış kemiklerdir (Amsellem ve ark., 1987; Sikavitsas ve ark., 2001; Junqueira ve ark. 2009). Osteoblastlar matriksin tüm organik bileşiklerini sentezlemeleri yanında, paratiroid hormonu için gerekli reseptörleri de sentezler ve kemikte gerçekleşecek olan mineralizasyona katılırlar (Öber ve İzzetoğlu, 2006).

Osteoblastlardan kaynak alan osteositler kemik matriksi lamelleri arasında bulunan lakünalar içinde hapsolmuş şekilde yer alır (Junqueira ve ark., 1998). Dolayısıyla osteositler, olgun kemikteki esas hücrelerdir. Her ne kadar bu hücreler protein sentezi açısından daha az aktif görünseler de bu, onların metabolik olarak hareketsiz olduklarını göstermez (Akay, 2001). Şekil olarak içinde hapsoldükleri lakün adı verilen boşluklara uyan osteositler sitoplazmik uzantılara sahiptirler ve kanalikuli adı verilen küçük kanalcıklar sayesinde diğer osteositlerle ve kan damarlarıyla ilişkidirler. Bu durum, kemiğin kalsifiye olmuş matriksi içerisinde gömülü kalmış olan bu hücrelerin kan yoluyla gelen hormonlarla nasıl uyarılabildiğini ve bunlara hücrelerin nasıl yanıt verdiğini açıklamaktadır (Amsellem ve ark., 1987; Christensen ve ark., 1994; Skavitsas ve ark., 2001). Bu hücreler hücre dışı kalsiyum ve fosfor seviyelerinin kontrolüne katkıda buldukları gibi; hücreler arası etkileşim sayesinde lokal uyarılara yanıt olarak gelişen yeniden şekillenme (remodelasyon) olayında da rol oynarlar (Christensen ve ark., 1994) (Amsellem ve ark., 1987; Christensen ve ark., 1994; Sikavitsas ve ark., 2001; Arpacı, 2010).

Osteoklastlar; hormonal ve hücrel mekanizmalar tarafından kontrol edilen, kemik rezorbe edici ve çok çekirdekli, 30-100 mikron büyüklüğünde dev hücrelerdir. Osteoklastlar kemik matriksini etkileyen asit, kollajenaz ve diğer proteolitik enzimleri salgılar. Böylece kalsifiye olmuş temel maddeyi serbest hale getirirler ve kemik rezorbsiyonu sırasında meydana gelen artıkların ortadan kaldırılmasını sağlarlar (Christensen ve ark., 1994; Junqueira ve ark., 1998; Cireli 1999). Osteoklastlar, osteoblastlarla birlikte mekanik streslere bağlı olarak kemiğin yeniden şekillenmesine,

esneme etkinliğini en iyi şekilde yapabilmesine olanak verirler. Kalsiyumun kemik dokusundan kan dolaşımına salınmasında aktif rol oynarak, kalsiyum derişiminin hemostatik düzenlemesine yardımcı olurlar (Amsellem ve ark., 1987; Christensen ve ark., 1994; Sikavitsas ve ark., 2001).

### **2.2.1. Kemik Defektleri**

Periodontal kemik defektlerinin, varlığının ve morfolojisinin klinik teşhisi, günümüzde ana güçlüklerden biridir. Primer olarak ataşman seviyesinin değerlendirilmesiyle elde edilen klinik bilginin, intraoral radyografilerden elde edilen bilgi ile kombinasyonuyla teşhis sağlanır. Kök anatomisi ve varyasyonları, periodontal kemik defektlerinin, kısmen de interradiküler defektlerin teşhisinde önemli rol oynar. Radyografiler alveol kemiğin rezorpsiyon morfolojisinin belirlenmesinde ek bilgi sağlarlar. Ancak 3 boyutlu anatomik yapıların radyografilerle elde edilen 2 boyutlu görüntüleri, süperpozisyonlara olanak sağladığından kesin bilgi vermektan uzaktırlar. Diğer taraftan, klinik ataşman seviyesi, radyografilerden elde edilen verilerle kombine edildiklerinde, yüksek hassaslığı olan bir teşhis aracıdır ve büyük oranda kesin bilgi sağlarlar (Papapanou ve Tonetti, 2000; Çakılcı, 2007).

Goldman ve Cohen (1958)'e göre kemik defektlerinin sınıflandırılması şu şekildedir:

1. Kemik üstü (suprabony) defektler
2. Kemik altı (infrabony) defektler
  - a) Kemik içi (intrabony) defektler
  - b) İnterdental kraterler
3. İnterradiküler defektler

Rezektif cerrahi teknikler ile dişeti ile uyumlu bir kemik dokusu oluşturulur ve periodontal cebi elimine etmek amacıyla cebin kemik duvarları ortadan kaldırılır. Bununla birlikte kemikte meydana gelmiş deformite ve değişikliklerin fizyolojik şekle dönüştürülmesi için kemik yeniden şekillendirilir. Bu teknikler ile kemik içi defektlerin tedavisinde enfeksiyon kontrol altına alınıp cep derinlikleri azaltılabilir (Karring ve ark., 1985; Academy report, 2005). Bunun sonucunda tedavi sonrası kök yüzeyi ile alveol kemiği arasında uzun birleşim epiteli oluşmuş ve yeni bağ dokusu ataşmanı oluşumunun engellendiği görülmüştür. Histolojik olarak incelendiğinde rezektif cerrahi teknikleriyle

elde edilen sonuç gerçekte bir rejenerasyon değil, tamirdir (Wang ve Macneil, 1998; Karring ve ark., 2003).

Tamir ya da rejenerasyonun oluşmasında, periodontal defekte hangi tip hücrelerin göç edeceği belirleyicidir (Karring ve ark., 2000). PL'deki mezenkimal progenitör hücreler hasarlı kök yüzeyini sarar ve prolifer olursa; kemik, sement ve fonksiyonel PL rejenerasyonu oluşur (Karring ve ark., 1980). Eğer oral epitel hücresi, bağ dokusu veya kemik hücresi hasarlı kök yüzeyi ile direkt temas ederse; sırasıyla uzun birleşim epitel ile iyileşme, kök rezorpsiyonu veya ankiloz gerçekleşir (Caton ve ark., 1980). Gerçek periodontal rejenerasyonun oluşması için farklılaşmamış bağ dokusu hücrelerinin osteoblastlara ve sementoblastlara dönüşmesi, yeni bağ dokusu ve epitelyal ataşmanın oluşması, kök yüzeyinde yeni sementin ve kemik dokusunun oluşması gerekmektedir (Cochran ve Wozney, 1999; Gottlow ve ark., 1984).

Periodontal rejenerasyonun temel hücrel mekanizmasında PL hücrelerinin göçü ve çoğalması, öncül hücrelerin sementoblast ve osteoblastlara farklılaşması ve ekstrasellüler matriksin sentezi yer alır (Bartold ve ark., 2006; Polimeni ve ark., 2006). Bu olaylar Kemik Morfojenik Proteini, polipeptit büyüme faktörü ve ekstrasellüler matriks proteinleri tarafından kontrol edilirler. Bu medyatörler de monositler, trombositler, osteoblastlar, sementoblastlar, endotel hücreleri ve PL hücreleri tarafından üretilirler. Son yıllarda periodontal rejenerasyonun sağlanabilmesi için flep operasyonu ile beraber çeşitli materyaller ve teknikler tek başlarına veya kombine olarak kullanılmıştır (Bartold ve ark., 2000; Karring ve ark., 2004; Polimeni ve ark., 2006; Yenigün, 2011).

Bu teknikler; kemik greft materyallerinin (otojen greftler, allogreftler, ksenogreftler ve alloplastikler) kullanılması, YDR tekniğinin uygulanması, biyolojik medyatörlerin (MMP, trombosit zengin plazma, büyüme faktörleri, sitokinler, kemik morfogenetik proteinleri) kullanılması ve tüm bu tekniklerin kombinasyonudur (Bartold ve ark., 2000; Karring ve ark., 2004; Polimeni ve ark., 2006; Yenigün, 2011).

### **2.2.2. Kemik Greft Materyalleri**

Rejeneratif tedaviler kemik greft materyali kullanımı ile başlar. Periodontal cerrahide “kemik grefti”, tedavi amacıyla periodontal kemik defektinin içine yerleştirilen maddeleri ifade eder (Lindhe, 1989; Carranza ve Newman, 1996). İlk

kemik grefti uygulamasına Hegedus tarafından tibiadan alınan kemik ile başlanmıştır (Rosen ve ark., 2000). Kemik grefti uygulamalarında sadece kemik defektinin dolumu değil, fonksiyonel ataşmanın rejenerasyonu, periodontal cep derinliğinin azalması beklenir (Rosenberg ve Rose, 1998).

Bu amaçlarla kullanılacak ideal bir kemik greft materyali karsinojenik ve toksik olmamalı, kök rezorpsiyonuna ve ankiloza neden olmamalı, antijenik özellik göstermemeli, enfeksiyona dirençli olmalı, yapısal olarak güçlü ve dayanıklı olmalı, kolay uygulanabilmeli ve minimal cerrahi prosedür gerektirmeli, yeni ataşman formasyonunu stimüle etmeli, osteoindüktif ve kondüktif özellikleri olmalı, kolayca elde edilmeli ve ucuz olmalıdır. Bu özelliklerin tümünü birden taşıyan ideal bir kemik greft materyali henüz mevcut değildir. Bugün uygulanan greft materyalleri aktif olarak kemik oluşturabilirler, kemik oluşumunu indükleyebilirler, kemik oluşumu için pasif yüzey ya da mekanik engel yaratabilirler (Babbush, 1998; Rosenberg ve Rose, 1998). Greftler rejenerasyonda üç temel kemik oluşum mekanizması ile rol alırlar. Bu mekanizmalar osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyondur.

Osteogenez greft materyalinin içerdiği canlı hücreler (osteoblastlar, kemik iliği kök hücreleri) ile yeni kemik oluşumunu sağlamasıdır. Bu hücrelerin kemik yapımını gerçekleştirebilmesi herhangi bir uyarandan veya çevre dokudaki olaylardan bağımsız olarak gerçekleşebilmektedir. Osteojenik hücreler, yumuşak doku içerisinde kemik oluşumunu teşvik ederken, sert doku içerisinde de daha hızlı kemik oluşumunu aktive ederler. En etkili formu yüksek konsantrasyonda kemik hücreleri taşıyan kansellöz kemiktir (Rosenberg ve Rose, 1998; Misch, 1999; Moore ve ark., 2001). Osteoindüksiyon kimyasal bir süreçtir. Greft materyalinin içerdiği biyolojik medyatörler ile çevre kemik dokusunu uyarıp yeni kemik oluşturmasıdır (Driessens ve ark., 1998; Karring ve ark., 2003; Garg, 2004a). Osteokondüksiyon ise fiziksel bir süreç olup greft materyalinin iskelet yapı oluşturarak yer tutucu özellik göstermesidir. Hücre veya biyolojik medyatörler içermez. Sadece boşluk oluşturarak osteoblastlar ve mezenkimal hücrelerin greft bölgesine tutunabilmesine yardımcı olur ve mevcut kemik yapıcı hücrelerden kaynaklı apozisyonel kemik büyümesine olanak sağlar. Kemik defektini çevreleyen yumuşak dokuların defekt içine yürümesini engeller. Yumuşak dokular içerisinde yerleştirildiklerinde kemik oluşumunu uyarmazlar. Ayrıca

mikroskobik yapısında bulunan boşluklar ve kanallar, defekt bölgesinden gelecek olan damarlanmayı ve hücre gelişimini kolaylaştırır (Karring ve ark., 2003; Garg, 2004b).

Kemik greft materyalleri (Nasr, 1999);

1. Otojenik greftler (Otogreftler)
  - a) Ağız içi (Intraoral)
  - b) Ağız dışı (Ekstraoral)
2. Allojenik greftler (Allogreftler)
  - a) Taze dondurulmuş kemik
  - b) Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
  - c) Demineralize edilmiş dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
3. Ksenojenik greftler (Ksenogreftler)
  - a) Sığır kaynaklı ksenogreftler
  - b) Mercan kaynaklı ksenogreftler
4. Alloplastik greftler (Alloplastlar)
  - a) Polimerler
  - b) Biyoseramikler (Trikalsiyum fosfat ve Hidroksiapatit)
  - c) Biyoaktif camlar olarak sınıflandırılabilir.

**Otojen kemik greftleri;** Osteojeniktirler ve farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin bulunmadığı ortamda osteoblast içerdiğinden kemik oluşturabilirler. Kemik greftleri arasında aynı anda hem osteojenik hem osteoindüktif hem de osteokonduktif etkiye sahip tek greft türüdür. Otojen kemik ağız içi ve ağız dışı bölgelerden elde edilebilir. Mandibulanın uç kısmı, gövdesi, ramus bölgesi ya da simfizis bölgesinden blok halinde alınabilir. Büyük blok greftler periodontal cerrahiden çok implant öncesi ogmentasyon amacıyla kullanılmaktadır. Daha küçük hacimde grefte ihtiyaç duyulduğunda maksiller tüber bölgesi, zigoma, ağızda mevcut toruslar, kret düzeltilmesi sırasında elde edilen kemik parçaları, çekim soketleri, implant hazırlığı sırasında ortaya çıkan kemiklerin toplanması ile elde edilebilirler (Hoexter, 2002; Arun, 2004; Spector, 2008). Ağız içinden elde edilen kortikal kemik greftleri için en iyi örnek ise “osseous koagulum” yani kortikal kemik tozları ve kanın karıştırılmasıyla elde edilen kemik pıhtısıdır. Ancak kortikal kemigin kemik yapımındaki aktivitesinin az oluşu ve kemik kaynağının sınırlı oluşu kemik pıhtısının klinikte kullanımını sınırlandırmaktadır.

Kortikal çiplerin kullanımında ise partikül büyüklüklerinin fazla oluşu uygulama ve sonuçlar açısından sınırlayıcı olmaktadır (Peter, 1997; Rosenberg ve Rose, 1998). Ağız dışı kaynaklı kemik greftleri daha sıklıkla oral- maksillofasiyal defektlerin tedavisi ile ileri derecede rezorbe olmuş maksilla ve mandibulada uygulanacak implant tedavisi öncesinde kullanılmaktadır. İliak kret, tibia ve kraniyum bölgeleri ile daha az sıklıkla kaburga ve fibuladan kemik alınabilir (Arun, 2004).

Otojen kemik grefti uygulamalarının; canlı hücre taşımaları, yüksek indüksiyon potansiyeli göstermeleri ve immun reaksiyona neden olmamalarının yanısıra, verici bölge ağrısı ve parestezisi gibi postoperatif komplikasyonlar, hastaya iki kez travma uygulanması, ilave zaman ve cerrahi prosedür gerekliliği, kök rezorpsiyonu ve ankiloza sebep olmaları ve yeterli materyalin her zaman kolaylıkla elde edilememesi gibi dezavantajları bu materyallerin kullanımını sınırlamıştır (Schallhorn, 1977; Newman ve ark., 2002; Lindhe ve ark., 2003).

**Allogreftler;** aynı türe ait farklı bireylerden elde edilen ve geçirdikleri çeşitli işlemler sonrasında uygulanmaya hazır hale getirilen greft materyalleridir. Kadavralardan elde edilen bu materyaller, geçirdikleri süreçlere göre, dondurulmuş, dondurulmuş-kurutulmuş, demineralize dondurulmuş kurutulmuş, gibi farklı gruplara ayrılmışlardır (Schwartz ve ark., 1996). Taze dondurulmuş kemikte, sadece dondurma işlemi ile hazırlandığı için osteoindüktif proteinleri korunmaktadır. Viral hastalıklara neden olan mikroorganizmaları taşıyabilecekleri için oral ve maksillofasiyal cerrahide kullanımları sınırlıdır (Mankin ve Gebhardt, 1996; Bauer ve Togawa, 2003). Dondurulmuş kurutulmuş kemik greftleri, osteokondüksiyonla iyileşirler. Ayrıca bu kemik allogreftlerinin osteoindüktif potansiyeli yoktur (Marx ve ark., 1981). Virüs taşıma olasılıkları düşük olmasına rağmen hücrel immünolojik reaksiyonlara sebep olabilmektedirler (Tuskan ve Yaltirik, 2002). Demineralize edilmiş kurutulmuş dondurulmuş kemik matriksi, kemikte mevcut olan mineral yapının ortadan kaldırılmasıyla elde edilir. Demineralize kemik allogreftleri kullanıldığında iyileşme bir osteoindüksiyon süreci ile gerçekleşmektedir (Petri, 1991; Stevenson ve ark., 1991; Pinholt ve ark., 1992; Takano ve ark., 1992). Bu işlem sırasında mekanik özelliklerde zayıflama görülür. Ancak kemik matriksinde mevcut olan Kemik Morfojenik Protein gibi proteinler meydana çıkar (Mankin ve Gebhardt, 1996).



**Ksenogreftler** ise hayvansal kaynaklı donörlerden elde edilmiş ve çeşitli işlemlerle deproteinize edilerek organik kısmı uzaklaştırılmış greft materyalleridir (Arpak ve ark.,1997). Domuz ve fare kaynaklı ksenogreftler bulunsa da sığır kaynaklı kemik en sık kullanılan heterojen greft kaynağıdır. Sığır kemiği organik komponentlerinden ayrıldıktan sonra kalsiyum matriks sterilize edilerek greft kullanıma hazır hale getirilir. Bu greft, alıcıda herhangi bir immün reaksiyona sebep olmayacak şekilde hazırlanır (Kruger, 1984). Farklı üretici firmaların uyguladığı farklı kimyasal metodlar, bugün piyasada farklı kimyasal ve biyolojik özelliklere sahip çeşitli materyallerin bulunmasına yol açmıştır. Bu greft materyali osteoindüktif özelliklere sahip değildir, yeni kemik oluşumu için bir iskelet görevi yapar, yani osteokondüktiftir (Thaller ve ark., 1993; 1994).

**Alloplastik kemik greftleri;** canlı dokulardan elde edilmeyen sentetik olarak üretilen maddelerdir. Bu amaçla biyoaktif camlar, cam iyonomerler, alüminyum oksitler, kalsiyum fosfatlar, beta trikalsiyum fosfatlar, sentetik hidroksilapatitler ve kalsiyumfosfat simanları gibi çeşitli materyaller kullanılmaktadır (Tuskan ve Yaltirik, 2002). Alloplastik greft materyallerinin kullanımının insanlarda periodontal rejenerasyona neden olabileceğini gösteren histolojik veriler yetersizdir ve hayvan çalışmaları periodontal lezyonlarda hidroksiapatit, trikalsiyum fosfat ve polimerlerin kullanımını takiben periodonsiyumun rejenere olmadığını göstermiştir (Barney ve ark., 1986; Shahmiri ve ark., 1992).

### **2.3. Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu**

Periodontal rejenerasyonun sağlanmasını hedefleyen çalışmalar 1970'li yıllarda başlamıştır. İlk olarak Melcher 1976 yılında, periodontal cerrahi uygulamasını takiben, yara bölgesini dolduran hücrelerin (epitel, bağ dokusu, alveol kemiği ve periodontal membrandan kaynaklanan hücreler), meydana gelecek iyileşmenin niteliğini belirleyeceğini öne sürmesiyle bir grup araştırmacı periodontal dokuların geleneksel tedavi yöntemlerinden sonraki iyileşmesini incelemek amacıyla hayvanlar üzerinde bir dizi araştırma yapmışlardır. Araştırmaların çoğunda iyileşmenin uzun bağlantı epiteliyle sonuçlandığı görülmüştür. Yeni bağ dokusu ataşmanı ve PL oluşumu görülmemiştir (Melcher, 1976; Caton ve ark., 1980; Nyman ve ark., 1982a). Bunun üzerine Nymann ve ark. (1982b) klinik bir çalışma yapmışlardır. Çekim endikasyonlu tek köklü bir dişin

kök yüzeyinde bir defekt oluşturup bu bölgeye milipor filtre membran uygulayarak bağ dokusu ve epitel hücrelerinin yara bölgesi ile ilişkisini kesmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda defekt bölgesinin iyileştiği ve yeni sement oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Bu çalışma bu alanda yapılan ilk klinik çalışmadır.

Periodontal cerrahi sonrasında, iyileşme sırasında ortama hakim olan hücre tipleri oluşacak olan yeni dokuları belirler. Bu hücrelerin proliferasyon hızları birbirinden farklıdır. Epitel ve bağ dokusu hücreleri süratle çoğalarak ortama hakim olduğundan proliferasyon hızı düşük olan PL ve kemik hücrelerinin rejenerasyonuna izin vermezler. İyileşme yumuşak dokuların bölgeyi doldurarak tamir etme çabalarıyla sonuçlanır (Melcher, 1970).

Yapılan bir seri deneysel çalışma sonucunda; epitel kaynaklı hücrelerin uzun birleşim epiteli oluşumu ile iyileşme sağladığı, bağ dokusu kaynaklı hücrelerin kök yüzeyinde bağ dokusu adezyonuna veya kök rezorpsiyonuna yol açtığı, alveol kemiği kaynaklı hücrelerin ankiloz veya kök rezorpsiyonu ile iyileşme sağladığı, PL kaynaklı hücrelerin ise kök yüzeyinde yeni sement ve sementle alveol kemiği arasında uzanan kollajen liflerle yeni atışman oluşumu ile iyileşme gerçekleştirdiği görülmüştür (Karring ve ark., 1985; Gottlow ve ark., 1986; Karring ve ark., 1993).

Günümüzde periodontal hastalık sonucu yıkıma uğramış sert ve yumuşak dokuların geri kazanımı amacıyla, rezorbe olabilen ve olmayan membranlarla birlikte kullanılan YDR tekniği, otojen kemik greft materyalleri, allogreftler, alloplastik greftler, ksenogreftler ve büyüme faktörleri gibi çeşitli materyaller ve teknikler üzerinde çalışılmasına rağmen halen insanlarda tam ve ideal bir rejenerasyon elde edebilmek mümkün olamamıştır (Taba ve ark., 2005; Ramseier ve ark., 2006; Kurtiş, 2008). Araştırmacılar elde edilebilen bu sınırlı rejeneratif kapasitenin nedenini oral çevrede bulunan bazı sınırlayıcı faktörlere bağlamışlardır. Bunlardan ilki; periodontal yara bölgesinin, dişler üzerindeki biyofilm içindeki anaerobik bakterilerle kontamine olmasıdır. İkincisi; transmukozal sert-yumuşak doku yapısının patojenlerin yara bölgesi içine girmesini kolaylaştırmasıdır. Diğer bir faktör; periodontal yapı içerisinde multipl bağlantı bölgelerinin bulunması ve stromal-hücreli ilişkiler dokuların karşılıklı olarak yeniden geliştirilebilmesini zorlaştırmasıdır. Bir diğer faktör ise; oklüzal yüklerin hem aksiyal hem de transversal boyutta dişler üzerine gelmesinin rejenerasyonu

etkileyebilmesidir (Mc Culloch, 2000; Anusaksathien ve Giannobile, 2002; Kurtiş, 2008).

#### **2.4. Doku Mühendisliği**

Doku mühendisliği; hasara uğramış olan dokuların yerine sentetik veya biyolojik matriksler içinde canlı hücrelerin, biyolojik aracı moleküllerin ve büyüme faktörlerinin birlikte bulunduğu yapıların yerleştirilmesi ile yeni dokuların inşa edilmesini hedefleyen, hücre biyolojisine, gelişimsel biyolojiye ve biyomateryal kullanımına dayanan biyomedikal bir bilim ve araştırma alanıdır. Doku mühendisliğinde amaç, kaybedilen ya da hasar görmüş dokuların fiziksel ve fonksiyonel olarak özelliklerini sağlayacak yeni doku oluşturulmasıdır (Lynch ve ark., 1999).

Doku mühendisliğinde; klasik biyomateryal uygulamalarından farklı olarak sadece kaybedilen dokulara ait boşlukların doldurulması değil, oluşum ve rejenerasyon mekanizmalarını anlayarak fonksiyon görebilen dokuların elde edilebilmesi hedeflenmektedir (Heng ve ark., 2004; Salgado ve ark., 2004). Doku mühendisliği uygulamaları ile vücut içine yerleştirilen yapılar vücudun geri kalan doğal dokuları gibi fiziksel ve biyolojik uyarılara karşı cevap vererek uyum gösterebilir. Bu özellik doku mühendisliği ile oluşturulan yapıların canlı hücre içermeyen biyomateryal uygulamalarına kıyasla en önemli üstünlüğüdür. Canlı hücre içermeyen biyomateryal uygulamaları doku içerisinde zamanla yıkıma uğrayabilirler veya başlangıçta sağladıkları fiziksel niteliklerini kaybedebilirler. Doku mühendisliği çalışmalarıyla elde edilen yapılar ise, dış etkenlere ve fizyolojik gereksinimlere yanıt vererek, Ekstraselüler matriks yapısını yeniden şekillendirerek istenilen niteliklerini koruyabilmektedirler (Vacanti ve Vacanti, 2000). Doku mühendisliğinde, hedef dokuyu oluşturabilme potansiyeline sahip hücreler, bu hücrelerin fonksiyonlarını destekleyen veya yönlendiren büyüme ve farklılaşma faktörleri ve bu iki elemanın içinde yer aldığı, oluşturulması hedeflenen dokunun üç boyutlu yapısını belirleyen doku iskeleleri olmak üzere üç adet anahtar eleman rol oynamaktadır. Bu temel unsurların birbirleri ile olan ilişkileri oluşacak dokunun nitelik ve niceliğini belirler (Reddy, 1995; Çağlayan, 2010).

Periodontolojide doku mühendisliği ise periodontal doku iyileşmesi sürecini uyaracak veya düzenleyecek şekilde doku değişimlerine neden olma potansiyeline sahip medyatörlerin kullanımını içermektedir. Bu biyolojik medyatörler; büyüme faktörleri,

MMP, Trombositten zengin plazma olarak 3 ana grupta toplanır. Bu yapıların herbiri iyileşme sürecinde ve rejenerasyonda önemli role sahiptirler (Taba ve ark., 2005).

## 2.5. Mine Matriks Proteinleri

Doku mühendisliğinin amaçları ile diş oluşumu/gelişimi sırasında meydana gelen hücresel olaylarla ilgili mevcut bilgiler birleştirildiğinde periodontal rejenerasyonun sağlanabilmesi için farklı bir fikir ortaya atılmıştır. Bu felsefeye göre odontogenez sırasında rol oynadığına inanılan spesifik faktörlerin rejeneratif periodontal tedavide kullanımı gündeme gelmiştir. Bu spesifik faktörlerden biri de MMP türevleridir. MMP'lerin sement oluşumunda öncülük ettiği, PL ve kemik dokusunu oluşturmak için sinyaller gönderdiği ifade edilmiştir (Hammarstrom, 1997; Cochran ve Wozney, 1999; Spector, 1999). Hertwig Epitel Kınından kaynağını alan mineyle ilişkili bu proteinler kök gelişimi sırasında hücresiz sement oluşumunda rol almaktadırlar. Bu proteinler aynı zamanda embriyogenez süresince PL ve alveol kemiği yapımında da görev almaktadır (Oringer, 2002). Araştırmalarda haricen kullanılan MMP'lerin tüm periodontal dokuların rejenerasyonunu uyardığı, sement, alveol kemiği ve PL yapımının aynen doğal oluşum sürecindeki gibi taklit edildiği, bu mekanizmanın arkasında ise gelişim esnasında PL matriks hücre ilişkileri çerçevesinde ortaya çıkan amelogenin birikiminin olduğu savunulmuştur (Hammarström ve ark., 1997a).

Mine matris proteinleri piyasada Emdogain (1997) ve Xelma (2004) adlarıyla bulunmaktadır. MMP'ler yeni sement ve destek dokuların oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, bu biyolojik medyatör periodontal rejenerasyonda kök morfogenezi sırasında kullanılmaktadır. Bu uygulama hastalıktan etkilenmiş kök yüzeylerine cerrahi işlem sırasında uygulanması ve böylece dokuları meydana getiren hücrenin ara maddesi olan Ekstraselüler matriksin oluşturulmasıyla klinik bir ortamda embriyolojik gelişimsel etkileşimlerin ve olayların taklit edilmesi prensibine dayanır (Pitaru ve ark., 1994; MacNeil ve Somerman, 1999).

Mine Matriks Proteini, anne karnında bulunan domuzların gelişmekte olan diş tomurcuklarından elde edilir ve domuz embriyosuna ait amelogeninleri içeren asidik ekstrenin saflaştırılmış şeklidir (Gestrelus ve ark., 1997a). EMD'nin %90'ını amelogenin, %10'unu prolinden zengin non-amelogenin, tuftelin, tuft protein, serum, ameloblastin, amelin ve tükrük proteinleri oluşturur (Brookes ve ark., 1995).

Antibakteriyel etkili propilen glikol aljinat (PGA) taşıyıcı olarak kullanılmıştır (Hammarström, 1997b; Gestrelus ve ark., 2000). EMD, 4°C'de translusent formda iken oda sıcaklığında opak bir materyal haline dönüşmektedir. Dereceye bağlı bu değişimler mine proteinlerinin yüksek oranda prolin içermelerine bağlanmaktadır (Margolis ve ark., 2006). Asidik ortamda EMD'in PGA içinde çözünerek, kıvamlı bir hal aldığı, nötral ortamda ve vücut sıcaklığında ise, bu kıvamlı halin azaldığı ve PGA'nın ortamdaki uzaklaşarak, EMD'in açığa çıktığı belirtilmiştir. Periodontal cerrahi sırasında EMD uygulanmasından önce kök yüzeyinin detoksifikasyonu ve kollajen liflerin açığa çıkmasını sağlamak için, kök yüzeyi asit uygulaması ile demineralize edilmektedir (Lowenguth ve Blieden, 1993). Asit uygulaması ile smear tabakası uzaklaştırılır, kök yüzeyinin detoksifikasyonu ve yüzey demineralizasyonu ile kollajen liflerin açığa çıkarılması sağlanır (Garrett, 1996; Heijl, 1997). Asit uygulaması sonrasında dentin tübüllerinin genişlediği ve buna bağlı olarak sementogenezin hızlandığı ve dolayısıyla sement oluşumunun ve bağ dokusunun daha iyi organize olduğu bildirilmektedir (Zeichner, 2006). Bu sebeple sitrik asit, tetrasiklin, fosforik asit ve etilen diamin tetra asidik asit (EDTA) sıklıkla kullanılmaktadır. Son zamanlarda bu amaçla kullanılmak üzere %24'lük EDTA materyalle birlikte piyasada kullanıma sunulmaktadır (Şekil 1).

Etki mekanizması incelendiğinde; EMD jelin yara yüzeyine uygulandığında, ekstrasellüler bir tabaka olarak bir haftadan fazla kalmak üzere, çözünmez bir protein matriksi olarak kaldığı ve mezenkimal hücreler rejenerasyonda görev alan büyüme faktörlerini ürettiği klinik çalışmalarla gösterilmiştir (Gestrelus ve ark., 1997b; 2000; Schwartz ve ark., 2000; Van der Pauw ve ark., 2000).

Emdogain jel uygulanmış kök yüzeylerinde, gelişen olaylar, dört aşamada izlenmektedir: (Lyngstadaayngs, 2000)

1. Uyarma (atraksiyon): Emdogain jel ile kaplanan kök yüzeyine mezenkim hücrelerinin göçü başlamaktadır.
2. Yapışma (adezyon) ve hücre çoğalması (proliferasyon): Hücreler kök yüzeyine bağlanıp yerleşmektedir. Madde değişimi artmıştır ve hücre içi sinyal maddeleri uyarılmıştır.
3. Farklılaşma (diferansiyasyon): Hücreler kollajen lifleri ekleyerek sement üretimine başlar.

4. Alveol kemiği oluşumu: Tedavi edilen kök yüzeyi boyunca ve belirli bir mesafede, fibröz dokuda bir yoğunlaşma, yeni alveol kemiği oluşturan bölgeyi gösterir.



Şekil 1. Emdogain ve Prefgel

Hammarström ve ark. (1997b), EMD' nin epitel üzerine baskılayıcı etkisi ile ağız epiteline ait hücrelerin yara bölgesine ulaşmalarını engellediğini göstermişlerdir.

EMD nin periodontal rejenerasyonda biyolojik etkileri: (Bosshardt, 2008)

1. Hücrelerin ataşmanını, yayılımını ve kemotaksiyi artırır.
2. Hücre proliferasyonunu ve sağ kalımını artırır.
3. Transkripsiyon faktörlerinin salınımını artırır.
4. Büyüme faktörlerinin, sitokinlerinin ve ekstraselüler matriks moleküllerinin sentezini artırır.
5. Kemik remodelasyonunu düzenleyen moleküllerin salınımını düzenler.

EMD, klinik olarak periodontitisten etkilenmiş dişlerin rejenerasyonunda, kök yüzeyi örtülmesi amacıyla, diş replantasyonunda kullanılmaktadır. Deneysel olarak da dentin tamiri, diş hareketleri, anti-kanser tedavisi ve yüz yaralarının tedavisinde etkinliği ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır.

### 2.5.1. MMP ile İlgili Deneysel Çalışmalar

Mine matriks proteinlerin periodontal rejenerasyon amacıyla kullanımı ile ilgili birçok deneysel çalışma mevcuttur. Hammarström ve ark. (1997a) yaptıkları çalışmada, lokal olarak uygulanan çeşitli MMP'lerin periodontal rejenerasyonun gelişimine olan etkilerini incelemişlerdir. Cerrahi bir işlemle, maymunların üst çenelerinde her iki tarafta dehisens tipi defektler oluşturulmuş ve hazırlanan materyaller defektlere uygulanmıştır. Sekiz haftalık deney periyodu sonunda kök yüzeylerinde, dentine yapışmış hücresiz sement, PL ve alveol kemiğinin olduğu gözlenmiştir. Oluşan yeni sement dokusuyla kemik arasında da kollajen lifleri görülmüştür. Araştırmacılar oluşan rejenerasyonun mine matriksinin içerisinde bulunan amelogenin içeriği ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında maymunların kesici dişleri çekilerek kök yüzeylerinde deneysel kaviteler oluşturulmuş ve MMP bu kavitelere uygulanmıştır. Yapılan histolojik incelemelerde, dentine sıkıca yapışmış hücresiz sement olduğu görülmüş ve eksojen kaynaklı mine matriksinin, endojen kaynaklı olan mine matriksi ile aynı doku cevabını oluşturabildiği bildirilmiştir. Çalışmanın sonunda, MMP'nin hücresiz sement rejenerasyonunu sağlayabilme potansiyelinin olduğu belirtilmiştir (Hammarstrom ve ark., 1997b).

Bir başka deneysel çalışmada maymunlarda oluşturulan kemik içi defektlerin tedavisinde EMD, sentetik rezorbe olabilen membran ve EMD+sentetik rezorbe olabilen membranın etkisini histolojik olarak incelemişlerdir. Kontrol grubu olarak koronale kaydırılan flep ile tedavi uygulanmıştır. Beş aylık deney periyodu sonunda kontrol grubundaki defektlerde uzun bağlantı epiteli oluşurken; EMD ile tedavi edilen defektlerin apikal kısımlarında hücresiz tipte sement olduğu, koronale doğru gidildikçe hücreli ve hücresiz tipteki sementin karışık olarak var olduğu görülmüştür. Sentetik rezorbe olabilen membran ile tedavi edilen defektlerde membran açığa çıkmadığı takdirde peridontal rejenerasyonun elde edildiği görülürken EMD+sentetik rezorbe olabilen membran kombinasyonunun ise, ilave fayda sağlamadığı görülmüştür (Sculean ve ark., 2000).

Sawae ve ark. (2002)'nin yaptığı çalışmada ise genel anestezi altındaki farelerde, aeratör ile oluşturulan kemik defektlerine EMD uygulanmış ve 7, 14, 30, 60. günlerde immunohistokimyasal olarak incelenmiştir. Altmış gün sonundaki değerlendirmede, EMD uygulanan test gruplarında PGA'nın kontrol grubu olarak

uygulandığı gruplara oranla daha fazla yeni kemik yapımı gözlemlendiği ve oluşturulan defektin büyük bir kısmını kapladığı bildirilmiştir. Sonuç olarak, EMD kullanılan alanlarda kemikteki yara iyileşmesinin ve mineralize doku oluşumunun istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu vurgulanmaktadır.

Cochran ve ark. (2003)'nın yaptıkları histolojik incelemede ise EMD'nin kemik içi defektlerde oluşan periodontal rejenerasyona etkisini genişlikleri 1-6 mm arasında değişen defektler üzerinde incelemiştir. Yapılan incelemelere göre her genişlikteki defektte periodontal rejenerasyon görülürken, EMD kullanılan grupta oluşan yeni doku miktarının daha fazla olduğu belirtilmiştir. Bir mm ve 2 mm genişliğindeki dar defektlerde oluşan yeni sement miktarının, 4 mm ve 6 mm genişliğindeki geniş defektlere göre %45, yeni oluşan kemik miktarının ise %31 daha fazla olduğu belirtilmiştir. Araştırmacılar bu verilerin ışığında EMD'nin değişik genişliklerdeki defektlerde yeni sement, Sharpey fibrilleri, PL ve kemik dokusu oluşturarak periodontal rejenerasyonu sağlayabileceği bildirilmiştir.

Diğer bir histomorfometrik çalışmada, nikotin etkisi altındaki köpeklerde yaratılan dehissens defektlerinde EMD ve sentetik rezorbe olabilen membranın etkisi incelenmiştir. Histolojik kesitler incelendiğinde bütün deney gruplarında kronale doğru ilerleyen yeni sement oluşumu saptanmıştır. EMD grubunda ise hem hücreli hem de hücresiz tipte sement tespit edilmiştir. Histomorfometrik ölçümler incelendiğinde EMD grubunda oluşan yeni kemik ve sement miktarının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Sonuç olarak nikotin varlığında bile EMD'nin sadece flep operasyonuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla sement oluşumunu sağladığı rapor edilmiştir. Ayrıca rezorbe olabilen sentetik membran ve flep operasyonu ile tedavi edilen gruplar arasında oluşan yeni sement miktarında anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür (Pimentel ve ark., 2006).

### **2.5.2. MMP ile İlgili Klinik Çalışmalar**

Mine matriks proteinlerinin etkinliği deneysel çalışmalarda olduğu gibi klinik çalışmalarda da gösterilmiştir.

Heijl ve ark. (1997), ileri kronik periodontitis hastalarında EMD'nin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarının sonucunda; kronik periodontitisli hastalarda bulunan kemik içi defektlerin tedavisinde EMD kullanımı ile sondalama derinliğinde azalma,



ataşman kazancı ve kemik kazancında artma sağlandığını bildirmişlerdir. Ayrıca periodontal cerrahi sırasında EMD kullanımının herhangi bir yan etkisinin olmadığı da rapor edilmiştir.

Sculean ve ark. (1998), 15 hastada bulunan 20 kemik içi defekte EMD'nin klinik ve radyografik etkinliğini incelemişlerdir. EMD kullanımı ile sondalama derinliğinde azalma, ataşman kazancı ve kemik kazancında artma sağlandığını tesbit ettikleri çalışmanın sonucunda EMD'nin kemik içi periodontal defektlerin tedavisinde etkili bir tedavi yöntemi olabileceğini ancak bu tedavi şeklinin konvansiyonel tedavi şekilleri ve diğer rejeneratif yöntemlerle, daha uzun dönemli çalışmalar yapılarak karşılaştırılması gerektiğini belirtmişlerdir.

Bir başka klinik çalışmada da EMD'nin açılal kemik içi defektlerin tedavisindeki etkinliği değerlendirilmiş sondalama derinliğinde azalma, ataşman kazancı, kemik kazancı ve kemik dolumunda artış sağlandığı ve bu klinik ve radyografik sonuçlarında YDR ile alınan sonuçlara benzer olduğu rapor edilmiştir (Heden ve ark., 1999).

Sculean ve ark. (1999a), EMD ile rezorbe olabilen sentetik membranın etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmalarında, Operasyondan sonra yapılan ölçümlerde her iki grupta sondalama derinliğinde azalma ve ataşman kazancı görülmüştür. Tüm bu değerler incelendiğinde, gruplar arasında anlamlı bir farkın olmadığı ve her iki uygulamanın da klinik olarak başarılı sonuçlar verdiği rapor edilmiştir.

Sculean ve ark. (1999b), yaptıkları bir diğer çalışmada, kemik içi defektlerin tedavisinde EMD ve rezorbe olabilen sentetik membranın kullanımının sonuçlarını klinik ve histolojik yönden kıyaslamışlardır. Her iki tedavi grubunun sondalama derinliği azalması ve ataşman kazancı değerleri ile yeni ataşman, yeni kemik oluşumu ve yeni hücreli sement oluşumu değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark olmadığı rapor edilmiştir.

Froum ve ark. (2001), kemik içi defektlerin tedavisinde sadece flep operasyonu ile flep operasyonuna ek olarak EMD kullanımını karşılaştırdıkları çalışmanın sonucunda klinik ve radyografik başarı kriterlerine bakılarak EMD uygulanan grupta, diğer gruba göre kazancın daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmanın sonunda, klasik flep operasyonuna ek olarak kullanılan EMD'nin klinik

olarak anlamlı sonuçlar verdiğini ve tek başına klasik flep operasyonu ile yapılan tedavilere göre daha etkili bir tedavi yöntemi olduğunu belirtmiştir.

Tonetti ve ark. (2002), sonuçlarını yayınladıkları benzer bir çalışmada test grubuna papil koruyuculu insizyonla beraber EMD uygulamış, kontrol grubuna ise sadece papil koruyuculu insizyonla beraber flep operasyonu yapmışlar. Araştırmacılar kemik içi defektlerin tedavisinde papil koruyuculu insizyon tekniği ile EMD'nin beraber kullanımının daha fazla sondalama derinliği azalması ve ataşman kazancı sağladığını bildirmişlerdir.

Zucchelli ve ark. (2002), yaptıkları klinik çalışmada, 90 hastada bulunan 90 kemik içi defekti üç gruba ayırmıştır. Birinci grubu papil koruyuculu flep ve EMD ile 2. grubu yine papil koruyuculu flep ve titanyumla güçlendirilmiş rezorbe olmayan membran ile ve 3. grubu sadece flep operasyonu ile tedavi etmişlerdir. Çalışmanın sonucunda araştırmacılar hem EMD'nin hem de rezorbe olmayan membranların kemik içi defektlerin tedavisinde başarılı yöntemler olduğunu, membran kullanımıyla sondalama derinliğinde daha fazla azalma elde edilebileceğini ancak EMD'nin kolay kullanımı ve estetik bölgelerdeki etkinliğiyle önemli bir alternatif olacağını belirtmişlerdir.

Wachtel ve ark. (2003), periodontal kemik içi defektlerin tedavisinde EMD'nin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında, 11 hastada bulunan çift taraflı defektleri EMD (test grubu) ve klasik flep operasyonu (kontrol grubu) ile tedavi etmişlerdir. İki grup arasındaki Ataşman kazancı farkı hem 6. hem de 12. ayda yapılan ölçümlerde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Her iki tedavi grubunda da yüksek oranda primer flep adaptasyonu ve doku korunması sağlanmış ancak sondalama derinliği azalması ve ataşman kazancı yönünden, EMD uygulamasının üstün sonuçlar verdiği belirtilmiştir.

Sculean ve ark. (2003), kemik içi defektlere uygulanan EMD ve bir ksenogreftin histolojik olarak etkilerini incelemeyi amaçladıkları çalışmalarının sonucunda cep derinliği, klinik ataşman kazancı, yeni sement ve kemik oluşumu açısından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmediği bildirilmiştir. Çalışmada her iki materyalinde yeni periodontal destek doku ve alveol kemiği oluşturabilecekleri rapor edilmiştir.

Sculean ve ark. (2004), 42 hastada bulunan defektleri 4 gruba ayırarak tedavi etmişlerdir. Bu gruplara EMD, YDR, EMD+YDR ve klasik flep operasyonu uygulanmıştır. YDR yöntemi rezorbe olabilen sentetik membran kullanılarak uygulanmıştır. Tedavinin 1 ve 5 yıllık sonuçları incelendiğinde her 4 grup için de istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı ve tüm tedavi uygulamaları ile kısa dönemde elde edilen başarılı sonuçların uzun dönemde de kalıcı olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar bu çalışmanın sonuçlarına dayanarak, EMD'nin YDR ile kombine kullanılmasının ilave bir katkı sağlamadığını bildirmişlerdir.

Bir başka uzun dönem çalışmada, EMD ve YDR ile tedavi edilen kemik içi defektler değerlendirilmiştir. Araştırmacılar 1 ve 8 yıllık klinik ve radyografik başarı parametrelerine bakarak, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını ve her iki grupta da kullanılan yöntemlerin uzun dönemde stabilizasyonlarını koruyabildiklerini belirtmişlerdir (Sculean ve ark., 2006).

Heden ve Wennström (2006), 5 yıl takip ettikleri vaka serilerinde, EMD ile tedavi ettikleri kemik içi defektlerin uzun dönem stabilitesini incelemişlerdir. Sekseniki hastada bulunan 102 defekt EMD uygulanarak tedavi edilmiş ve elde edilen klinik ve radyografik sonuçlar 1. ve 5. yıllarda incelenmiştir. İki gözlem süresindeki başarı değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonunda araştırmacılar, EMD ile yapılan tedavi sonucu elde edilen kazançların 5 yıl sonunda da korunabildiğini bildirmişlerdir.

Cortellini ve Tonetti (2007), 13 kemik içi defekti minimal invaziv cerrahi teknik ile EMD kullanarak tedavi etmişlerdir. Birinci yıl sonunda elde edilen verilere dayanarak EMD'nin minimal invaziv teknikle kullanıldığında çok başarılı klinik sonuçlar verdiğini rapor etmişlerdir.

Cortellini ve ark. (2008), yaptıkları benzer bir çalışmada, kemik içi defektleri minimal invaziv cerrahi teknikle beraber EMD kullanarak tedavi etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, minimal invaziv teknikle beraber EMD kullanımının, kemik içi defektlerin tedavisinde etkili bir tedavi yöntemi olduğunu bildirmişlerdir.

Yapılan çok sayıda deneysel ve klinik çalışma sonucunda MMP periodontal rejenerasyonda etkinliği kanıtlanmış, uzun dönem sonuçları yayınlanmış bir biyolojik medyatördür. Diğer medyatörler ile karşılaştırıldığında etkisi güvenilir ve doğru defekte

uygulandığında öngörülebilir sonuçlara sahiptir. Bu özelliği ile yeni denenecek materyallerde karşılaştırma amacıyla altın standart olarak kullanılabilir.

## 2.6. Ankaferd Kan Durdurucu

Ankaferd Kan Durdurucu geleneksel tıp ve diş hekimliğinde hemostatik ajan olarak kullanılan bir bitki ekstresidir. Beş bitkisel içeriğin çeşitli oranlarda karıştırılması suretiyle hazırlanan bir ajandır (Tablo 1). İçeriğinde; Glycrrhiza Glabra (meyan), Vitis Vinifera (koruk), Alpinia Officinarum'un (havlıcan) kurutulmuş yaprak ekstreleri, Urtica Dioica'nın (ısırgan) kurutulmuş kök ekstresi, Thymus Vulgaris'in (kekik) ise kurutulmuş ot ekstresi bulunmaktadır. Bu bitkilerin her biri endotel hücreleri, kan hücreleri, anjiogenez, hücre proliferasyonu, vasküler dinamik ve medyatörler üzerine etkilidirler (Goker ve ark., 2008).

**Tablo 1.** Ampul formunda Ankaferd Kan Durdurucu içeriği

Etkin madde adı	Etkin madde miktarı (mg)
Urtica dioica <sup>1</sup>	0,12
Vitis vinifera <sup>2</sup>	0,16
Glycrrhiza glabra <sup>2</sup>	0,18
Alpinia officinarum <sup>2</sup>	0,14
Thymus vulgaris <sup>3</sup>	0,10

<sup>1</sup>kurutulmuş kök ekstresi,

<sup>2</sup>kurutulmuş yaprak ekstresi,

<sup>3</sup> kurutulmuş ot ekstresi

Glycrrhiza glabra yani meyan kökünün antianjiyogenik aktivite gösterdiği ve vasküler endotelyal büyüme faktörü oluşumunu azalttığı bildirilmiştir (Sheela ve ark., 2006). Çeşitli araştırmalarda bu bitkinin antiinflamatuvar, antitrombotik, antioksidan ve antiaterosklerotik etkileri gösterdiği ve yara iyileşmesini aktive ettiği bildirilmektedir (Francischetti ve ark., 1997; Yokota ve ark., 1998). Ayrıca meyan kökünün, mineralokortikoid etki nedeniyle kan basıncını yükselttiği, Thymus vulgaris yapraklarının ise bilinen antioksidanlar olan alfa-tokoferol ve bütil hidroksitoluenle kıyaslanabilir düzeyde antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (Van Rossum ve ark., 1999; Lee ve ark., 2005).

Vitis vinifera ekstresi, periferel venöz yetmezliğe karşı, antioksidan olarak, variköz venlerde, kapiller incelme, diyabetik retinopatinin de dahil olduğu retina hastalıkları, ödem, oküler stres ve premenstrüel sendromda pozitif etkiler göstermektedir. Ekstrenin çok iyi olan antioksidan etkileri ateroskleroz ve kanser gibi diğer kronik dejeneratif hastalıklara karşı koruyucu olarak önerilebilir. *Alpinia officinarum*, lipopolisakkarid ile aktive edilmiş fare peritoneal makrofajında nitrik oksit üretimini inhibe eder. *Urtica dioica*'nın ise antifungal, antiviral etki gösterdiği ve kardiyovasküler sistem üzerinde olumlu etkilerinin olduğu bildirilmektedir (Facino ve arkadaşları, 1994; Yamakoshi 1999; Testai ve ark., 2002; Matsuda ve ark., 2006).

Ankaferd Kan Durdurucu, ampul, tampon ve sprey olmak üzere 3 farklı farmasötik formda hazırlanmıştır. Doku bütünlüğünün bozulduğu alana uygulandığında bölgede fibrinojen ve diğer protein moleküllerinin kümelenmesini sağlayarak bir protein ağı oluşturur. Bu ağ üzerinde özellikle eritrositler olmak üzere trombositler ve eritrositler kümeleşirler. AKD'nin etkisi saliseler gibi kısa sürede ve çok hızlı başlamaktadır. (Ankaferd Kan Durdurucu araştırma etkinlikleri raporu, 2008)

Ankaferd Kan Durdurucu ile indüklenmiş ağ formasyonu AKD ve kan proteinleri (özellikle fibrinojen) arasındaki etkileşime bağlıdır. AKD'nin temel mekanizması enkasüle protein ağı formasyonu aracılığıyla eritrositlerin agregasyonunu (çökelme) için fokal odak oluşumunu sağlamaktır. AKD kullanımını takiben plazma fibrinojen aktivitesinde azalma ve fibrinojen antijeninde düşme olduğu, buna bağlı trombin zamanının uzadığı bildirilmektedir. Ayrıca plazmada; total protein, albumin ve globulin seviyelerinin de anlamlı oranda düştüğü görülmüştür. Bu yüzden, AKD, fibrinojen–eritrosit aglütinasyon ilişkisini etkilemekte ve sonuçta eritrosit agregasyonunu stimüle eden bir protein ağı oluşturmaktadır. Diğer taraftan Plazmaya AKD eklenmesi, bireyin pıhtılaşma faktörlerinin (Koagülasyon Faktör II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII) düzeylerini etkilememektedir (Ankaferd Kan Durdurucu araştırma etkinlikleri raporu, 2008; Goker ve ark., 2008).

Diş hekimliğinde ilk kez Ak ve ark. (2008) tarafından, hemofilili hastalarda diş çekimi sonrası kanamanın durdurulması amacıyla kullanılmıştır. Sonra yapılan başka bir çalışmada çekim sonrası hemostatik amaçla kullanılan AKD'nin herhangi bir sistemik yan etki göstermediği bildirilmiştir (Goker ve ark., 2008). Ayrıca dental cerrahi

işlem sonrası gözlenen kanamanın tedavisinde AKD'nin etkili bir hemostatik ajan olduğu da rapor edilmiştir (Baykul ve ark., 2010; Erçetin ve ark., 2010).

Ankaferd Kan Durdurucu ile ilgili ilk deneysel çalışmada domuzlar üzerinde AKD'nin farklı preparatlarının (sprey, solüsyon, tampon) hemostatik etkinliği değerlendirilmiş ve başarılı bir hemostatik ajan olduğu bildirilmiştir (Bilgili ve ark., 2009). Daha sonra yapılan in-vivo çalışmalarla da AKD'nin hemostatik etkinliği desteklenmiştir (Cipil ve ark., 2009; Beyazıt ve ark., 2011; Iynen ve ark., 2011).

Tavşanlar üzerinde yapılan bir çalışmada AKD'nin oral sistemik uygulamasından sonra akut mukozal toksisite, hematotoksisite, hepatotoksisite, nefrotoksisite ya da biyokimyasal toksisite gözlemediklerini ve AKD'nin güvenli bir ajan olarak kabul edilebileceğini bildirmişlerdir (Bilgili ve ark., 2010).

Hasgul ve ark. (2014), AKD kullanarak aspirine bağlı mide mukoazasındaki hasarların azaltılmasını rat çalışması ile değerlendirmişler ve AKD'nin aspirine bağlı oluşan oksidatif ve iltihabi değişiklikleri azalttığını bildirmişlerdir.

İşler ve ark. (2010), ratlar üzerinde yaptıkları bir çalışmada AKD'nin erken kemik iyileşmesi üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda AKD'nin enflamasyon ve nekroz oluşumunu azalttığını ayrıca erken kemik iyileşme döneminde yeni kemik formasyonunu arttırdığını bildirmişlerdir.

## **2.7. Ekstraselüler Matriks Proteinleri**

Dişeti bağ dokusunda yer alan ekstraselüler matriks inorganik bileşenleri kollajenler, nonkollajenöz proteinler ve proteoglikanlardan oluşur (Buduneli, 2001). Yumuşak ve sert periodontal dokuların yara iyileşmesinde önemli rol oynayan bir takım makromoleküller tanımlanmıştır. Bunlar; Kollajen-1, Kollajen-3, Dekorin, Biglikan, Osteopontin, Osteokalsin, Kemik Sialoprotein, Kemik Morfojenik Protein-2 ve Kemik Morfojenik Protein-4'tür (Ivanovski ve ark., 2000).

### **2.7.1. Kollajen**

Keratinositler ve fibroblastların ürettiği ekstraselüler matriks, cilde fiziksel destek sağlamanın yanında, besinler, metabolitler ve büyüme faktörlerinin hücrelerarası taşınması ve değişimini de gerçekleştirir. Elastin, proteoglikanlar, glikoproteinler ve fibronektinlerin yer aldığı ekstraselüler matriksin ana bileşeni kollajendir. Vücudumuzun yapısı için temel bir protein olan kollajen, yüz ve diğer vücut

bölümlerinde cildin sarkmasını ve kırışmasını engellemesinin yanısıra, kas gücü ve sıkılığı, bağ dokusu ile eklemlerin dış etkileri emme yeteneğinde önemli rol oynayan bir maddedir (Uitto ve ark., 1989).

Fibroblast hücrelerinden salgılanan kollajen molekülleri, kemik, eklem, cilt ve tendonların işlevsel bütünlüğünü sağlayan karakteristik iplikçiklere dönüşmektedir. İnsan vücudunda kollajen biyosentezi sırasında ilk olarak, biyosentetik bir başlangıç maddesi olan prokollajen meydana gelmekte ve prokollajen özel enzimler aracılığı ile yıkıma uğrayarak kollajeni meydana getirmektedir (The Merck Index, 1989). Kollajeni diğer ipliksi proteinlerden farklı kılan en önemli özellikleri; Prolin, hidroksiprolin ve hidroksilizin içeriği, triptofan içermemesi, tirozin ve sülfür içeriğinin düşük olması, aminoasitlerden meydana gelen polar grup içeriğinin fazla olması şeklinde sıralanmaktadır. Kollajen, ana yapısında gözlemlenen küçük farklılıklar dolayısı ile farklı tiplere ayrılmaktadır (Bornstein ve Sage, 1980).

Yetişkinlerin cildinde, kollajenin %80'ini Tip I kollajen oluşturur. Ayrıca %15 düzeyinde Tip III, %5 oranında da Tip IV ve V kollajen bulunmaktadır. Gençlerin cildinde ve yara iyileşme sürecinde ise, yeniden yapılandırma kollajeni olarak da tanımlanan kollajen tip III daha fazla miktarda yer almaktadır (Chaudhuri ve ark., 2000). Elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarda, kollajen iplikçiklerinin çaplarının cinsiyete göre değişiklik gösterdiği saptanmıştır (Tzaphlidou, 2001). Yaşlanma sürecindeki cilt yapısında kollajenle ilgili olarak Fibroblastlarda kollajen biyosentezinin azalması, Kollajen tip I ve III miktarında belirgin azalma ile ekstraselüler matrikste buna bağlı olarak meydana gelen incelme, ipliksi kollajen miktarının azalmasıyla cildin biyomekanik özelliklerini yitirmesi, üç önemli değişiklik olarak sıralanabilmektedir (Chaudhuri ve ark., 2000).

Sağlıklı dişetinde ekstrakte edilebilen kollajenin %99'u Tip I ve III, %1'den azı Tip V'dir (Narayanan ve Page, 1983). Tip I ve III'ün esas görevi dokunun mekanik direncini sağlamaktır. Tip I kalın kollajen fibrillerde, tip III ise daha ince fibrillerde bulunur. Ayrıca, Tip III lamina propriada daha yaygın haldedir. Dişetinde Tip III kollajen total kollajenin yaklaşık %9'udur. Tip III ve V kollajenler enflamasyon ve rejenerasyon ile ilişkilidir (Chavrier ve ark., 1984; Narayanan ve ark 1985; Romanos ve ark., 1991).

### 2.7.2. Osteopontin

Osteopontin (OPN); kemik siyaloproteini 1, idrar taşı proteini, sekrete edilen fosfoprotein1, nefropontin, üropontin, ETA-1 isimleriyle de bilinmektedir (Gericke ve ark 2005). OPN ekstrasellüler matrix ilişkili sialik asitten zengin fosfoglikoprotein yapısında integrin bağlayan bir protein olup kemik resorpsiyonu, yara iyileşmesi, doku yenilenmesi, immünolojik yanıtlar, vaskülarizasyon gibi normal fizyolojik süreçleri düzenler (Jan ve ark., 2010; Joseph ve ark., 2010; Perry ve ark., 1997; Lin ve ark., 2012). Matriks metalloproteinazlar dahil olmak üzere çeşitli proteazları; büyüme faktörleri, sitokinler ve Ekstraselüler matriks proteinleri tarafından regüle edilirler. Bir Ekstraselüler matriks molekülü olan OPN, multifonksiyonel, kollajenöz olmayan, sialik asidden zengin, glikolize olmuş kemokin benzeri bir fosfoproteindir (Regan, 2003). Son yıllarda kemikte kollajen yapılı olmayan birçok protein izole ve karakterize edilmiştir. Bu proteinlerden biri olan osteopontin, hidroksiapatit yapıya çok sıkı şekilde bağlanan bir proteindir ve osteoklast ile osteoblastlar tarafından sentezlenmektedir. Kemik dokusunun tüm kısımlarında bulunmaktadır. İçerdiği asidik aminoasitler ve fosfor sayesinde hidroksi apatit yapıya sıkı bir şekilde bağlanmaktadır. OPN varlığının normal kemik oluşumu ve gelişiminin parçası olan osteoklast farklılaşmasında çok önemli bir rolü olmadığı düşünülürken patolojik durumlarda ise osteoklast sayısının ve aktivitesinin artmasında osteopontinin önemli role sahip olduğu gözlenmiştir. OPN sentezi kalsitrol tarafından stimüle edilmektedir. Osteopontinin, osteoklastların kemik yüzeyine bağlanmasına yardımcı olduğu düşünülmektedir (Reinholt ve ark., 1990; Standal ve ark., 2004). OPN osteoblast farklılaşmasının çeşitli aşamalarında osteoblastlar tarafından, farklılaşmış (diferansiye) osteoblastlar tarafından, osteositler ve osteoklastlar tarafından üretilir (Dodds ve ark., 1995; Mckee ve Nanci, 1995; Sodek ve ark., 1995). Semental hatlarda OPN osteoblastların hücre adezyonu için ya da bu birleşme kısmında erken kalsifikasyon olaylarını teşvik etmek için kullanılabilir (Standal ve Borset., 2004). Embriyonik stromada ve yara iyileşmesinde fibroblastlardan salgılanmaktadır. Gebe farelerde embriyonun implantasyonu öncesinde osteopontin ekspresyonunun yüksek olduğu gözlenmiştir (Sodek ve ark., 2000).

Osteopontin, arjinin glisin aspartik asit bağlayan bir bölüm içerir. Bu nedenle çeşitli hücre yüzey reseptörleriyle etkileşebilir. Monosit, makrofaj ve T hücrelerini



inflamasyonun etkilerinden korur ve güçlendirir. TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  gibi inflamasyon markerları osteopontin salınımını güçlü bir şekilde uyarır (Lorenzen ve ark., 2011).

Farelerde OPN ile yapılan birkaç çalışma göstermiştir ki biyomineralizasyonun kontrolünde OPN'nin major fizyolojik fonksiyonu vardır. OPN, farelerde mekaniksel veya parotroid hormon uyarısına cevaben trabeküler kemiklerde artmıştır ve OPN bu kemiklerde rezorpsiyonu yönlendirmektedir (Ishijima ve ark., 2002; Kitahara ve Ishijima, 2003). Farelerde yapılan çalışmalarda OPN apatitkristallerinin büyümesi ve gelişmesinde regülatör bir rol oynar (Boskey ve ark., 1993). Bunlara ilaveten OPN'nin osteoklast hücrelerinin diferansiyasyonunu modüle ettiği de görülmüştür (Chellaiah ve Hruska, 2003).

## **2.8. Araştırmanın Amacı**

Yapılan literatür incelemesinde AKD'nin periodontal doku iyileşmesi üzerinde etkilerinin incelendiği herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Ajanın anjiogenez ve hücre proliferasyonunu arttırıcı özelliklerinden hareketle deneysel olarak oluşturulan periodontal defektlerin rejenerasyonuna etki gösterebileceği çalışmamızın hipotezini oluşturmaktadır.

Çalışmamızın amacı; sıçanlarda oluşturulan fenestrasyon defektlerinde AKD'nin periodontal doku iyileşmesi üzerine etkili olup olmadığını histomorfometrik ve immünohistokimyasal yöntemlerle bir MMP olan EMD ile karşılaştırmalı olarak incelemek ve bu ajanın periodontal rejenerasyonu sağlayabilecek alternatif bir materyal olup olmadığını ortaya koymaktır.

### **3. MATERYAL ve METOT**

#### **3.1. Araştırma Protokolü**

Bu deneysel araştırma, T.C. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu tarafından 27.11.2011 tarihinde 2013/55 numarası ile onaylandı (Ek-1). Laboratuvar çalışmalarında hayvan bakımı ve kullanımını için uluslararası etik kurallara uyuldu. Çalışmamız Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakóltesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezinde yürütüldü. Çalışmada 54 adet erkek Wistar sıçan kullanıldı. Deney hayvanları 10-12 haftalık, ağırlıkları 280-300 g arasında değişen, sistemik olarak sağlıklı ve daha önce herhangi bir araştırmada kullanılmamış sıçanlar arasından seçildi. Sıçanlar;  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$  sıcaklık ve %50 nem oranında, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık bir ortamda, her bir plastik kafese tek sıçan yerleştirilerek muhafaza edildi ve standart sıçan yemi verilerek beslenme şartları eşit olacak şekilde ayarlandı.

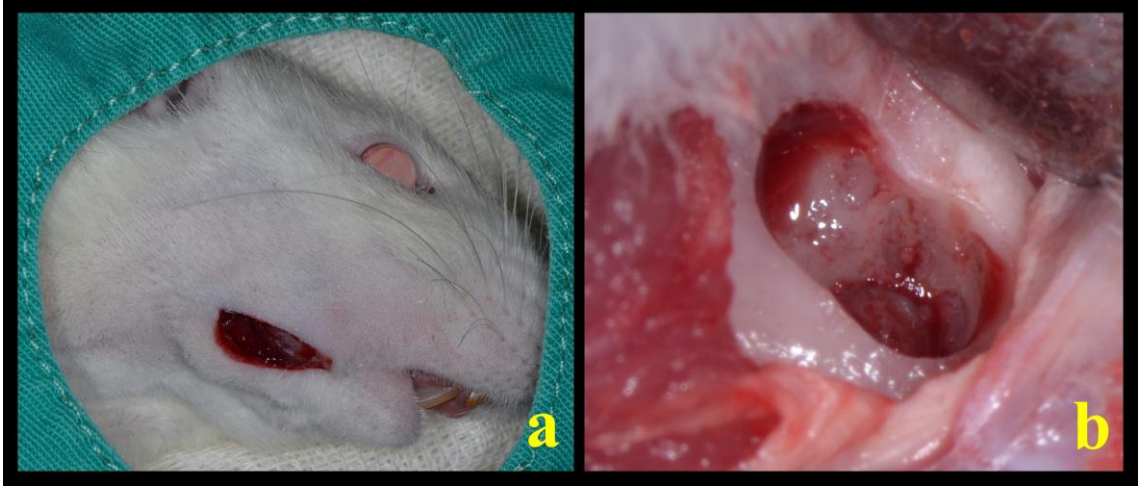
#### **3.2. Defektlerin Oluşturulması ve Tedavisi**

Akut fenestrasyon defekti oluşturulan 54 adet sıçan rastgele 6 eşit gruba ayrıldı.

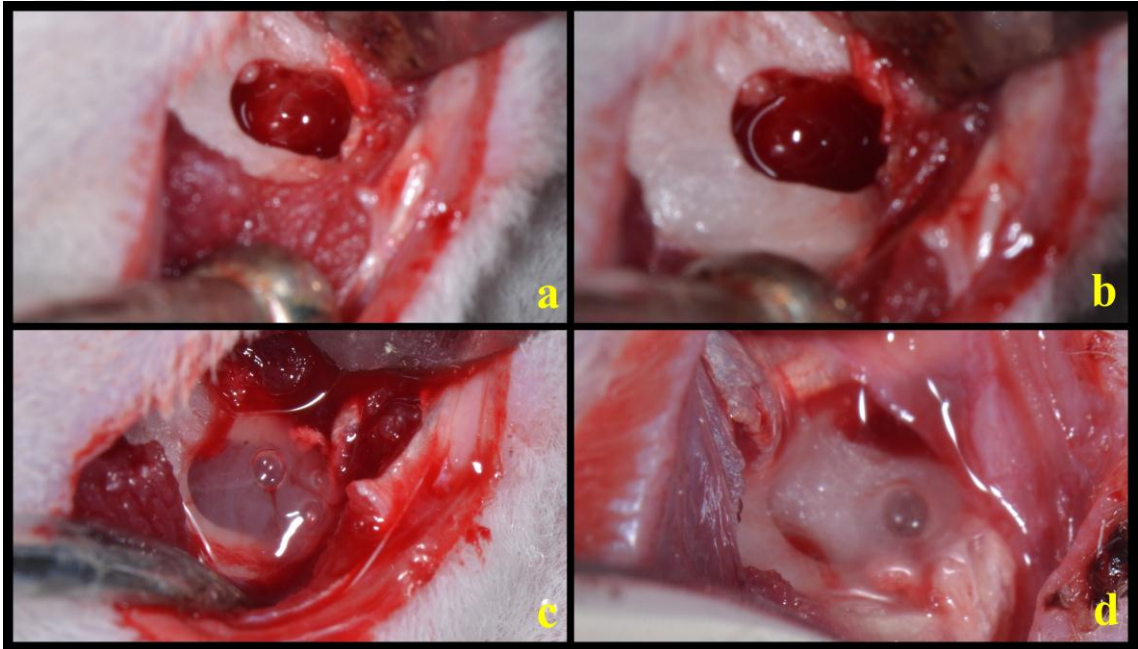
1. Grup: (AKD-10) Fenestrasyon defektine Ankaferd Kan Durdurucu uygulanıp 10. günde sakrifiye edilen grup.
2. Grup: (EMD-10) Fenestrasyon defektine Emdogain uygulanıp 10. günde sakrifiye edilen grup.
3. Grup: (Kontrol-10) Fenestrasyon defekti distile su ile yıkanıp 10. günde sakrifiye edilen grup
4. Grup: (AKD-38) Fenestrasyon defektine Ankaferd Kan Durdurucu uygulanıp 38. günde sakrifiye edilen grup
5. Grup: (EMD-38) Fenestrasyon defektine Emdogain uygulanıp 38. günde sakrifiye edilen grup
6. Grup: (Kontrol-38) Fenestrasyon defektine distile su ile yıkanıp 38. günde sakrifiye edilen grup

Tüm sıçanlarda deneysel fenestrasyon defekti oluşturuldu. Deney hayvanlarında, 75-100 mg/kg ketamin-HCl (50 mg/ml Ketalar®, Parke Davis)' nin

intraperitoneal yolla verilmesiyle sistemik anestezi sağlandı. Operasyon bölgesi olarak belirlenen mandibuler kemiğin korpus ve ramus bölümündeki tüyler tıraş edildi. Cerrahi saha merkezden periferik doğru povidon-iodin (Isosol®, Merkez Lab., İstanbul) ile boyanıp mandibuler kemiğin alt sınırı palpe edildikten sonra bu referans noktasının 2 cm medialinden 4 cm uzunluğunda horizontal bir insizyon yapıldı. İnsizyon dikkatle tamamlandıktan sonra mukoperiosteal flep kaldırıldı. Masseter kasın kemiğe yapışıklığı mandibulanın alt tabanından ayrılıp masseter ve periost kemikten diseke edilerek mandibulaya ulaşıldı (King ve ark., 1997) Mandibula 1. ve 2. molar bölgesindeki alveol kemiğinde; çapı 2mm olan rond frez ile salin irrigasyonu altında düşük hızda mezio-distal uzunluğu 4mm, okluzo-apikal uzunluğu 2mm, bukkulingual derinliği 2mm boyutlarında (4x2x2) bir defekt oluşturuldu (Şekil 2). Defektin üst sınırı 1. ve 2. molar dişlerin krestal kemiğinin 1mm altında olacak şekilde ayarlandı. Defekt bölgesine Distile su, AKD, veya EMD uygulanarak hayvanlar üç gruba ayrıldı. AKD uygulanan gruplarda defekt bölgesi kurutularak AKD (Ankaferd ilaç kozmetik AŞ., İstanbul, Türkiye) uygulandı ve kapama işlemine geçildi. EMD uygulanacak gruba EMD uygulanmadan önce PrefGel (Biora AB, Stockholm, İsviçre) uygulandı. PrefGel (%24 EDTA) çevre periodontal dokuların sağlığını koruyarak smear tabakasına kaldıran bir jel olup EMD ile birlikte paket halinde gelir. PrefGel bölgede 2 dakika bekletildikten sonra steril salin solüsyonu ile yıkanıp kurutularak defekt bölgesine EMD (Biora AB, Stockholm, İsviçre) uygulanıp doku kapama işlemine geçildi (Şekil 3). Kontrol grubu olanlarına ise distile su (Botafarma, Samsun, Türkiye) uygulandı. Masseter kası yerine yerleştirilip kas ve cilt altı dokular 4/0 emilebilir suture (Doğsan Medikal, Trabzon, Türkiye) ile cilt 3/0 ipek (Doğsan medikal, Trabzon, Türkiye) ile primer olarak kapatıldı. Operasyon bölgesi tekrar %10 luk povidon iyodin solüsyonu ile dezenfekte edildi. Deney periyodu boyunca hayvanlar tek kişilik kafeslere konuldu. İşlem sonrası hayvanlarda enfeksiyon veya başka bir nedenle ölüm gerçekleşmedi ve tüm hayvanlar sorunsuz olarak iyileşti. Sıçanlar, 10. veya 38. günde dekapitasyon metodu ile sakrifiye edildi.



Şekil 2. Sıçan mandibulasında 4x2x2 boyutlarında oluşturulan defekt



Şekil 3. Defekt bölgesinin değişik materyaller uygulandıktan sonraki görüntüsü a) Distile su uygulanan kontrol grubu b) AKD uygulanan grup c) EMD öncesi Prefgel uygulanan grup d) EMD uygulanan grup

### 3.3. Histopatolojik İnceleme

Sakrifikasyon sonrasında, histomorfometrik ve immünohistokimyasal incelemeler için alt çene çıkarılıp, 48 saat süreyle %10'luk formalin solüsyonunda bekletildi. Dokular daha sonra dekalsifikasyon işlemi için üç hafta boyunca, her hafta değişim olacak şekilde %10'luk formik asitte bekletildi.

Dekalsifikasyon işleminin ardından dokular bir gece akan su altında yıkandıktan sonra Tablo 2’de verilen şekilde doku takibi yapıldı.

**Tablo 2.** Doku takip işlemleri

<b>Doku Takip Materyali</b>	<b>Süre</b>
%70 Alkol	2 saat
%80 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
%96 Alkol	1 saat
Absolut Alkol	1 saat
Absolut Alkol	1 saat
Ksilen	15 dakika
Ksilen	15 dakika
Parafin (60°C)	1 saat
Parafin (oda sıcaklığı)	Bir gece
Parafin (60°C)	1 saat
Parafin (60°C)	1 saat

Doku takip işlemlerinin ardından dokular parafine gömülerek rotary mikrotom (Leira Mycosystems GmbH, Wetzlar, Almanya) ile bukkal-lingual yönde mandibula alt sınırından itibaren 5µm kalınlığında kesitler alındı. Sistemik rastgele örnekleme kuralına göre ilgilenilen doku hacmini ve alanını hesaplamak için koronal olarak alınan, eşit uzaklıkta (1/20) paralel ve seri kesitler kullanıldı (Gundersen, 1986). Bu aralık, stereolojinin temel prensiplerinden olan etkinlik prensibine göre, bir örnekten elde edilen sonuçların ‘hata katsayısı’ göz önünde bulundurularak belirlendi (Şahin ve ark., 2001). Sistemik örnekleme ile elde edilen kesitlerden defekt alanı içerenler değerlendirmeye alındı. Bu kesitlerden 2 tanesi immünohistokimyasal inceleme için ayrıldı diğerleri Hematoksilen Eozin ile boyandı.

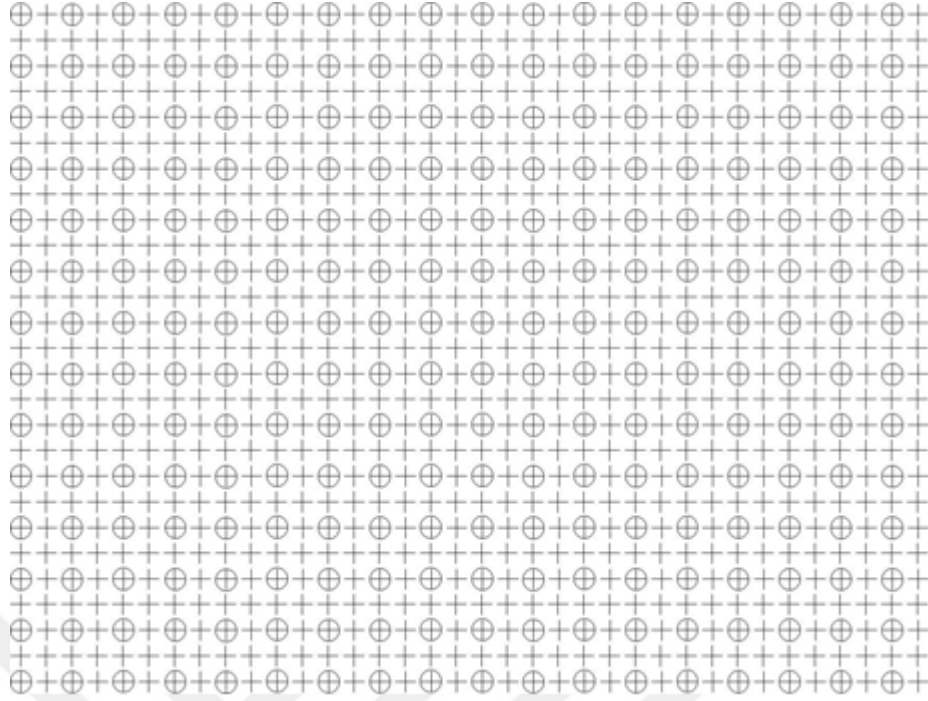
Kimyasal deparafinizasyon işlemi için, kesitler 15’er dakika 3 farklı ksilende, rehidratasyon işlemi için sırayla; %100, %96, %80, %70’lik alkol serilerinde 5’er dakika bekletildikten sonra akan su altında 5 dakika yıkandı. İşlemlerin ardından Tablo 3’de verilen şekilde boyama işlemi gerçekleştirildi. Boyama işleminden sonra lamaların üzerine entellan damlatılarak lamel ile kapatıldı.

**Tablo 3.** Boyama işlemleri

Boyama materyalleri	Süre
Hematoksilen	2 dakika
Akarsu	5 dakika
Eosin	1 dakika
%80 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
%96 Alkol	5 dakika
Absolut Alkol	5 dakika
Absolut Alkol	5 dakika
Ksilen	1 saat

### 3.4. Histomorfometrik İnceleme

Histolojik takip sonrası elde edilen kesitlerde alveol kemiği ve sement değerlendirildi. Bütün ölçümler, yapay standart sınırların oluşturulduğu ve anatomik yapılarca belirlenen referans hacimler içinde gerçekleştirildi. Ölçümler, örnek kesit görüntülerinin mikroskoba (Olympus BX50, Japonya) yerleştirilmiş renkli kamera (Olympus DP26, Almanya) sayesinde monitöre aktarılmasıyla gerçekleştirildi. Histolojik kesitlerde 10 gün sonra sakrifiye edilen gruplarda defekt alanına, yeni kemik alanına veyeni kemik yüzdesine x4'lük büyütme ile bakıldı. 38 gün sonra sakrifiye edilen gruplarda ise defekt alanına, yeni kemik alanına ve trabekül kemik alanına x4'lük büyütme ile; yeni sement kalınlığına ise x40'luk büyütme ile bakıldı. Tüm gruplar için monitördeki kesit profillerine ait görüntülerde defekt alanı bilgisayar yazılımı aracılığıyla (DP2-BSW-E) hesaplanırken yeni kemik alanları ile sadece 38 günlük grupta ayrıca trabeküler kemik, önceden bilgisayarda hazırlanan noktalar içeren asetat şablon aracılığıyla değerlendirildi (Şekil 4), (Howard ve Reed). İlgili yapıların monitördeki profil görüntülerine denk gelen asetattaki tüm noktalar sayıldı. Her bir nokta x4 objektif büyütmesinde doku düzeyinde 220 x 220  $\mu\text{m}^2$ 'lik alanları temsil etmektedir. Her bir preparattan elde edilen nokta sayısı, noktanın temsil ettiği alan ile çarpıldı ve sonuçların ortalaması alınarak o grup için ilgili yapının miktarı hesaplanmış oldu. 38 günlük grupta ayrıca defekt alanındaki diş kökünde yeni şekillenmiş sement miktarı bilgisayarda bulunan yazılım ile lineer olarak ölçüldü (x40 objektif büyütme).



Şekil 4. Defekt alanına düşürülüp yeni kemik ve trabekül kemik sayımı yapılan asetatin görüntüsü

### 3.5. İmmünohistokimyasal İnceleme

Hazırlanan doku bloklarından alınan kesitlerde Kollajen-3 ve Osteopontin proteinlerinin varlığını belirlemek için Streptavidin Biotin Peroksidaz Kompleks tekniği (SABK) uygulandı. Primer antikolar, üretici firmanın önerileri doğrultusunda ve daha önce yapılan ön çalışmalarla belirlenen oranlarda phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) ile sulandırıldı. İmmünohistokimyasal boyamalarda SABK teknik için alınan hazır kit (UltraVision Large Volume Detection System Anti Polyvalent, HRP, Thermo Scientific, Fremont, CA) kullanıldı ve tüm uygulamalar önerilen standart prosedüre göre yapıldı. Primer antikoların üretici firmalarının önerileri doğrultusunda pozitif kontroller ile negatif kontrol olarak PBS (pH 7.4) kullanıldı.

Kesitler, aseton- 3- *etoksipropilamin* (100 ml aseton- 2 ml 3- *etoksipropilamin*) ile kaplanmış lamlara *alındı*. 30 dakika 58°C'lik etüvde kurutuldu. Ksilolde deparafinize edilip seri alkollerde dehidre edildi. Formalinin dokudaki antijenik yapıyı maskeleyici etkisini gidermek için kesitler, %1'lik proteinaz K (Sigma) ile 37°C'de 20 dakika tutuldu. Kesitler, endojen peroksidaz aktivitesini gidermek için metanolde hazırlanmış %3'lük H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>'te 10 dakika bekletildi ve protein bloke edici serumda 10 dakika tutuldu. Daha sonra anti-collagen-III (ab7778, Abcam) ve anti-osteopontin

(ab8448, Abcam) primer antikorlar ile sırasıyla 1/100 ve 1/200 sulandırma oranlarında 1 saat oda ısında inkubasyona bırakıldı. Kesitlere biotinle işaretli sekonder antikor damlatılarak 30 dakika bekletildikten sonra Streptavidin peroksidaz enzimi ile 30 dakika inkübe edildi. Protein bloke edici serumu ile inkubasyon aşaması hariç tüm işlemlerden sonra kesitler, 2 kez 5 dakika süreyle PBS ile yıkandı. Son olarak kesitler 3-amino-9-etilkarbazol (AEC) (UltraVision Detection System AEC substrat, Thermo Scientific, Fremont, CA, ABD) kromojeni ile mikroskop altında kontrollü olarak 5 dakika süreyle boyandı. Gill's hematoksilen ile karşıt boyamaları yapıldı. Su bazlı yapıştırıcı (Shandon Immu-mount) ile kesitler kapatıldı ve ışık mikroskopunda incelendi. Değerlendirme sitoplazması ve/veya çekirdeği kırmızı boyanan hücrelerin sayısı ile hücrelerin boyanma yoğunluğu dikkate alınarak (0= Boyanma yok, 1= Hafif, 2= Orta, 3= Şiddetli, 4=Çok şiddetli) semikantitatif olarak yapıldı.

### **3.6. İstatistiksel inceleme**

Araştırmamızda elde edilen verilerin istatistiksel analizi Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Dahili Tıp Bilimleri Anabilim Dalı'nda SPSS 20.0 yazılımı (SPSS Inc., Chicago II., ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. %95 güven sınırı ve %80 güç için örnek sayısı her grup için 9 sıçan olarak belirlendi.

Veriler Shapiro-Wilk testi ile normal dağılıma uygunluk yönünden araştırıldı. Normal dağılım gösteren değişkenler için Tek Yönlü Varyans Analizi (One-way Anova), Post Hoc Tukey parametrik testleri kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen değişkenler için ise Bonferroni düzeltmeli Kruskal Wallis ve Mann Whitney U non parametrik testleri kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık düzeyi  $P < 0.05$  olarak, Kruskal Wallis sonrası Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U'da ise  $0,05/3 = 0.017$  olarak kabul edildi. Normal dağılıma uygunluk gösteren veriler ortalama $\pm$ standart sapma; normal dağılıma uygunluk göstermeyen veriler ise ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi.



## 4. BULGULAR

Deney periyodu boyunca yapılan düzenli takiplerde uygulanan işlemlerin bütün deney hayvanları tarafından iyi tolere edildiği ve iyileşmenin tüm hayvanlarda sorunsuz olarak gerçekleştiği görüldü. İyileşme boyunca yara dehisensi, abse ve enfeksiyona rastlanmadı.

Yapılan histopatolojik incelemede AKD ve EMD uygulanan 10 günlük örneklerde kontrol gruplarına göre daha fazla yeni kemik oluştuğu görüldü. 10 gün AKD uygulanan grupta 38 günlük AKD grubuna göre daha fazla yeni kemik oluşumu görülürken, EMD uygulanan tüm gruplarda AKD'ye göre daha fazla kemik izlendi. 10 günlük gruplarda yeni sement oluşumu ve trabeküler kemik saptanmazken 38 günlük gruplarda her ikisi de izlendi (Şekil 5,6).

### 4.1.Histomorfometrik Bulgular

On ve otuzsekiz günlük histomorfometrik veriler incelendiğinde; çalışma gruplarındaki defekt alanı büyüklükleri arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptanmadı ( $p>0.05$ ) (Tablo 4).

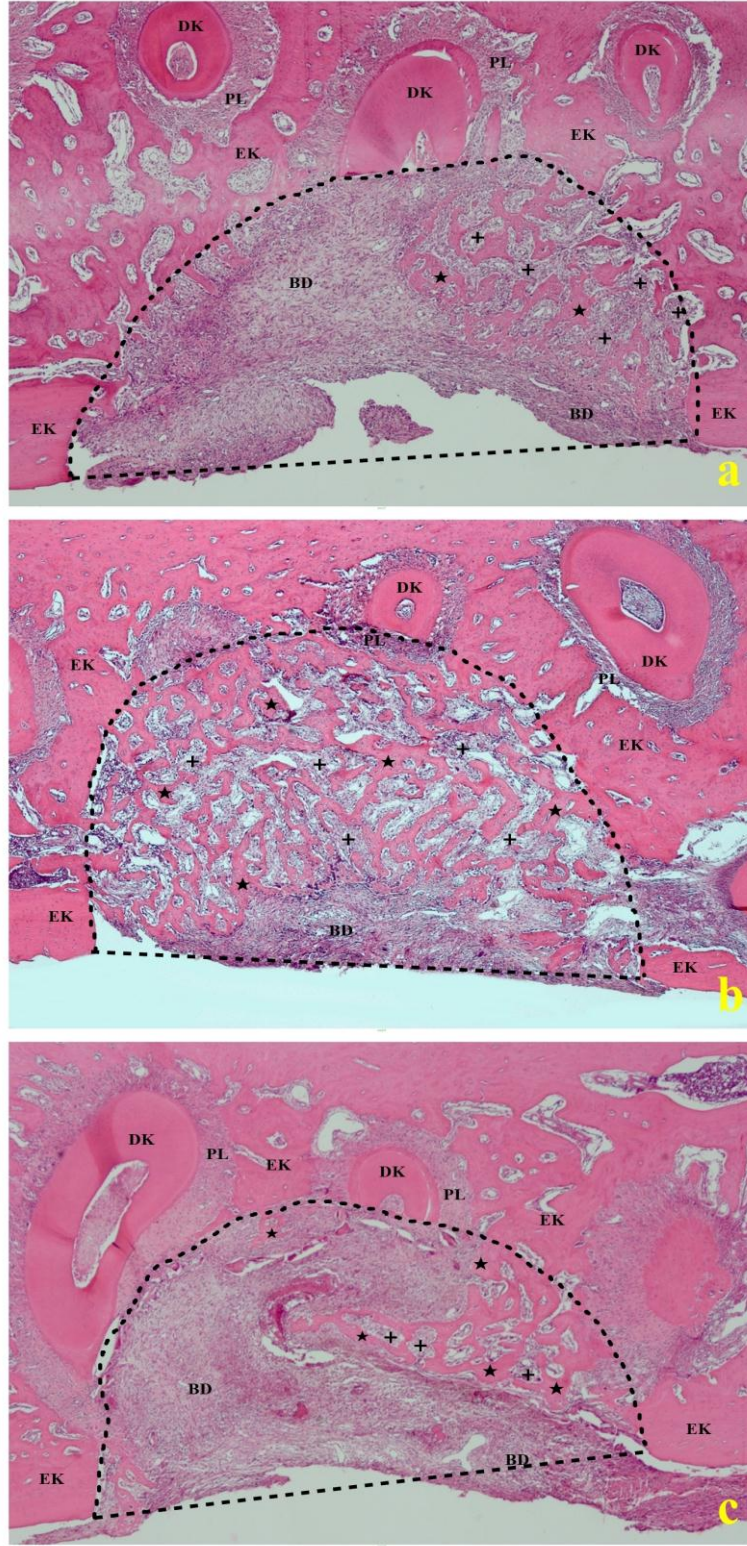
**Tablo 4.** On ve otuzsekiz günlük örneklerde defekt alanı büyüklüğü

	Defekt Alanı Büyüklüğü ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>AKD-10</b>	3,36±0,06 <sup>a</sup>
<b>EMD-10</b>	3,33±0,03 <sup>a</sup>
<b>Kontrol-10</b>	3,31±0,05 <sup>a</sup>
<b>AKD-38</b>	3,32±0,06 <sup>a</sup>
<b>EMD-38</b>	3,40±0,06 <sup>a</sup>
<b>Kontrol-38</b>	3,35±0,06 <sup>a</sup>

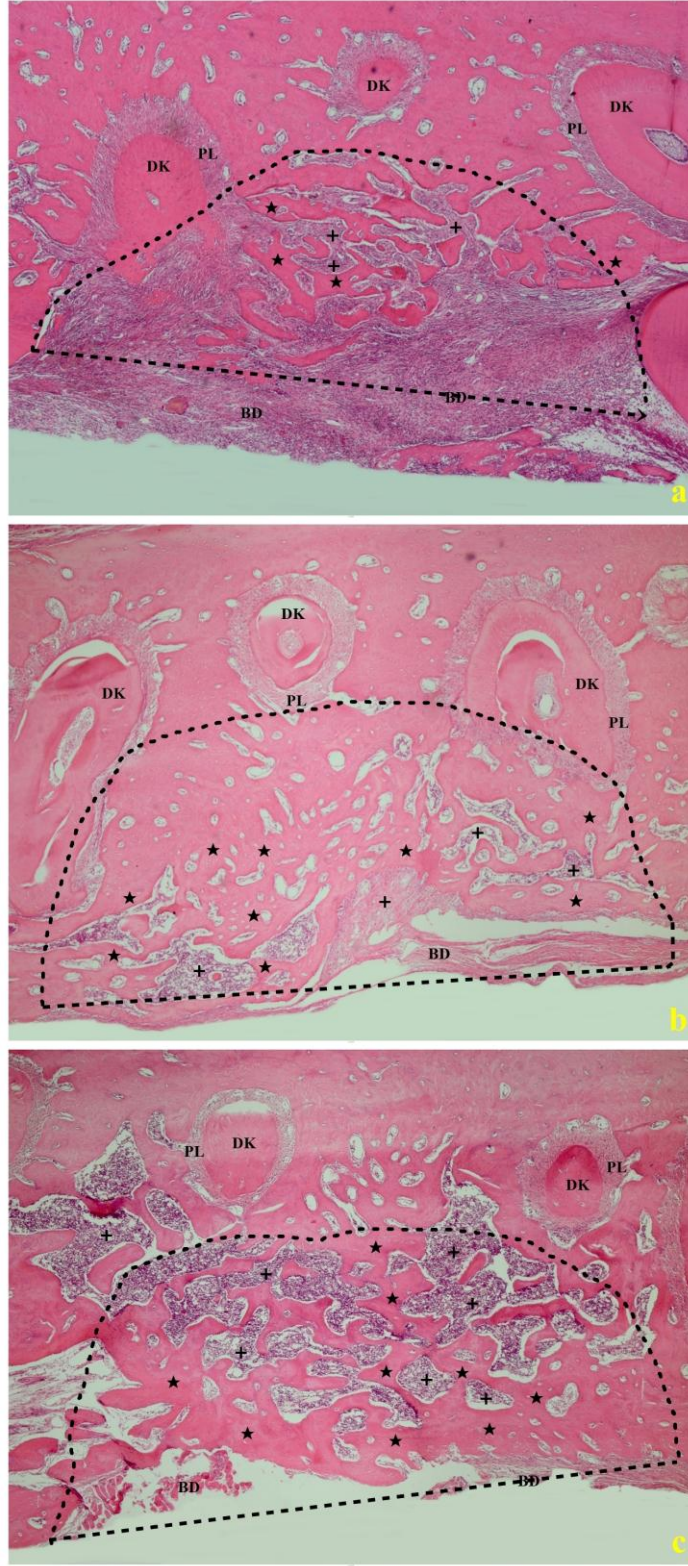
Veriler ortalama±standart hata olarak verildi (n=9).

(One Way Anova,Post Hoc Tukey parametrik testler  $p<0.05$ )

<sup>a</sup> Gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p>0,05$ ).



**Şekil 5.** a) AKD-10 grubunun histolojik kesit örneği b) EMD-10 grubunun histolojik kesit örneği c) Kontrol-10 grubunun histolojik kesit örneği (*x41ük büyütme*) BD: bağ doku, DK: Diş Kökü, EK: Eski Kemik, PL: Periodontal Ligament, çizgili alan: defekt alanı, \*: yeni kemik, +: kemik iliği



**Şekil 6.** a) AKD-38 grubunun histolojik kesit örneği b) EMD-38 grubunun histolojik kesit örneği c) Kontrol-38 grubunun histolojik kesit örneği (*x4lük büyütme*) BD: bağ doku, DK: Diş Kökü, EK: Eski Kemik, PL: Periodontal Ligament, çizgili alan: defekt alanı, \*: yeni kemik, +: kemik iliği



On günlük örneklerin yeni kemik alanı verileri incelendiğinde; çalışma grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi ( $p<0,001$ ). En düşük yeni kemik alanı kontrol grubunda tespit edilirken, en fazla yeni kemik alanı EMD-10 grubunda saptandı. Otuzsekiz günlük örneklerin yeni kemik alanı verileri incelendiğinde; AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmazken EMD-38 grubu ile AKD-38 ve EMD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı ( $p<0,001$ ). 10 ve 38 günlük deney grupları karşılaştırıldığında AKD-10 ile AKD-38 arasında ve EMD-10 ile EMD 38 grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi ( $p<0.05$ ) (Tablo5).

**Tablo 5.** On ve otuzsekiz günlük örneklerde yeni kemik alanı

	Yeni Kemik Alanı ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>AKD-10</b>	0,59±0,02 <sup>a, d</sup>
<b>EMD-10</b>	0,94±0,05 <sup>a, e</sup>
<b>Kontrol-10</b>	0,22±0,02 <sup>a</sup>
<b>AKD-38</b>	1,02±0,08 <sup>b, c, d</sup>
<b>EMD-38</b>	1,85±0,05 <sup>b, e</sup>
<b>Kontrol-38</b>	1,26±0,07 <sup>b, c</sup>

Veriler ortalama±standart hata olarak verildi (n=9).

(One Way Anova, Post Hoc Tukey HSD parametrik testler)

<sup>a</sup> Kısa dönem grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p<0.001$ )

<sup>b</sup> EMD-38 ile AKD-38 ve EMD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p<0.001$ )

<sup>c</sup> AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p>0.05$ )

<sup>d</sup> EMD-10 ile EMD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p<0.05$ )

<sup>e</sup> AKD-10 ile AKD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p<0.05$ )

On günlük örneklerin yeni kemik yüzdesi incelendiğinde; çalışma grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulundu ( $p<0,001$ ). En düşük yeni kemik yüzdesi kontrol grubunda tespit edilirken, en yüksek yeni kemik yüzdesi EMD-10 grubunda saptandı. Otuzsekiz günlük örneklerin yeni kemik yüzdesi incelendiğinde; AKD-38 ile Kontrol-38 grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı ( $p>0.05$ ). EMD-38 grubunda ise yeni kemik yüzdesinin diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu saptandı ( $p<0,001$ ). 10 ve 38 günlük deney grupları birbiri ile karşılaştırıldığında AKD-10 ile AKD-38 arasında ve EMD-10 ile EMD-38 grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık tespit edildi ( $p<0.05$ ) (Tablo 6).

**Tablo 6.** On ve otuzsekiz günlük örneklerde yeni kemik yüzdesi

	Yeni Kemik Yüzdesi (%)
<b>AKD-10</b>	17,78±1,06 <sup>a,d</sup>
<b>EMD-10</b>	25,56±0,58 <sup>a,e</sup>
<b>Kontrol-10</b>	8,89±0,89 <sup>a</sup>
<b>AKD-38</b>	32,56±2,88 <sup>b, c, d</sup>
<b>EMD-38</b>	54,44±0,70 <sup>b, e</sup>
<b>Kontrol-38</b>	30,00 ±2,23 <sup>b, c</sup>

Veriler ortalama±standart hata olarak verildi (n=9).

(One Way Anova,Post Hoc Tukey HSD parametrik testler)

<sup>a</sup> Kısa dönem grupları arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.001)

<sup>b</sup> EMD-38 ile AKD-38 ve Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.001)

<sup>c</sup> AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (p>0.05)

<sup>d</sup> EMD-10 ile EMD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.05)

<sup>e</sup> AKD-10 ile AKD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.05)

Otuzsekiz günlük örneklerin yeni kemik sement kalınlığı incelendiğinde; AKD-38 ile Kontrol-38 grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık bulunmadı (p>0.05). EMD-38 grubunda ise yeni sement kalınlığının diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu saptandı (p<0,001), (Tablo 7).

**Tablo 7.** Otuzsekiz günlük doku örneklerinde yeni sement kalınlığı

	Yeni Sement Kalınlığı (µm)
<b>AKD-38</b>	8,44±0,45 <sup>a,b</sup>
<b>EMD-38</b>	21,16±1,67 <sup>a</sup>
<b>Kontrol-38</b>	4,34±0,66 <sup>a,b</sup>

Veriler ortalama±standart hata olarak verildi (n=9).

(One Way Anova,Post Hoc Tukey parametrik testler)

<sup>a</sup> EMD-38 ile AKD-38 ve Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.001)

<sup>b</sup> AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (p>0.05)

Otuzsekiz günlük örneklerin trabeküler kemik yüzdesi verileri incelendiğinde; AKD-38 ile Kontrol-38 grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmedi. EMD-38 grubunda ise trabeküler kemik yüzdesinin diğer gruplara göre istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu saptandı (p<0,001), (Tablo 8).

**Tablo 8.** Otuzsekiz günlük doku örneklerinde trabeküler kemik yüzdesi

	Trabeküler Kemik Yüzdesi (%)
<b>AKD-38</b>	22,56±2,292 <sup>a,b</sup>
<b>EMD-38</b>	39,67±0,764 <sup>a</sup>
<b>Kontrol-38</b>	17,56±1,132 <sup>a,b</sup>

Veriler ortalama±standart hata olarak verildi (n=9).

(One Way Anova,Post Hoc Tukey parametrik testler)

<sup>a</sup>EMD-38 ile AKD-38 ve EMD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.001)

<sup>b</sup>AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (p>0.05)

## 4.2. İmmünohistokimyasal Bulgular

Defekt bölgesine komşu hücrelerde ekstraselüler matriks proteinlerinden Kollajen-3 ve Osteopontinin immünreaktiviteyi değerlendirildi.

On günlük örneklerin PL hücre, PL matriks ve kemik matriksindeki Kollajen-3 immünreaktivitesi incelendiğinde; AKD grubu ile EMD grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmezken (p>0,017); kontrol grubu ile diğer iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptandı (p<0,017). AKD ile kontrol grubu arasında kemik hücrelerindeki Kollajen-3 immünreaktivitesi arasında istatistiksel anlamlı farklılık yokken (p>0.017); EMD ile kontrol grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı (p<0.017). On günlük örneklerin bağ doku hücrelerindeki Kollajen-3 immünreaktivitesinde, üç çalışma grubu arasında istatistiksel anlamda farklılık bulunmadı (p>0,017) (Şekil 7,9).

Otuzsekiz günlük örneklerde AKD ile kontrol grubu karşılaştırıldığında PL hücre ve matriks, kemik hücre ve matrikste ve bağ doku hücrede Kollajen-3 immünreaktivitesinin benzer olduğu bulundu (p>0.017). EMD grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise PL hücresi, matriksi ve kemik matriksindeki boyanma istatistiksel anlamlı fazla iken (p<0.017), kemik hücresi ve bağ dokudaki boyanmanın benzer olduğu saptandı (p>0.017). İki test grubu karşılaştırıldığında ise kemik hücresi ve bağ dokusu hücre immünreaktivitesi arasında istatistiksel anlamlı farklılık yokken (p>0.017); PL matriksi, PL hücresi ve kemik matrikste ise istatistiksel anlamlı olarak EMD grubunda daha fazla boyanma saptandı (p<0.017) (Şekil 8,10) (Tablo 9 ve 10).

AKD 10 ile AKD 38 grubunun PL matrisi, kemik matrisi ve hücre, bağ doku Kollajen-3 boyanmasının benzer olduğu görülürken ( $p > 0.017$ ); PL hücresi boyanması istatistiksel anlamlı fazla olduğu görüldü ( $p < 0.017$ ). EMD 10 ile EMD 38 grubunun tüm parametrelerde Kollajen-3 boyanmasının benzer olduğu görüldü ( $p > 0.017$ ).

**Tablo 9.** Doku örneklerinin PL matrisi ve PL hücrelerindeki Kollajen-3 immünreaktivitesi

Kollajen-3	PL Matrisi	PL Hücre
AKD 10	2 (2-3) <sup>a, b, e</sup>	3 (2-3) <sup>a, b, f</sup>
EMD 10	3 (2-4) <sup>a, b, g</sup>	3 (3-4) <sup>a, b, g</sup>
Kontrol 10	1 (1-2) <sup>b</sup>	2 (1-2) <sup>b</sup>
AKD 38	2 (1-2) <sup>c, d, e</sup>	1 (1-2) <sup>c, d, f</sup>
EMD 38	3 (2-4) <sup>d, g</sup>	3 (3-4) <sup>d, g</sup>
Kontrol 38	2 (1-2) <sup>c, d</sup>	1 (0-2) <sup>c, d</sup>

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi (n=9).

(Kruskal Wallis, Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U non parametrik testler)

<sup>a</sup> AKD-10 ile EMD-10 arasında PL matrisi ve hücrede istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p > 0.017$ )

<sup>b</sup> Kontrol-10 grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p < 0.017$ )

<sup>c</sup> AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p > 0.017$ )

<sup>d</sup> EMD-38 ile AKD-38 ve kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p < 0.017$ )

<sup>e</sup> AKD-10 ile AKD-38 arasında PL matrisinde istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p > 0.17$ )

<sup>f</sup> AKD 10 ile AKD-38 arasında PL hücrede istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p < 0.017$ )

<sup>g</sup> EMD-10 ile EMD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p > 0.017$ )

**Tablo 10.** Doku örneklerinin kemik iliği, kemik hücresi ve bağ dokusu hücrelerinde Kollajen-3 immünreaktivitesi

Kollajen-3	Kemik Matrisi	Kemik Hücre	Bağ Doku Hücre
AKD-10	2 (1-2) <sup>a, c, i</sup>	1 (0-2) <sup>b, d, i</sup>	2 (2-3) <sup>a, i</sup>
EMD-10	2 (1-2) <sup>a, c, j</sup>	2 (1-2) <sup>b, j</sup>	2 (1-3) <sup>a, j</sup>
Kontrol-10	0 (0-1) <sup>c</sup>	0 (0-1) <sup>b, d</sup>	2 (2-3) <sup>c</sup>
AKD-38	1 (0-2) <sup>e, f, i</sup>	1 (0-2) <sup>g, i</sup>	3 (2-3) <sup>h, i</sup>
EMD-38	2 (2-3) <sup>f, j</sup>	2 (1-2) <sup>g, j</sup>	2 (1-3) <sup>h, j</sup>
Kontrol-38	1 (1-2) <sup>e, f</sup>	0 (0-2) <sup>g</sup>	3 (2-3) <sup>h</sup>

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi (n=9).

(Kruskal Wallis, Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U non parametrik testler)

<sup>a</sup> AKD-10 ile EMD-10 arasında kemik matrisinde ve bağ dokuda istatistiksel anlamlı fark yok ( $p > 0.017$ )

<sup>b</sup> EMD-10 ile Kontrol-10 ve EMD10 ile AKD-10 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p < 0.017$ )

<sup>c</sup> Kontrol-10 grubuna göre istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p < 0.017$ )

<sup>d</sup> AKD-10 ile Kontrol-10 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p > 0.017$ )

<sup>e</sup> AKD-38 ile Kontrol 38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p > 0.017$ )

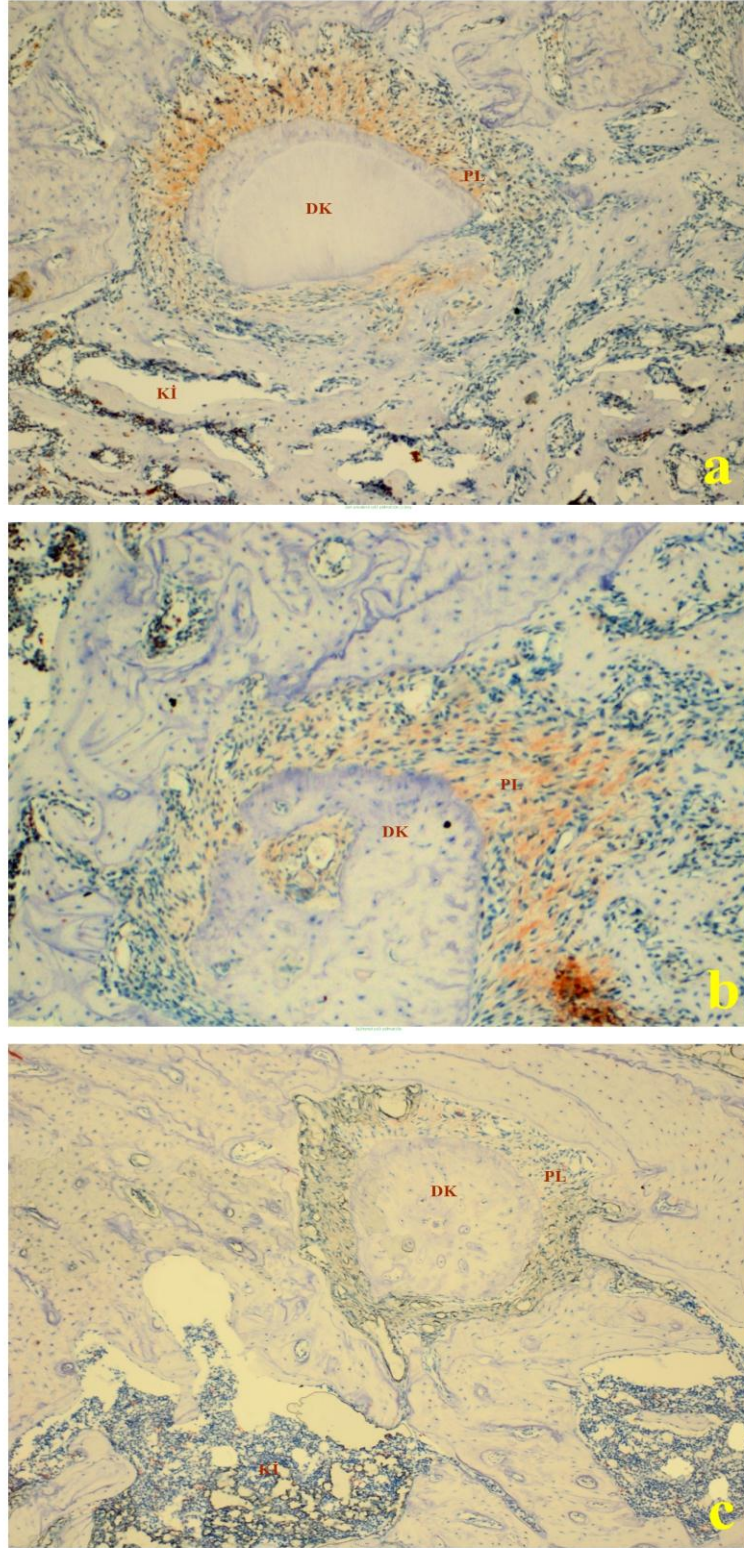
<sup>f</sup> EMD-38 ile AKD38 ve EMD38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p < 0.017$ )

<sup>g</sup> 38 günlük gruplar arasında kemik hücrede fark yok ( $p > 0.017$ )

<sup>h</sup> AKD-38 ile EMD-38 ve AKD ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p < 0.017$ )

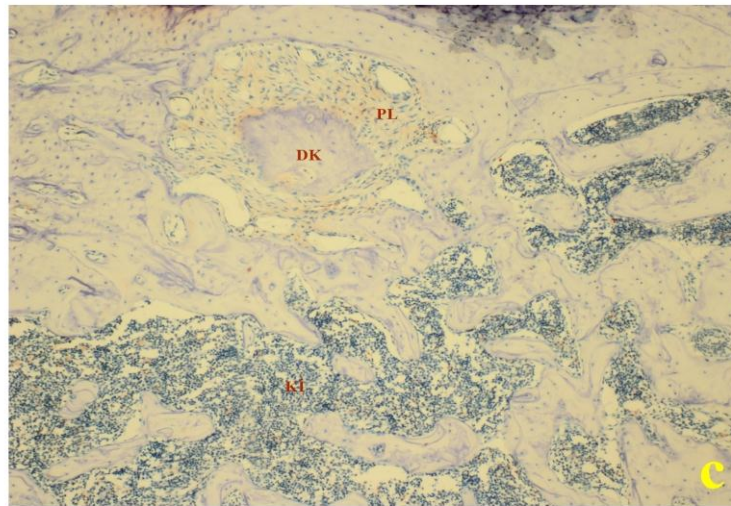
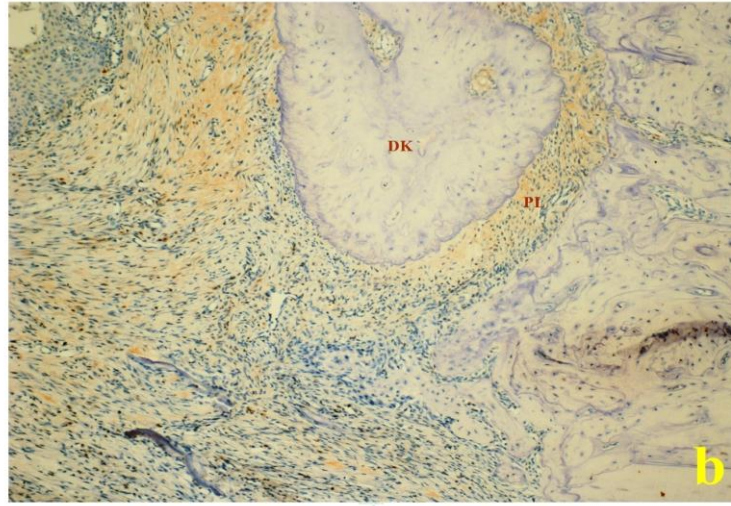
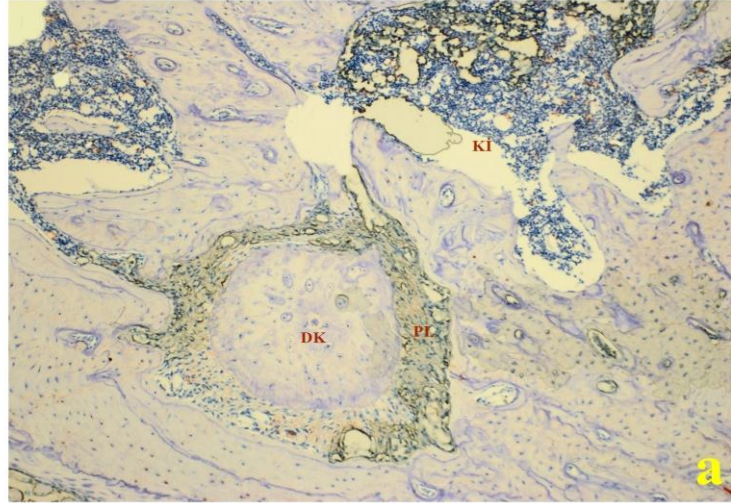
<sup>i</sup> AKD-10 ile AKD-38 arasında kemik hücre, kemik matrisi, bağ dokuda istatistiksel anlamlı fark yok.

<sup>j</sup> EMD-10 ile EMD-38 arasında kemik hücre, kemik matrisi, bağ dokuda istatistiksel anlamlı fark yok.

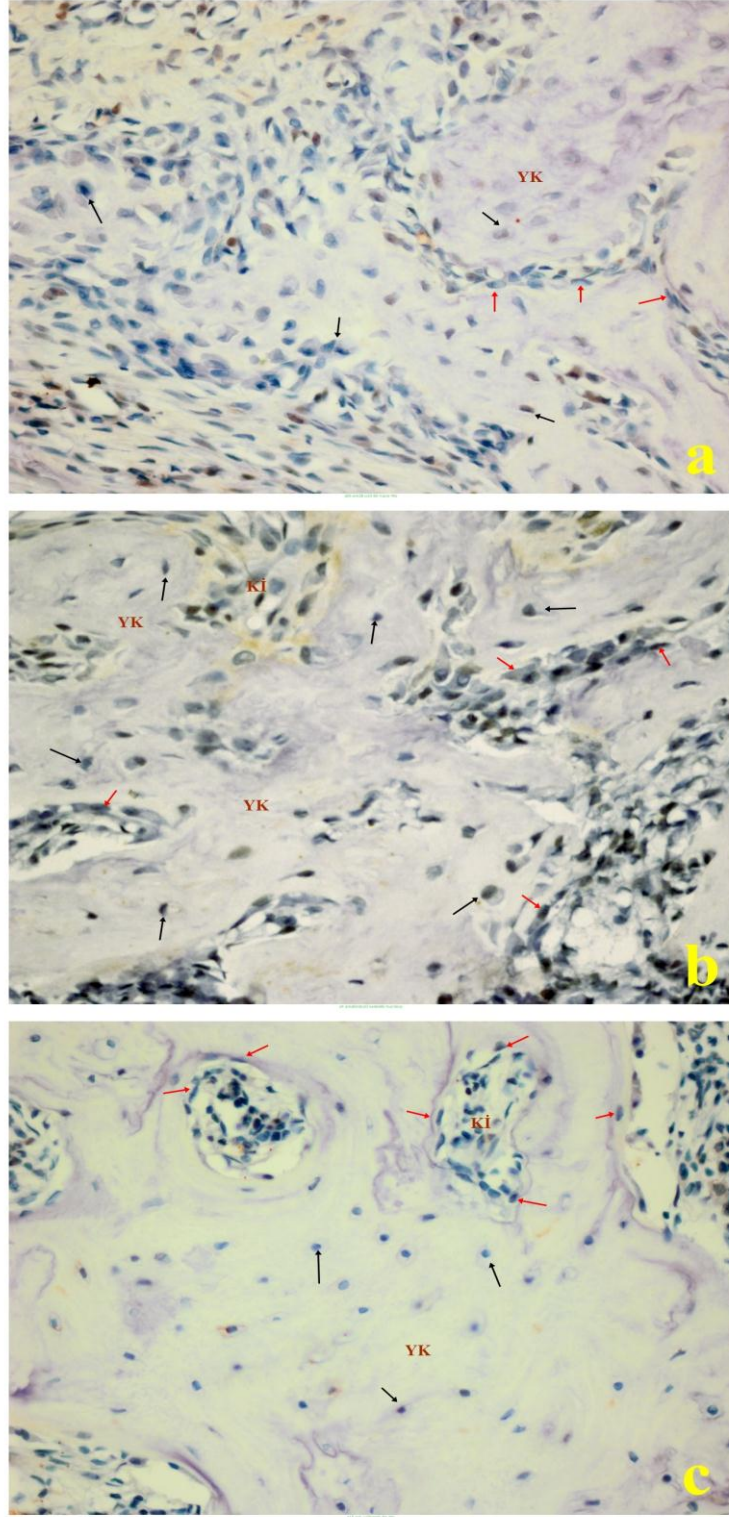


**Şekil 7.** a) AKD-10 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu b) EMD-10 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu c) Kontrol-10 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu (*x10luk büyütme*) DK: Diş kökü, KI; Kemik iliği, PL: Periodontal ligament



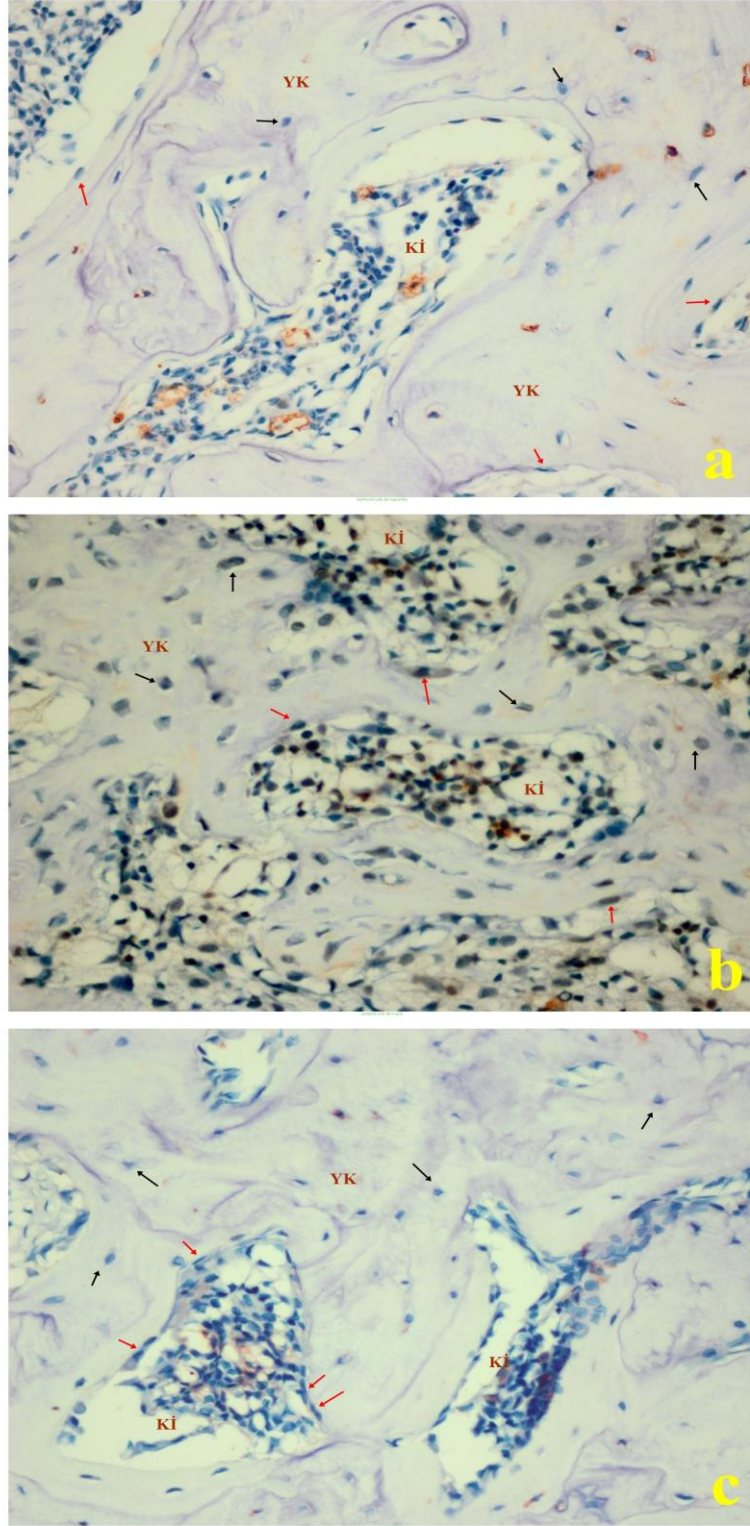


**Şekil 8.** a) AKD-38 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu b) EMD-38 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu c) Kontrol-38 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu (*x10luk büyütme*) DK: Diş kökü, KI: Kemik iliği, PL: Periodontal ligament



**Şekil 9.** a) AKD-10 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu b) EMD-10 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu c) Kontrol-10 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu (*x40lık büyütme*) Kİ: Kemik iliği, YK: Yeni kemik, Kırmızı ok: Osteoblast, Siyah ok: Osteosit





**Şekil 10.** a) AKD-38 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu b) EMD-38 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu c) Kontrol-38 grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu (*x40lık büyütme*) Kİ: Kemik iliği, YK: Yeni kemik, Kırmızı ok: Osteoblast, Siyah ok: Osteosit

On günlük örneklerin OPN immünreaktivitesi incelendiğinde; AKD ile kontrol grubu arasında PL hücre ve matriks, kemik hücre ve matriks ve bağ dokuda istatistiksel anlamlı farklılık bulunmazken ( $p>0,017$ ); EMD ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bütün parametrelerde EMD lehine istatistiksel anlamlı farklılık bulundu ( $p<0,017$ ). İki test grubu karşılaştırıldığında ise EMD grubundaki OPN immünreaktivitesinin AKD'ye göre istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu görüldü ( $p<0,017$ ) (Tablo 11, 12) (Şekil 11,13).

Otuzsekiz günlük örneklerin OPN boyanma miktarları incelendiğinde; AKD ile kontrol grubunda bütün parametrelerde benzer immünreaktivite bulundu ( $p>0,017$ ). EMD grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PL matriksi, kemik matriksi ve bağ doku OPN immünreaktivitesi istatistiksel anlamlı fazla iken PL hücre ve kemik hücre boyanmalarının benzer olduğu görüldü ( $p>0,017$ ). İki test grubu karşılaştırıldığında PL matriksi, kemik matriksi ve kemik hücre immünreaktivitesi EMD grubunda istatistiksel anlamlı daha fazla bulundu ( $p<0,017$ ) (Tablo 11, 12) (Şekil 12,14).

AKD 10 ile AKD 38 grubu ve EMD-10 ve EMD-38 grubu karşılaştırıldığında OPN immünreaktivitesinin bütün parametrelerde benzer olduğu görüldü ( $p>0,017$ ).

**Tablo 11.** Doku örneklerinin PL matriks ve PL hücresindeki Osteopontin immünreaktivitesi

OPN	PL Matriks	PL Hücre
<b>AKD-10</b>	2 (2-3) <sup>a,b,f</sup>	2 (2-3) <sup>a,b,f</sup>
<b>EMD-10</b>	3 (3-4) <sup>b,g</sup>	3 (2-4) <sup>b,g</sup>
<b>Kontrol-10</b>	2 (1-3) <sup>a,b</sup>	2 (1-2) <sup>a,b</sup>
<b>AKD-38</b>	2 (1-3) <sup>c,d,f</sup>	2 (2-3) <sup>e,f</sup>
<b>EMD-38</b>	4 (3-4) <sup>d,g</sup>	3 (2-3) <sup>e,g</sup>
<b>Kontrol-38</b>	2 (1-2) <sup>c,d</sup>	2 (1-3) <sup>e</sup>

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi (n=9).

(Kruskal Wallis, Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U non parametrik testler)

<sup>a</sup> AKD-10 ile Kontrol-10 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p>0,017$ )

<sup>b</sup> EMD-10 ile AKD-10 ve EMD-10 ile Kontrol-10 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p<0,017$ )

<sup>c</sup> AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p>0,017$ )

<sup>d</sup> EMD-38 ile AKD-38 ve EMD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var ( $p<0,017$ )

<sup>e</sup> 38 günlük gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p>0,017$ )

<sup>f</sup> AKD 10 ile AKD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p<0,017$ )

<sup>g</sup> EMD-10 ile EMD-38 arasında PL matriks ve hücrede istatistiksel anlamlı farklılık yok ( $p>0,017$ )

**Tablo 12.** Otuzsekiz günlük doku örneklerinin Osteopontin boyanma miktarları

OPN	Kemik matriksi	Kemik Hücre	Bağ Doku Hücre
<b>AKD-10</b>	2 (2-3) <sup>a,b,i</sup>	1 (0-2) <sup>a,b,i</sup>	2 (2-3) <sup>a,b,i</sup>
<b>EMD-10</b>	3 (3-4) <sup>b,i</sup>	3 (2-4) <sup>b,i</sup>	2 (1-2) <sup>b,i</sup>
<b>Kontrol-10</b>	2 (1-3) <sup>a,b</sup>	2 (1-3) <sup>a,b</sup>	3 (2-4) <sup>a,b</sup>
<b>AKD-38</b>	2 (2-3) <sup>c,d,i</sup>	1 (1-2) <sup>e,f,i</sup>	2 (2-3) <sup>g,i</sup>
<b>EMD-38</b>	4 (3-4) <sup>d,i</sup>	2 (2-3) <sup>e,f,i</sup>	2 (1-2) <sup>g,h,i</sup>
<b>Kontrol-38</b>	3 (2-3) <sup>c,d</sup>	2 (1-2) <sup>f</sup>	3 (3-4) <sup>g,h</sup>

Veriler ortanca (minimum-maksimum) olarak verildi (n=9).

(Kruskal Wallis, Bonferroni Düzeltmeli Mann Whitney U non parametrik testler)

<sup>a</sup> AKD-10 ile Kontrol-10 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (p>0.017)

<sup>b</sup> EMD-10 ile AKD-10 ve EMD-10 ile Kontrol-10 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.017)

<sup>c</sup> AKD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (p>0.017)

<sup>d</sup> EMD-38 ile AKD-38 ve EMD-38 ile Kontrol 38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.017)

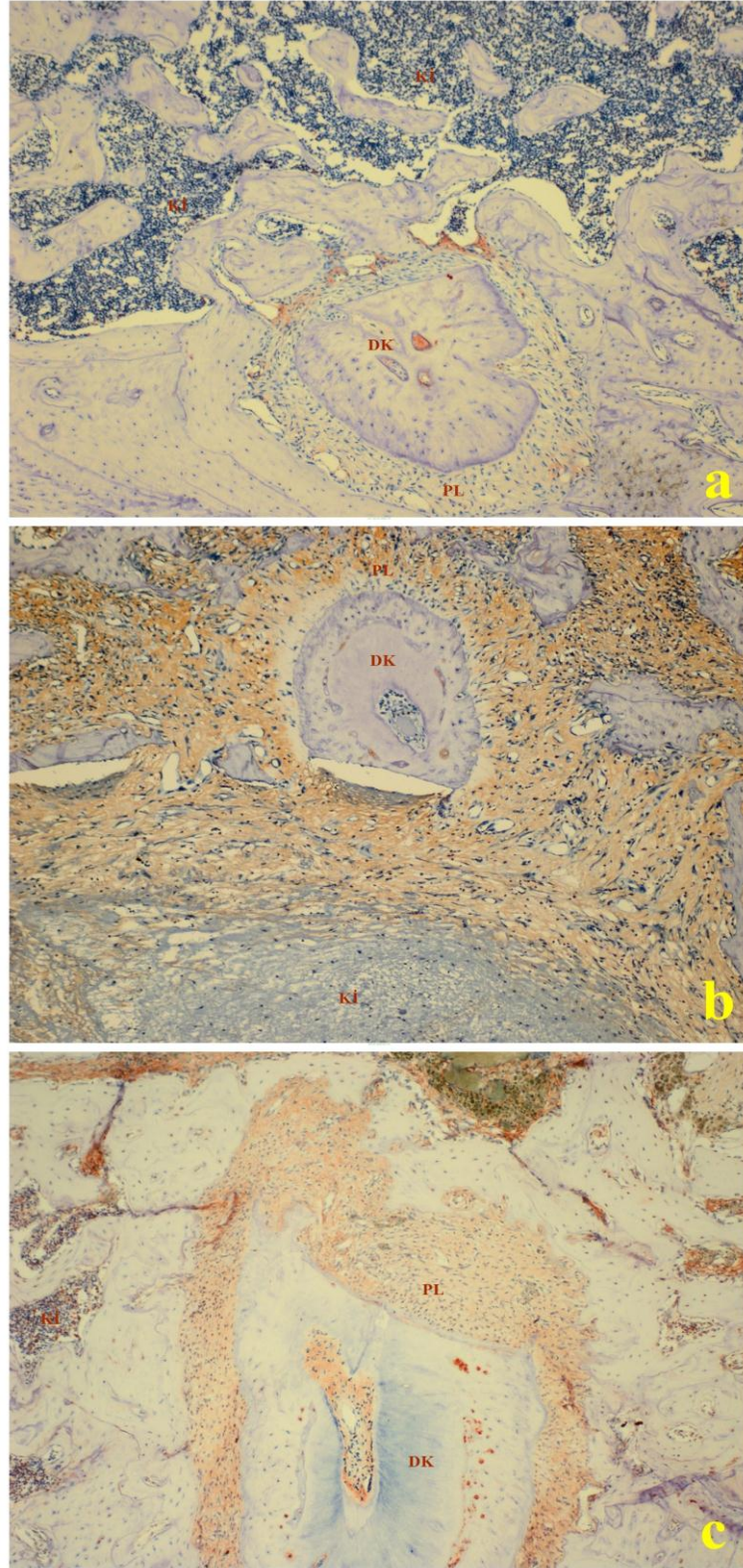
<sup>e</sup> AKD-38 ile EMD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık var (p<0.017)

<sup>f</sup> Kontrol 38 ile EMD-38 ve Kontrol-38 ile AKD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok(p>0.017)

<sup>g</sup> AKD-38 ile Kontrol-38 ve EMD-38 istatistiksel anlamlı farklılık yok (p>0.017)

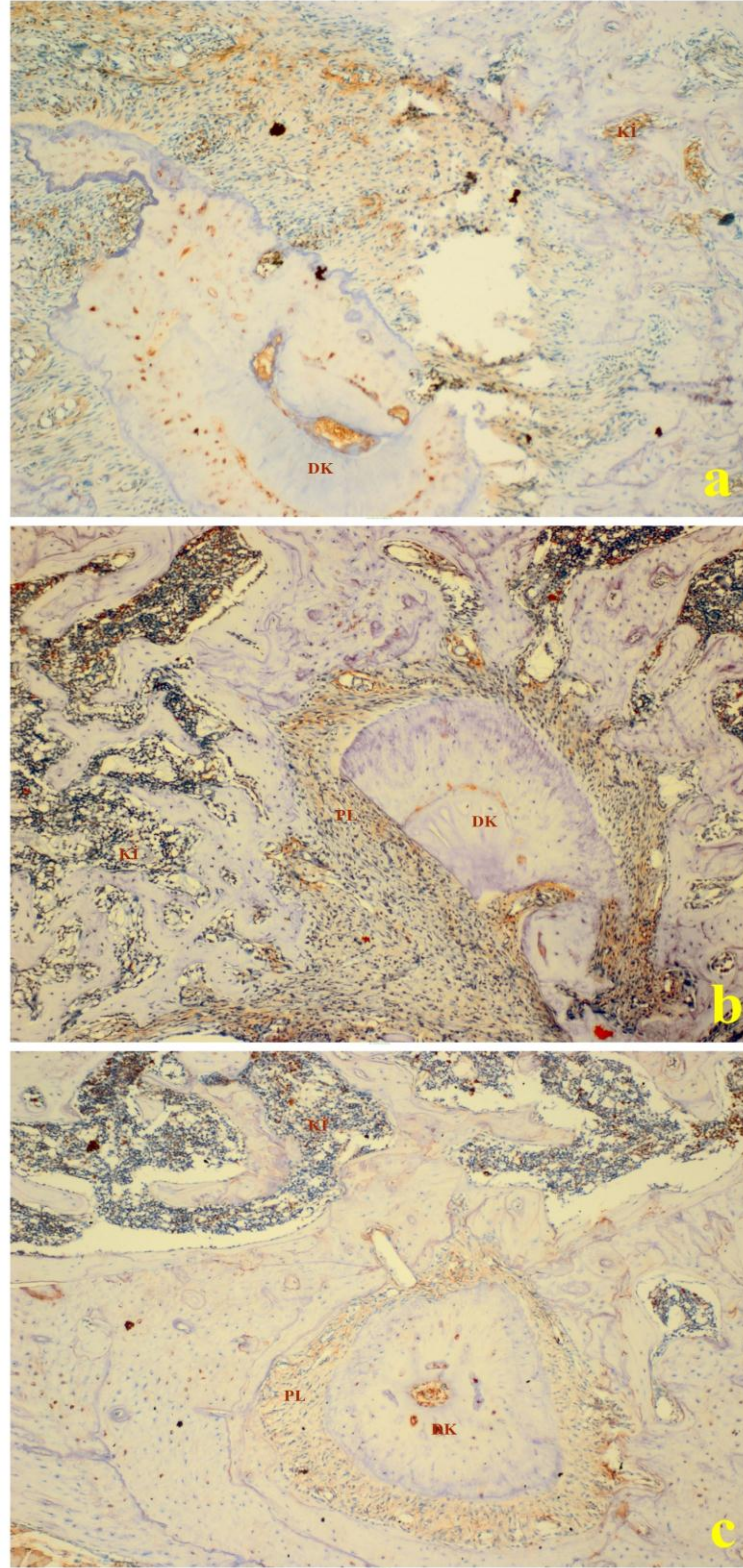
<sup>h</sup> EMD-38 ile Kontrol-38 arasında istatistiksel anlamlı fark var (p<0.017)

<sup>i</sup> AKD-10 ile AKD-38 ve EMD-10 ile EMD-38 arasında istatistiksel anlamlı farklılık yok (p>0.017)

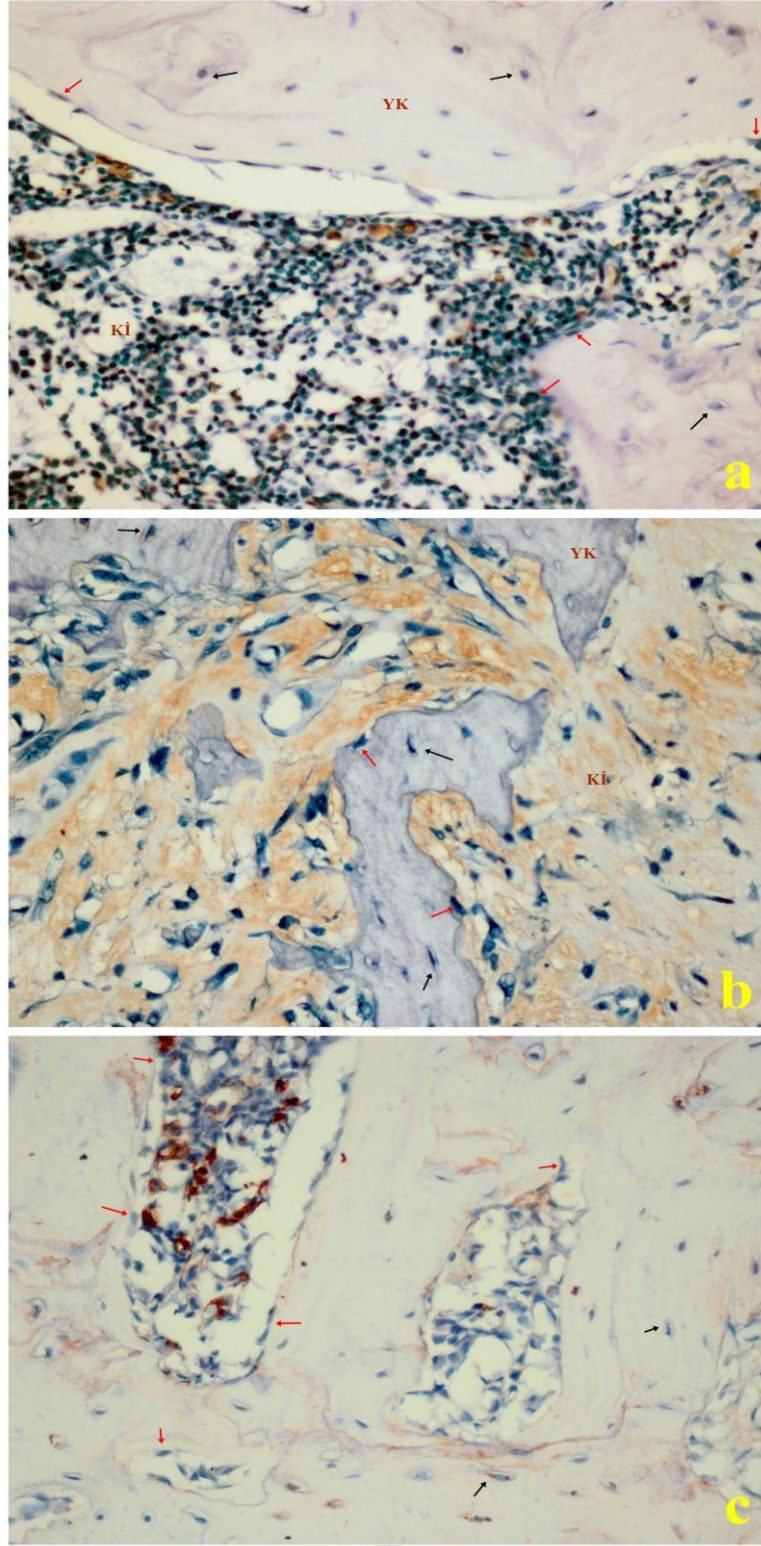


**Şekil 11.** a) AKD-10 grubundaki OPN ekspresyonu b) EMD-10 grubundaki OPN ekspresyonu c) Kontrol-10 grubundaki OPN ekspresyonu (*x10luk büyüme*) DK: Diş kökü, Kİ; Kemik iliği, PL: Periodontal ligament



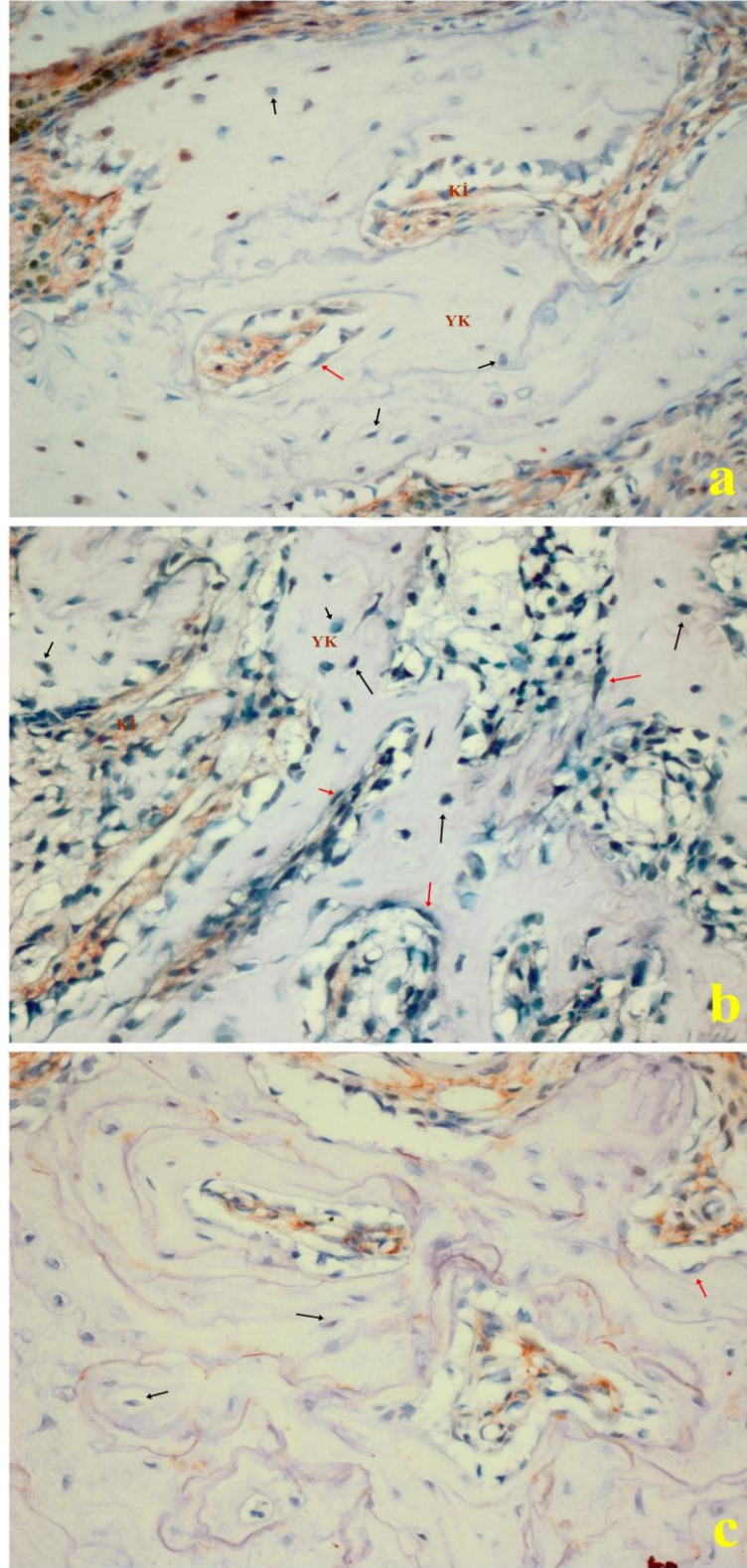


**Şekil 12.** a) AKD-38 grubundaki OPN ekspresyonu b) EMD-38 grubundaki OPN ekspresyonu c) Kontrol-38 grubundaki OPN ekspresyonu (*x10luk büyütme*) DK: Diş kökü, KI; Kemik iliği, PL: Periodontal ligament



**Şekil 13.** a) AKD-10 grubundaki OPN ekspresyonu b) EMD-10 grubundaki OPN ekspresyonu c) Kontrol-10 grubundaki OPN ekspresyonu (*x40lık büyütmeye*) Kİ: Kemik iliği, YK: Yeni kemik, Kırmızı ok:Osteoblast, Siyah ok: Osteosit





**Şekil 14.** a) AKD-38 grubundaki OPN ekspresyonu b) EMD-38 grubundaki OPN ekspresyonu c) Kontrol-38 grubundaki OPN ekspresyonu (*x40lık büyütme*) Kİ: Kemik iliği, YK: Yeni kemik, Kırmızı ok: Osteoblast, Siyah ok: Osteosit

## 5. TARTIŞMA

Çağdaş periodontal tedavinin hedefi olan periodontal rejenerasyonu saptamak için pek çok tedavi yöntemi ve materyal geliştirilmiş ve geliştirilmektedir. Bu amaçla geliştirilmiş materyallerin periodontal rejenerasyondaki başarısı değişken olup bugün halen bütün defekt tiplerinde öngörülebilir bir şekilde kullanılabilir ideal bir materyal ya da yöntem bulunmamaktadır (Bartold ve ark., 2000). Son yıllarda doku mühendisliği alanında yaşanan gelişmeler ile birlikte Tıp ve Diş Hekimliği'nde de paralel gelişmeler yaşanmış, kaybedilmiş dokuların kazanılması amacıyla çeşitli materyal ve yöntemler geliştirilmiştir (Weishaupt ve ark., 2008). Kemik defektlerinin onarım sürecini hızlandırarak tedavi sürecini kısaltmak, böylelikle hasta konforunu arttırmak amacıyla birçok çalışma yapılmış ve halen yapılmaya devam etmektedir (Wilczewska ve ark., 2010; Vertenten ve ark., 2010). Mevcut tedavi yöntemlerinin dezavantajları göz önünde bulundurulduğunda bu alanda yeni materyallerin ve yeni yöntemlerin arayışı devam etmektedir. Biz de bu nedenle sıçanlarda oluşturduğumuz fenestrasyon defektlerinde bir ajan olan AKD'nin periodontal rejenerasyona etkisini araştırmayı amaçladık. Bu amaçla ilk defa kullanılacak bu ajanın oluşturulan defektlerin rejenerasyonuna etkisini periodontolojide başarısını kanıtlamış bir doku mühendisliği ajanı olan MMP ile karşılaştırdık. Fenestrasyon defektlerinde AKD'nin kemik doku iyileşmesi üzerine etkisinin değerlendirildiği tez çalışmasının sonucunda AKD'nin erken dönem yeni kemik oluşumu ve yüzdesini arttırdığını fakat geç dönem yeni kemik oluşumu ve yüzdesine etki etmediği görülmüştür. AKD'nin yeni sement oluşumuna etkisinin olmadığı görülmüştür.

Kemik defektlerinin rekonstrüksiyonunda yıllardır başarıyla kullanılmakta olan kemik greftleri, defekte destek olan ve biyolojik onarımı hızlandıran materyallerdir (Calori ve ark., 2011). Otojen kemik greftleri osteokondüktif, osteoindüktif ve osteojenik özelliklerin tümünü içeren tek greft materyali olması sebebiyle günümüzde halen "altın standart" olarak değerlendirilmektedir (Rossi ve ark., 2012; Dumitrescu, 2011; Allegrini ve ark., 2008). Otojen kemik greftlerinin; ikinci bir cerrahi alan oluşturma, operasyon zamanını uzatma, kanama miktarını arttırma, donör saha komplikasyonları riski bulundurma ve yeterli miktarda kemik grefti sağlayamama gibi bir takım dezavantajları bulunmaktadır (Kalfas, 2001). Bu dezavantajları nedeniyle kemik defektlerinin rejeneratif tedavisinde ksenogreftler, allogreftler, alloplastik

materyaller, rejeneratif bariyer membranlar, kemik yapımını stimüle edici bazı materyaller ve büyüme faktörleri gibi materyaller otojen greftlere alternatif olarak kullanılmaktadır (Palmer ve Cortellini, 2008). Bu amaçla geliştirilen materyallerden biri de kök gelişimi sırasında gerçekleşen olayları taklit eden MMP'dir. Bu proteinlerin 2 ticari preparatından biri olan EMD uygulamasının selektif hücre ataşmanı, hücre proliferasyonu ve göçünü başlatarak, ideal rejenerasyonu sağladığı kabul edilmektedir. (Hammarström ve ark., 1997; Hammarström, 1997; Robinson ve ark., 1998). Bu materyalin sağladığı ataşman kazancı, yeni sement, PL ve yeni kemik oluşumu gibi kazanımlar rejeneratif tedavilerde yeni bir yaklaşımın önünü açmıştır. Bu amaçla yapılmış çalışmaları geçmişten bugüne kadar incelediğimizde EMD, periodontal dokuların rejenerasyonu için geniş çaplı kullanılan bir materyaldir (Palmer ve Cortellini, 2008). EMD'nin osteojenik aktivitesi de alveol kemiğindeki defektler üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gestrelus ve ark., 1997a; Hejil, 1997; Hejil ve ark., 1997; Sculean ve ark., 2006). EMD klinikte yaygın kullanıma girmeden önce antijenik özelliklerinin anlaşılabilmesi için çeşitli araştırmalara tabi tutulmuştur (Brookes ve ark., 1995; Heard ve ark., 1997; Zetterström ve ark., 1997; Petinaki ve ark., 1998; Spahr ve ark., 2002). EMD domuz embriyosundan elde edilmesi nedeniyle, ksenogreft olarak kabul edilmektedir, ancak mine matriks türevleri bir çok memeli türünde benzer olduğundan antijenik herhangi bir reaksiyon oluşturmamaktadır (Schonfeld, 1975; Brooks ve ark., 1995). EMD'in immün cevaba olan etkisi *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarla araştırılmış, temel deri testlerindeki etkisinin negatif olduğu rapor edilmiştir. IgG, IgE, IgA ve IgM antikor seviyeleri değerlendirilmiş, ancak antikor cevaplarında cerrahi öncesi ve sonrası bir fark bulunmamıştır (Zetterström ve ark., 1997). *In-vitro* çalışmalarda EMD kullanımıyla immünooglobulin üretimi saptanmamış, fakat periferik kan lenfositlerinden olan T ve B lenfositlerin aktivasyonunda az da olsa artış tespit edilmiştir. Bu artışın önemli olup olmadığı henüz bilinmemektedir (Petinaki ve ark., 1998). EMD çalışmalarında herhangi bir alerjik reaksiyon rapor edilmediği gibi apse, enfeksiyon gibi ciddi postoperatif reaksiyonlara neden olmadığı belirtilmiştir (Zetterström ve ark., 1997). EMD tedavisi sonucunda bu yan etkiler oluşmadığı gibi birçok araştırmacı yara iyileşmesinin hızla geliştiğini ifade etmişlerdir (Mellonig, 1999; Rasperini ve ark., 1999; Yılmaz ve ark., 2003). EMD'nin taşıyıcı solüsyonu olan PGA'nın periodontal patojenler üzerindeki antimikrobiyal etkisinin de tedavi sonucu

elde edilen olumlu özelliklere katkısı olabileceğini ifade eden çalışmalar mevcuttur (Heard ve ark., 1999; Spahr ve ark., 2002). Bizim çalışmamız da, benzer şekilde herhangi bir grupta yabancı cisim reaksiyonu ya da alerjik reaksiyon görülmedi.

Kanama kontrolü cerrahinin temel prensiplerinin başında gelmektedir (Lekic ve ark., 1996). Kanama kontrolü özellikle koagulopatisi olan hastalarda daha da önem kazanmaktadır. Kanamanın durdurulmasında zaman içerisinde mekanik, termal ve kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Diş Hekimliği cerrahisi içerisinde halen kullanılmakta olan farklı türde kanama durdurucu ajanlar bulunmaktadır. Kanama durdurucu ajanların geliştirilmesi ile kanama kontrolünün daha hızlı ve etkin yapılabilmesi sağlanmaktadır. Diş Hekimliği pratiğinde en sık kullanılan kanama durdurucu ajanların başında selüloz kaynaklı ajanlar gelmektedir (Oto ve ark., 1999).

Günümüzde kanama kontrolü için yeni kanama durdurucu ajanlar üretilmektedir. Çalışmamızda kullandığımız AKD yakın zamanda literatüre girmiş bitkisel kaynaklı bir ajandır. Yeni bir madde olmasına karşın bu ajanın kullanımı ile ilgili tıpta değişik alanlarda yapılan çalışmalar mevcuttur (Goker ve ark., 2008; İşler ve ark., 2008; Erçetin ve ark., 2010). Goker ve ark. (2008); AKD etki mekanizması üzerine yaptıkları çalışmada koagülasyon faktörlerinin (II,V,VII,VIII,IX, X,XI,XIII) plazmaya AKD ilavesinden etkilenmediğini bu maddenin protein ağı oluşturarak eritrosit agregasyonuna neden olduğunu göstermişlerdir. Bu nedenle AKD hem normal hemostatik değerlere sahip bireylerde hem de koagulopatisi olan bireylerde etkilidir. Erçetin ve ark. (2010), AKD'nin periodontal cerrahi ve diş çekimlerinde lokal hemostaz, yara iyileşmesi ve enfeksiyon kontrolü için yararlı olabileceğini bildirmişlerdir. AKD'nin kanama durdurucu ajan olarak üretilmiş olmakla birlikte, kemik doku üzerinde iyileşmeyi hızlandırıcı etkilerinin de olduğu bildirilmiştir (İşler ve ark. 2008). Sıçanlar üzerinde yapılan bu çalışmada AKD'nin 7. gün sonucunda histopatolojik olarak kemik yüzeylere etkisi incelenmiş ve AKD grubunda yeni kemik oluşumunun kontrol grubundan istatistiksel anlamlı yüksek olduğu bildirilmiştir. AKD uygulamasının erken dönem kemik dokusu iyileşmesini olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır. Kanama durdurucu ajanların kendi etkinlikleri haricinde kemik oluşumunu hızlandırıcı özellik göstermesi kemik defektlerinin tedavisinde alternatif bir yol olarak düşünülebilir.

Rejeneratif tedavilerin etkinliğini değerlendirmek için yapılan incelemeler çoğunlukla cep derinliği, klinik ataşman seviyesi, sondalanabilir kemik seviyesi, tedavi öncesi ve sonrası alınan radyografiler ve “reentry” cerrahi işlemi gibi klinik ve radyolojik kayıtları içermektedir (Wikesjö ve ark., 1994). Bu kayıtlar ile alınan pozitif sonuçlar periodontal rejenerasyonu göstermek için yeterli değildir, ancak histolojik inceleme ile gerçek anlamda rejenerasyon oluşup oluşmadığını ortaya koymak mümkündür (Koo ve ark., 2004; Camargo ve ark., 2005).

Alveol kemiğindeki defektin morfolojisi, homojenitesi ve kalan PL; kemik ve sement rejenerasyonunu, bağ dokusu tamirini ve epitelizeasyonu histolojik olarak değerlendirmede kritik öneme sahiptir (Wikesjö ve ark., 1994). Deneysel çalışmaların en önemli avantajı eşit boyutta birbirinin aynısı defektlerin oluşturulabilme şansı olmasıdır (Selvig 1994). Deneysel çalışmalarda oluşturulan standardize edilmiş defektler, doğal oluşan defektlere göre iyileşme için eşit şartların oluşumunu daha fazla sağlamaktadır. Bunun iki nedeni vardır; birincisi, doğal defektler çok geniş bir yelpazede değişen defekt boyutlarına ve dişeti morfolojisine sahiptir. Aynı zamanda, doğal defektler ağız içinde değişik alanlarda rastgele lokalize olabildikleri için spesifik bir dişi bütün incelemelerde kullanmak mümkün olmayabilir (Wikesjö ve ark., 1994). İkincisi; insan biyopsileri ile gösterilen periodontal rejenerasyon, uygulanan tedavinin gerçek biyolojik potansiyelini yansıtabildiği gibi bu sonuç aynı zamanda defektin doğal rejeneratif potansiyelinin de bir göstergesi olabilir. Bu iki farklı ihtimalin ayrımını yapmak, eşleştirilmiş bir kontrol grubunun olmaması nedeniyle pek mümkün değildir. Ayrıca insan biyopsilerinde gösterilen bir başarısızlık bu tedavinin biyolojik potansiyelinin olmadığı anlamına gelmemektedir, nitekim diğer bir defekt veya anatomik yerleşim aynı tedaviye daha iyi yanıt verebilir (Wikesjö ve ark., 1994). Sonuç olarak, insan biyopsilerinde defekt tipinin ve lokalizasyonunun değişkenliği bu biyopsilerin bilgi değerini sınırlandırmakta, periodontal rejeneratif işlemlerin etkinliğini incelemeyi ve sonuçları yorumlamayı karmaşık hale getirmektedir. Bu nedenle insanlarda yapılan histolojik çalışmalarda elde edilen sonuçlar; spesifik bir rekonstrüktif protokolün biyolojik potansiyelini sadece desteklemekte, ancak etkinliğini ve güvenilirliğini tam olarak göstermemektedir (Wikesjö ve ark., 1994). Bütün bu olumsuzluklar değerlendirildiğinde, araştırmacılar prelinik modellere yönelmişler ve

rejeneratif periodontal tedavilerin uygulanıp periodontal dokulardan kesitler alınabilecek güvenilir hayvan modelleri geliştirmişlerdir.

Sıçanlar; küçük, ucuz ve kolay elde edilebilir olmaları nedeniyle deneysel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen türlerdir (Pellergrini ve ark., 2009). İnsan ve sıçanların molar diş bölgelerindeki periodontal dokuların (oral epitel, sulkuler epitel, birleşim epiteli, PL, alveol kemiği, hücreli ve hücretsiz sement) organizasyon ve yapısal açıdan benzerlik gösterdiği bildirilmiştir (Pellergrini ve ark., 2009). Bununla birlikte sıçanlarda oluşturulan deneysel periodontitisin insanlarda görülen periodontal hastalıklar ile klinik ve histolojik olarak benzer bulgular gösterdiği de belirlenmiştir (Klausen, 1991; Graves ve ark., 2008). Ayrıca, sıçanlarda genetik yatkınlık, yaş, cinsiyet, doz ve ilacın uygulanma yolları gibi bazı önemli değişkenler kontrol altına alınabilmektedir (Benatti ve ark., 2006; Graves ve ark., 2008; Nassar ve ark., 2008). Bu bilgiler ışığında bu çalışmada deney hayvanı olarak erkek Wistar sıçanlar (10-12 haftalık ve vücut ağırlıkları 280-300g) kullanıldı.

Biyolojik maddelerin etkilerini değerlendirmek amacı ile farklı deneysel modeller kullanılmıştır. Fakat tedavinin esas etkilerini değerlendirmek defekt modellerinin kendi içindeki ve aralarındaki farklılıklardan (bakteriyel plak, epitel göçü, yara yeri travması vs.) dolayı zordur. Periodontal fenestrasyon tipi defektin bu tip faktörlerin etkilerini ortadan kaldırmada etkili olacağı bildirilmiştir (Choi ve ark., 1993; Arpak ve ark., 1996; Pellegrini ve ark., 2009). Akut fenestrasyon tipi defekt modeli farklı terapötik işlemler sonrasında erken iyileşme evrelerini incelemeye sıklıkla kullanılmaktadır (Selvig ve ark., 1996; Tal ve ark., 1996; Caplanis ve ark., 1998). Bu tip defektler biyomateryallerin, kök yüzeyi biyomodifikasyonlarının ve ekstraselüler matriks faktörlerinin etkilerini göstermek amacı ile kullanılmıştır (Karring ve ark., 1993). Bu defekt modelinde, defekt boşluğu tamamen periodontal dokular ile çevrelenmektedir ve progenitör hücrelerin defekt kenarlarından defekt içine doğru çoğalmasına imkân tanımaktadır. Fenestrasyon defektlerinde defektin lokalizasyonu itibarıyla flebin ayrılması, membranın açığa çıkması ve mikrobiyal dental plak oluşumu söz konusu olamayacağından enflamasyon ve enfeksiyon riski de azaltılmıştır. Bu sebeple yara stabilitesi optimal olarak sağlanacaktır (Pettersen ve Aukhil, 1986; Caton ve ark., 1987; Claffey ve ark., 1989; Tal ve ark., 1996; Caplanis ve ark., 1998). Çalışmamızda da bu nedenle fenestrasyon tipi periodontal defektler oluşturulmuştur.

Defekt alanı oluştururken kemik çapı, hayvanın türü ve uygulama alanı belirleyici kriterlerdir. Sıçanlarda ağız dışı yoldan fenestrasyon defekti oluşturulmasıyla mandibular 1. moların distal ve bukkal kökleri ve 2. moların mesial kökü açığa çıkarılmaktadır. Defektin oral çevreden izole bir şekilde hazırlanması, bakteri ve yabancı cisim kontaminasyonunun olumsuz etkilerini ortadan kaldırır (Pellegrini ve ark., 2009). Deneysel olarak hazırlanan kemik defektlerinin kritik boyutlarda oluşturulması önemlidir ve kemikte kırık oluşturmayacak boyutlarda çalışılması gerekmektedir. Kritik boyutta defekt, yaşam boyu kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük boyuttaki defektir (Schmitz ve ark., 1986; Pellegrini ve ark., 2009). Rat femur kemiğinde 1,8mm'lik, 2,2mm'lik ve 3mm'lik defekt (Chiba ve ark., 2001; Pereira ve ark., 2006; Duarte ve ark., 2009; Miron ve ark., 2013), rat tibiasında 2mm'lik ve 4mm'lik defekt (Bernabe ve ark., 2012 ; Borrasca 2015), rat mandibulasında ise 2,8mm ve 4 mm' lik defekt alanları (King ve ark., 1997; Miron ve ark., 2014) oluşturulmuştur. Diğer çalışmalar ve mevcut tezin ön çalışmasının sonuçları göz önüne alınarak; rat mandibula kemikleri için 4 mm uzunluğunda standart fenestrasyon defektleri oluşturuldu.

Kemik doku üzerine yapılan çalışmalarda kemik iyileşmesi ile ilgili değerlendirme günleri arasında ortak bir görüş bulunmamaktadır (Igarashi ve Yamaguchi, 1999; Schmidmaier ve ark., 2002; Pereira ve ark., 2006; İşler ve ark., 2008). Kemik iyileşmesinin ikinci evresi olan tamir dönemi travmadan sonraki saatlerde başlasa da yapısal olarak tipik hale gelmesi yaklaşık 10 gün sürmektedir (Kılıçoğlu, 2002). Test ve kontrol grubu hayvanları arasında meydana gelen erken kemik ve sement formasyonundaki belirgin farklılıkların görülebilmesi için en az 10 günlük deney periyodu gerekmektedir. On gün sonrasında özellikle dişlerin apikal bölgelerinde bağ doku ataşmanı ile birlikte ince sement tabakası oluşumu gözlenebilir. Bu evrede koronalde dar olan sement bölgesi apikal sahada kalınlaşma gösterir (King ve ark., 1997). Genç sıçanlarda periodontal rejenerasyon bir ay içinde tamamlanmaktadır. Bu nedenle yeni medikal ürünlerin terapotik etkilerinin test edilmesinde bu süre yeterli görülmektedir (Pellegrini ve ark., 2009). Bu bilgiler ışığında çalışmamızda erken iyileşme döneminin sonuçlarını gözlemleyebilmek için 10 gün, geç dönem iyileşmenin gözlemlenebilmesi için de 38 günlük deney periyodu tercih edildi.

Çalışmamızda histomorfometrik değerlendirme kapsamında 10 ve 38 günlük deney periyodlarında AKD ve MMP'nin kemik ve sement dokusu üzerine etkisi incelendi. Bulgularımız incelendiğinde; deney gruplarının 10 günlük deney dönemi sonunda kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha fazla yeni kemik alanı ve yeni kemik yüzdesine sahip olduğu görüldü. AKD ile EMD karşılaştırıldığında; EMD'nin istatistiksel anlamlı olarak daha fazla yeni kemik oluşumunu sağladığı bulundu. Otuzsekiz günlük değerlendirmede ise; AKD ile kontrol grubu arasında yeni kemik alanı ve yüzdesinin benzer olduğu görülürken, EMD'nin kontrol grubu ve AKD ile karşılaştırıldığında daha fazla kemik alanı ve kemik yüzdesine sahip olduğu saptandı. Histomorfometri kapsamında değerlendirilen yeni sement oluşumu; 10 günde izlenemezken, 38.günde tüm gruplarda yeni sement oluştuğu görüldü. Otuzsekizinci gündeki yeni sement alanının EMD uygulanan grupta AKD ve kontrol gruplarına göre istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu, AKD grubunda ise kontrol grubu ile benzer yeni sement oluştuğu saptandı.

Bu bulgular dahilinde AKD'nin erken dönemde kemik oluşumunu arttırdığı ancak uzun uzun dönemde bu etkinin azaldığı görülmektedir. Bilindiği gibi tez çalışmasında oluşturulan fenestrasyon defektinin spontan olarak dolma potansiyeli vardır. Nitekim, kısa dönemde deney periodu sonrası da dahil kontrol grubunda oluşturulan bu defektlerde de yeni kemik oluşumu gözlenmiştir. AKD grubunda erken dönemde kontrol grubuna göre gözlenen daha fazla yeni kemik oluşumu, 38 günlük periodun sonunda kontrol ile benzer seviyeye gelmiştir. Bu sonuçlar bu ajanın etkisini uzun dönem devam ettiremediğini düşündürmektedir.

Yumuşak ve sert periodontal dokuların yara iyileşmesinde önemli rol oynayan bir takım makromoleküller tanımlanmıştır. Bunlar; Kollajen-1, Kollajen-3, Dekorin, Biglikan, Osteopontin, Osteokalsin, Kemik Sialoprotein, Kemik Morfojenik Protein-2 ve Kemik Morfojenik Protein-4'tür. Kollajen-1 ve Kollajen-3 tüm periodontal dokuların yapısını ve fizyolojisini sağlayan majör komponentlerdir. Dokuların rejenerasyonunda ortamda olması gereken önemli bileşenlerdendir (Ivanovski ve ark., 2000). Osteopontin, osteokalsin ve kemik sialoproteinleri; osteojenik hücre farklılaşmasının farklı safhalarında salgılanan non-kollajenöz glikoproteinlerdir ve periodonsiyumun bütünlüğünden sorumlulardır (Bronckers ve ark., 1994; Boskey 1996; Kagayama ve ark., 1997). Osteokalsin kemiğin ekstraselüler bir matriks proteindir ve kalsifikasyonda



görev almaktadır (Boskey, 1996). Osteopontin ve Kemik Sialoproteini sement tabakası içinde tanımlanmaktadır ve ayrıca osteogenezis ile sementogenezisde önemli rol oynamaktadırlar (MacNeil ve ark., 1995).

Ankaferd Kan Durdurucu'nun periodontal dokular üzerine etkilerini incelediğimiz çalışmamızda, bu dokuların iyileşmesinde anahtar rol oynayan Kollajen-3 ve Osteopontin; immünohistokimyasal inceleme kapsamında tercih edilmiştir. Kollajen-3 periodontal ligament iyileşmesini değerlendirmek için, OPN ise kemik iyileşmesini değerlendirmek için seçilmiştir.

Periodontal ligament hücrelerinde yüksek oranda Kollajen-3 proteini bulunduğundan, Kollajen-3 bu dokularda immünopozitif boyanabilmektedir. Ayrıca, kök sementinin ekstrinsik lifleri de (Sharpey lifleri) Kollajen-3 ile boyanabilir (Ivanovski ve ark., 2000; Christgau ve ark., 2007). OPN, tedavi edilmemiş bölgedeki periodontal ligamante komşu kemik matriksinde ve sement tabakasında boyanabilir (Ivanovski ve ark., 2000). Bununla birlikte; OPN rejenere olmuş sement tabakasında ve rejenere kemiğin ekstraselüler matriksinde güçlü boyanabilirken; iyi mineralize olmuş sement ve kemik matriksinde kalsifikasyon mineralleri antijenleri maskeleydiğinden immün boyanma zayıftır (Ivanovski ve ark., 2000).

İmmünohistokimyasal bulgularımıza baktığımızda; histomorfometri bulgularını destekler şekilde Kollajen-3 ve OPN ekspresyonu AKD erken dönem grubunda (AKD-10) AKD geç dönem grubuna (AKD-38) göre daha fazladır. AKD-10 grubunda on günlük dönemde hem PL hücresi ve PL matriksi hem de kemik matrikste Kollajen-3 immünreaktivitesi kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı daha fazla bulundu; EMD-10 grubunda ise AKD-10'dan farklı olarak kemik hücrede de Kollajen-3 immünreaktivitesinin istatistiksel anlamlı olarak daha fazla olduğu saptandı. İki test grubu karşılaştırıldığında kemik hücre immünreaktivitesi dışında diğer parametrelerde istatistiksel anlamlı fark görülmedi. Otuzsekiz günlük sonuçlara baktığımızda ise; AKD grubundaki Kollajen-3 ekspresyonu hiçbir dokuda kontrolden farklı değilken, EMD-38 grubunda hem PL hücresi ve matriksi hem de kemik matriksindeki boyanmanın kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu saptandı. Osteopontin ekspresyonu ise AKD grubunda hem 10 günlük hem de 38 günlük dönemde kontrol grubu ile benzer bulundu. Diğer taraftan EMD grubunda ise hem erken hem de geç dönemdeki (38 günlük PL hücre ve bağ doku boyanmaları hariç) ekspresyonların kontrol grubuna göre

istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu saptandı. İki test grubu karşılaştırıldığında EMD-10 grubundaki OPN immünreaktivitesi bütün parametrelerde ve EMD-38 grubunda ise PL matriks, kemik matriks ve bağ dokuda AKD'ye göre istatistiksel anlamlı daha fazla tespit edildi. Periodontal yara iyileşmesinde önemli rol oynayan bu proteinlerin ekspresyon farklılıkları AKD'nin erken dönemde sağladığı pozitif etkiyi uzun dönem devam ettiremediğini desteklemektedir.

Çalışmamızın histomorfometrik ve immünohistokimyasal bulguları MMP'nin periodontal defektlerin rejenerasyonunda etkili bir biyoaktif ajan olduğunu bir kez daha göstermektedir. Literatürde MMP'lerin etkinliğini kanıtlayan çok sayıda deneysel ve klinik çalışma mevcuttur (Mellonig, 1999; Yukna ve Mellonig, 2000; Casati ve ark., 2002; Sculean ve ark., 2003; Stenport ve ark., 2003; Nemcovsky ve ark., 2006; Christgau ve ark., 2007; Correa ve ark., 2016). Nitekim, periodontal rejenerasyonda yeterli biyolojik ve klinik kanıtın olduğu tek biyoaktif ajandır. Froum adlı araştırmacı MMP ile çalışma yapmış ve bu materyale dayalı bir tedavi stratejisi geliştirdiği bir derleme yayımlamıştır. Bu derlemede MMP'lerin 3 duvarlı defektlerde tek başına, 2 duvarlı orta derinlikte defektlerde greft ile kombine, sıg vertikal defektlerde ise greft ve membran ile birlikte kullanıldığında periodontal rejenerasyonu sağladığı rapor edilmiştir (Froum ve ark., 2001). Yine Trombelli ve ark. (2002)'na ait bir sistematik derlemede kemik içi periodontal defektlerde bu ajanın etkili olduğu rapor edilmiştir. Tonetti ve ark. (2002)'nin yaptığı çok merkezli bir çalışmada da benzer sonuçlar bulunmuştur. 2008 yılında yayımlanan konsensus raporunda biyolojik medyatörlerin furkasyon defektlerinin tedavisinde kullanımı desteklenmezken; MMP'lerin sadece mandibular sınıf II furkasyon defektlerinde kullanılabileceği rapor edilmiştir (Palmer ve Cortellini, 2008). Cortellini ve Palmer (2011), konsensus raporunda ise yine kendini kanıtlamış tek biyoaktif ajanın MMP olduğu bildirmiştir.

Mellonig (1999), 2 ayrı olguda mine matriks türevlerinin klinik ve histopatolojik etkisini incelemiştir. Birinci olguda, horizontal kemik defekti ve ataşman kaybı olan maksiller sol 1. premolar dişin mezial bölgesine EMD uygulamıştır. Bir yıl sonraki değerlendirmede, klinik olarak iyileşmenin, aynı durumda olan ve mine matriks türevi kullanılmayan başka bir bölgeden 1-2 hafta daha önce izlendiğini bildirmiştir. İkinci olguda Mellonig, protetik nedenlerle çekim kararı verilmiş mandibular sol kaninin, 3 duvarlı geniş kemik içi defekt ve ataşman kaybı bulunan mesial bölgesine

EMD uygulandıdır. Altı ay sonraki değerlendirmede, radyografik olarak kemik oluşumunun çok az olduğu, ancak ataşman kazancının %50 arttığı tespit edilmiştir. Daha sonra disin mezial yarısı ve komşu kemik bölgesi çıkarılarak mikroskopik incelemeye tabii tutulmuştur. Histolojik kesitlerde, ilgili bölge üzerinde yeni kemik, sement ve PL'in oluştuğu, ince bir tabaka halinde asellüler sementin grldği ve genelde matür halde yeni kemik dokusunun izlendiği bildirilmiştir.

Stenport ve ark. (2003), yılında 6 tavşana uyguladıkları 36 implantın etrafındaki kemik oluşumunu araştırdıkları çalışmalarında, EMD uygulanan implantları tavşan femur ve tibialarına yerleştirerek implant etrafındaki kemik oluşumunu ve osteointegrasyonu incelemişlerdir. Kırkbeş gün sonunda sakrifiye edilen tavşanların femurlarındaki implantlar rezonans frekans analizi ile biyomekanik olarak ve kemik implant kontakt noktalarındaki kemik oluşumunu ve osteointegrasyonu histomorfometrik olarak incelemişlerdir. Çalışmanın sonucunda periodontal kemik içi defektlerde kemik oluşumunu arttırmayı ile bilinen EMD'nin titanyum implantlar etrafına uygulanmasının kemik oluşumu açısından bir faydası olmadığını belirtmişlerdir. Bu bulgular ışığında araştırmacılar, EMD'nin periodontal rejenerasyonda kemik oluşumunu indirekt olarak stimüle ettiğini, yeni kemik oluşumunun diş etrafındaki PL ve yeni oluşan sement dokusuna fonksiyonel adaptasyonu ile gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir.

Casati ve ark. (2002), köpeklerin enelerindeki implantlar etrafında oluşturdukları dehisens tipindeki defektlerde EMD ve üzerine membran uygulaması ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında EMD'nin defektlerde yeni kemik oluşumu açısından pozitif bir etkisi olmadığı sonucuna varmışlardır.

Bir başka histolojik çalışmada 8 hastada bulunan 10 adet kemik içi defekt değerlendirilmiştir. ekimi planlanan dişlere operasyon sırasında EMD uygulanmıştır. Altıncı ayda yapılan histolojik incelemede 3 defektte yeni sement, yeni kemik ve yeni PL oluşumu ile rejenerasyon görülürken, 3 defektte yeni bağ dokusu ataşmanı ve 4 defektte de uzun bağlantı epiteli oluşumu grlmştir. Örneklerin hiçbirinde kök rezorpsiyonu, ankiloz veya iltihap belirtileri görülmemiştir. Araştırmacılar bu incelemelerin sonucunda, EMD'nin periodontal problemlili dişlerde rejenerasyon sağlayabileceğini belirtmişlerdir (Yukna ve Mellonig, 2000).

Nemcovsky ve ark. (2006)'nın sıçanda yaptığı histomorfometrik çalışmada test grubuna EMD kontrol grubuna ise sadece taşıyıcı PGA uygulanmıştır. Defektlerdeki birleşim epiteli incelendiği zaman test grubundaki epitelin kontrol grubundakine göre hemen hemen 2 kat daha kısa olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara göre araştırmacılar, EMD'nin yeni sement oluşumuna katkıda bulunarak ve birleşim epitelini azaltarak periodontal rejenerasyonu arttırdığını bildirmişlerdir.

Sculean ve ark. (2003), EMD'nin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında çekim endikasyonu koyulan 8 dişe flap açıp EMD yerleştirmişlerdir. 6 ay sonra dişler çevresindeki sert ve yumuşak dokular ile birlikte rezeke edilmiş ve immünohistokimyasal analizler yapılmıştır. Dokulardaki Osteopontin, Kollajen-1 ve Kollajen-3 seviyeleri incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda tüm örneklerde EMD'nin periodontal rejenerasyona katkıda bulunduğu sonucuna varmışlardır.

Correa ve ark. (2016), 10 alkol tüketen ve 10 alkol tüketmeyen 20 sıçan mandibulasında fenestrasyon defekti oluşturdukları çalışmalarında EMD'nin yeni sement formasyonu ve kemik dansitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmanın sonucunda alkol tüketiminin kemik dansitesi ve yeni sement formasyonu üzerinde olumsuz etkisi olduğunu göstermişlerdir. EMD kullanımı ile bu etkinin azaldığını gözlemlemişlerdir.

Christgau ve ark. (2007), 21 köpeğin mandibulasında 2. ve 4. Premolar dişlerinde oluşturdukları fenestrasyon defektlerinde bir rezorbe olmayan ve 3 tane rezorbe olan membranı 2.-4.-8. haftalarda ve 3., 6., 12. aylarda karşılaştırmışlardır. Farklı zaman aralıklarındaki Kollajen-1, Kollajen-3, Fibronektin, kemik sialoprotein ve Osteopontin seviyelerini immünohistokimyasal olarak incelemişler ve periodontal ligamentte fibronektin Kollajen-1 ve Kollajen-3'ün boyanabildiğini ancak kemik sialoproteini ve OPN'nin boyanamadığını rapor etmişlerdir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında EMD'nin uygun defekte kullanıldığında periodontal rejenerasyonu sağlayabildiği görülmektedir. Nitekim çalışmamızın bulgularıda literatürü desteklemektedir. AKD ise ilk olarak bu çalışmada periodontal rejenerasyon amacıyla kullanılmıştır. Bu ajanın hemostatik etkisi dışında vücuttaki farklı kemik dokuların iyileşmesi üzerine etkisini inceleyen bazı çalışmalar vardır.

Öztemel (2013), 24 tavşanın tibiası üzerinde yaptığı çalışmada iki tibiasına da 5mm çapında ikişer kemik defekti oluşturmuştur. Sağ tibiadaki proksimal defekte

greft materyali ve Serum Fizyolojik distal defekte ise sadece Serum fizyolojik uygulanmıştır. Sol tibiadaki proksimal defekte ise greft materyali ve AKD karışımı yerleştirilmiş, distal defekte ise sadece AKD uygulanmıştır. İşlem sonrası tavşanlar gruplara ayrılarak 7., 15., 30. ve 45. Günlerde sakrifiye edilip doku örnekleri histolojik ve immünohistokimyasal olarak incelenmiştir. Çalışma sonucunda; AKD'nin kemik doku iyileşmesi sürecinde inflamasyonu baskıladığı, kemik iyileşmesinin erken dönemlerinde endosteal kemik oluşumunu anlamlı derecede arttırdığı, dokularda yabancı cisim reaksiyonuna yol açmadığı, Osteokalsin ve Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü üretimini anlamlı derecede arttırdığı bildirilmiştir. Bununla birlikte AKD'nin kemik defektlerine uygulandığında yeni kemik dolumunu istatistiksel anlamlı derecede arttırmadığını bildirmişlerdir.

İşler ve ark. (2010) AKD' nin erken dönem kemik iyileşmesi üzerine etkilerini inceledikleri çalışmada 16 adet sıçanın tibiasına bilateral olarak 3 mm çapında ve 2 mm derinliğinde kemik defekti oluşturmuşlardır. Defektlerden birine 1 cc AKD sprey uygulamışlar, diğer defekte ise herhangi bir işlem uygulamamışlardır. AKD uygulanan gruptaki yeni kemik dokusu oluşumunun kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu saptamıştır. Bu çalışmada araştırmacılar AKD'nin yeni kemik oluşumunu stimüle ettiğini, AKD uygulanan grupta kontrol grubuna göre nekrozis ve fibrozisin daha az görüldüğünü bildirmiştir.

Ankaferd Kan Durdurucu'nun kemik yüzeylerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada 30 adet sıçanın femuruna bilateral olarak 3 mm çapında kemik defekti oluşturulmuştur. Sağ femurdaki defektlere 0,5 ml AKD uygulanmış, sol femura herhangi bir madde uygulanmamıştır. Ratlar 7., 28. ve 42. günlerde sakrifiye edilerek alınan örnekler incelenmiştir. Yapılan histopatolojik inceleme sonucunda 7. gün sonuçlarına göre AKD uygulanan grupta yeni kemik yapımının daha fazla olduğu saptanmıştır. 28. ve 42. günlerde ise kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmamıştır. AKD' nin erken dönem kemik iyileşmesini hızlandırdığını ve herhangi bir yabancı cisim reaksiyonuna neden olmadığını bildirmişlerdir (Şimşek, 2010).

DeneySEL çalışmaların yanı sıra klinik çalışmalarda da AKD'nin enflamasyon ve enfeksiyonu kontrol altına almada etkili olduğu rapor edilmiştir. Erçetin ve ark. (2010) 25 hastada diş çekimi ve periodontal cerrahi gibi kanamalı diş tedavileri gerçekleştirmişler ve 20 hastada 1-5 ml topikal AKD uygulamasının kanamayı kontrol

altına almada yeterli olduğunu ve kanamanın uygulamayı takiben 1-3sn arasında durduğu sonucuna ulaşmışlardır. Buna göre postoperatif dönemde uzun sürebilecek kanama riski olan hastalarda uygulanan bu yöntemin hemostaz sağlamada başarılı olabileceğini öne sürmüşlerdir. Bu çalışma sonunda AKD uygulanan hastaların hiçbirisinde yara enfeksiyonu gözlenmemiş ve yara iyileşme süreci hastaların hepsinde normal olarak gerçekleşmiş olduğu bildirilmiştir. AKD'nin periodontal cerrahi ve diş çekimlerinde lokal kanama kontrolü, yara iyileşmesi ve enfeksiyon kontrolü için yararlı olabileceğini rapor etmişlerdir.

AKD periodonsiyum iyileşmesi üzerine etkilerini ilk kez inceleyen deneysel çalışmamızın bulguları bu ajanın erken dönemde iyileşme üzerine olumlu etkilerini göstermektedir. EMD ile karşılaştırıldığında kısa dönem etkilerini göstermektedir. EMD ile karşılaştırıldığında kısa dönem etkinliğinin kendini kanıtlamış bu materyale yakın olduğu görülmektedir. Ancak bu etkiyi uzun dönem devam ettiremediği de izlenmektedir. Bunun nedeni AKD'nin erken dönemde enflamasyon üzerine etkilerinin enflamasyon kontrol altına alındıktan sonra azalması olabilir. Her ne kadar etkisini uzun dönem devam ettiremediği gözükse de bu ajanın periodontal rejenerasyon amacıyla kullanılabilir alternatif bir materyal olabileceği düşüncesindeyiz. Hipotezimizi destekleyecek yeni deneysel çalışmalar yapılması gerekmektedir.

## 6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Sıçanlarda oluşturulan fenestrasyon defektlerine lokal olarak uygulanan AKD'nin periodontal doku iyileşmesi üzerine etkisinin histomorfometrik immünohistokimyasal olarak incelenip EMD ile karşılaştırıldığı çalışmamızda;

1. Sıçanlarda kritik boyutlu fenestrasyon defektleri başarılı bir şekilde oluşturulabilmekte ve defekt alanı standardize edilebilmektedir Operasyon sonrası deney periyodu sonuna kadar deney hayvanlarında herhangi bir komplikasyon görülmedi.

2. Histomorfometrik incelemeler sonucunda erken dönem iyileşme döneminde yeni kemik alanının ve yüzdesinin AKD-10 ve EMD-10 grubunun Kontrol-10 grubundan istatistiksel anlamlı fazla olduğu saptandı. Geç iyileşme döneminde ise yeni kemik alanı, yüzdesi, trabekül kemik ve yeni sement oluşumu incelendiğinde AKD-38 ile Kontrol-38 grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmediği tespit edildi. EMD-38 grubunda ise geç iyileşme dönemindeki bütün histomorfometrik parametrelerin her iki gruptan da istatistiksel anlamlı fazla olduğu görüldü.

3. On günlük örneklerin PL hücre, PL matriks ve kemik matriksindeki Kollajen-3 immünreaktivitesi incelendiğinde; AKD-10 ile EMD-10 grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık görülmezken; Kontrol-10 grubu ile diğer iki grup arasında istatistiksel anlamlı farklılık olduğu saptandı. AKD-10 ile Kontrol-10 grubu arasında kemik hücredeki Kollajen-3 immünreaktivitesi arasında istatistiksel anlamlı farklılık yokken; EMD-10 ile Kontrol-10 grubu arasında istatistiksel anlamlı farklılık saptandı.

4. Otuzsekiz günlük örneklerde AKD ile kontrol grubu karşılaştırıldığında PL hücre ve matriks, kemik hücre ve matriks ve bağ dokuda Kollajen-3 ekspresyonunun benzer olduğu bulundu. EMD grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ise PL hücre ve matriksinde ve kemik matriksindeki boyanma istatistiksel anlamlı fazla iken, kemik hücre ve bağ dokudaki boyanmanın benzer olduğu saptandı. İki test grubu karşılaştırıldığında ise kemik hücre ve bağ doku hücre immünreaktivitesi arasında istatistiksel anlamlı farklılık yokken PL matriks, PL hücre ve kemik matrikste ise istatistiksel anlamlı olarak EMD grubunda daha fazla boyanma saptandı.

5. On günlük örneklerin OPN immünreaktivitesi incelendiğinde; AKD ile kontrol grubu arasında PL hücre ve matriks, kemik hücre ve matriks ve bağ dokuda

istatistiksel anlamlı farklılık bulunmazken; EMD ile kontrol grubu karşılaştırıldığında bütün parametrelerde EMD lehine istatistiksel anlamlı farklılık bulundu. İki test grubu karşılaştırıldığında ise EMD grubundaki OPN immünreaktivitesinin AKD'ye göre istatistiksel anlamlı daha fazla olduğu görüldü.

6. Otuzsekiz günlük örneklerin OPN boyanma miktarları incelendiğinde; AKD ile kontrol grubunda bütün parametrelerde benzer immünreaktivite bulundu. EMD grubu kontrol grubu ile karşılaştırıldığında PL matriksi, kemik matriksi ve bağ doku OPN immünreaktivitesi istatistiksel anlamlı fazla iken PL hücre ve kemik hücre boyanmalarının benzer olduğu görüldü. İki test grubu karşılaştırıldığında PL matriksi, kemik matriksi ve kemik hücre immünreaktivitesi EMD grubunda istatistiksel anlamlı daha fazla bulundu.

7. AKD periodonsiyum iyileşmesi üzerine etkilerini ilk kez inceleyen deneysel çalışmamızın bulguları bu ajanın erken dönemde iyileşme üzerine olumlu etkilerini göstermektedir. EMD ile karşılaştırıldığında kısa dönem etkinliğinin kendini kanıtlamış bu materyale yakın olduğu görülmektedir. Ancak bu etkiyi uzun dönem devam ettiremediği de izlenmektedir. Bunun nedeni AKD'nin erken dönemde enflamasyon üzerine etkilerinin enflamasyon kontrol altına alındıktan sonra azalması olabilir. Her ne kadar etkisini uzun dönem devam ettiremediği gözükse de bu ajanın periodontal rejenerasyon amacıyla kullanılabilir alternatif bir materyal olabileceği düşüncesindeyiz. Hipotezimizi destekleyecek yeni deneysel çalışmalar yapılması gerekmektedir.



## KAYNAKLAR

- Agarwal A, Gupta ND, Jain A, Páll E, Florea A, Sorişău O ve ark. Position Paper: Periodontal Regeneration. *J Periodontol.* 2005;76(9):1601-1622.
- Ak G, Çakır O, Kazancıoğlu HO, Kılıç S, Erçetin S, Zülfişkar E. Is Ankaferd blood stopper an alternative coagulation method for hemophiliac patients? 9th Biennial Congress of the European Association of Oral Medicine, Salzburg, Austria, Abstracts, 2008;14(1):14-43.
- Akarsu C, Kalayci MU, Yavuz E, Özkara S. Sıçanlarda karaciğer laserasyon modelinde Ankaferd Blood Stopper ve fibrin yapıştırıcının hemostatik etkinliğinin karşılaştırılması. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2011;17(4):308-312.
- Allegrini S, Koenig B, Allegrini MRF, Yoshimoto M. Alveolar Ridge Sockets Preservation With Bone Grafting – Review. *Ann Acad Med Stetin.* 2008;54(1):70-81.
- Amsellem M, Masson JM, Negui B. Endotelon in the treatment of venolymphatic problems in premenstrual syndrome – multicenter study on 165 patients. *Tempo Med.* 1987;282:46–51.
- Ankaferd BloodStopper araştırma etkinlikleri raporu - 2008. Bölüm 2. [http://www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008\\_2.pdf](http://www.ankaferd.com/pdf/ABSAR2008_2.pdf) Erişim tarihi: 13.05.2016.
- Annunziata M, Oliva A, Buonaiuto C, Di Feo A, Di Pasquale R, Passaro I, Guida L. In vitro cell-type specific biological response of human periodontally related cells to platelet-rich plasma. *J Periodontal Res.* 2005;40(6):489-495.
- Anusaksathien O, Giannobile WV. Growth factor delivery to re-engineer periodontal tissues. *Curr Pharm Biotechnol.* 2002;3(2):129-139.
- Arpacı SE. Sıçanlarda diş çekimi sonrasında uygulanan lokal hemostatik ajan Ankaferd' in doku iyileşmesi üzerine etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Doktora Tezi, 2010.
- Arpak MN, Eskitaşoğlu A, Kirişçi N, Can C. Histological evaluation of porous hydroxylapatite and guided tissue regeneration in a biologically closed model. *Türk Klin Dişhek Bilim Derg.* 1996;2,74-78.
- Arpak MN, Kirişçi N, Can C. Mercan kaynaklı biyomateryal Biocoral'in periodontal dokularla ilişkisinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi. *Selçuk Üni Diş Hek Fak Derg.* 1997;7(1):21-24.
- Arslan S, Haznedaroglu IC, Oz B, Goker H. Endobronchial Application of Ankaferd Blood Stopper to Control Profuse Lung Bleeding Leading to Hypoxemia and Hemodynamic Instability. *Respiratory Medicine CME.* 2009;2(3):144-146.
- Babbush CA. The use of a new allograft material for osseousreconstruction associated with dental implants. *Implant Dent.* 1998;7(3):205-212.

- Barney VC, Levin MP, Adams DF. Bioceramic implants in surgical periodontal defects. A comparison study. *J Periodontol.* 1986;57:764-770.
- Bartold PM, McCulloch CAG, Narayanan AS, Pitaru S. Tissue engineering: a new paradigm for periodontal regeneration based on molecular and cell biology. *Periodontology* 2000a;24(1):253-269.
- Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol* 2000. 2006;40:164-172.
- Bartold PM, Walsh LJ, Narayanan AS. Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontol* 2000. 2000b;24:28–55.
- Bauer TW, Togawa D. Bone graft substitutes: towards a more perfect union. *Orthopedics.* 2003;26(9):925-926.
- Baykul T, Alanoglu EG, Kocer G. Use of Ankaferd Blood Stopper as a hemostatic agent: A clinical experience. *J Contemp Dent Pract.* 2010;11(1):88-94.
- Bernabé PF, Melo LG, Cintra LT, Gomes-Filho JE, Dezan E Jr, Nagata MJ. Bone healing in critical-size defects treated with either bone graft, membrane, or a combination of both materials: a histological and histometric study in rat tibiae. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(3):384-388.
- Beyazit Y, Kurt M, Sayılır A, Suvak B, Özderin YO. Successful application of Ankaferd Blood stopper in a patient with lower gastrointestinal bleeding. *Saudi J Gastroenterol.* 2011;17(6):424-425.
- Bilgili H, Captug O, Kosar A, et al. Oral systemic administration of Ankaferd Blood Stopper has no short-term toxicity in an in vivo rabbit experimental model. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2010;16:533-536.
- Bilgili H, Kosar A, Kurt M, Onal IK, Goker H, Captuğ O ve ark. Hemostatic efficacy of Ankaferd Blood Stopper in a swine bleeding model. *Med. Princ Pract.* 2009;18(3):165-169.
- Booth V, Young S, Cruchley A, Taichman NS, Paleolog E. Vascular endothelial growth factor in human periodontal disease. *J Periodontal Res.* 1998;33(8):491–499.
- Bornstein P, Sage H. Structurally distinct collagen types. *Annu Rev Biochem.* 1980;49:957-1003.
- Borrasca AG, Aranega AM, Filho OM, Timóteo CA. Bone repair of surgical defects filled with autogenous bone and covered with demineralized bone matrix membrane or polytetrafluoroethylene membrane in rats. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(2):442-449.
- Boskey A. Matrix proteins and mineralization: an overview. *Connect Tissue Res* 1996;35:357-363.

- Boskey AL, Maresca M, Ullrich W, Doty SB, Butler WT, Prince CW. Osteopontin-hydroxyapatite interactions in vitro: inhibition of hydroxyapatite formation and growth in a gelatin–gel. *Bone Miner.* 1993;22: 147–159.
- Bosshardt DD. Biological mediators and periodontal regeneration: a review of enamel matrix proteins at the cellular and molecular levels. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):87-105.
- Bronckers ALJJ, Farach-Carson MC, van Waeren E, Butler WT. Immunolocalization of osteopontin, osteocalcin, and dentin sialoprotein during dental root formation and early cementogenesis in the rat. *J Bone Miner Res.* 1994;9:833-841.
- Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, Bonnas WA. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. *Arch Oral Biol.* 1995;40:1-14.
- Buduneli N. Dişetin ekstraselüler matriksi. *Ege Üni Dişhek Fak Derg.* 2001;22:1-12.
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone- graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury, Int J Care Injured.* 2011;42(2):56-63.
- Camargo PM, Lekovic V, Weinlaender M, Vasilic N, Madzarevic M, Kenney EB. A reentry study on the use of bovine porous bone mineral, GTR, and platelet-rich plasma in the regenerative treatment of intrabony defects in humans. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005;25(1):49-59.
- Caplanis N, Lee MB, Zimmerman GJ, Selvig KA, Wikesjö UM. Effect of allogeneic freeze-dried demineralized bone matrix on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment in dogs. *J Clin Periodontol.* 1998;25(10):801-806.
- Carlson NE, Roach RB. Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent. Assoc.* 2002;133(10):1383-1386.
- Casati MZ, Sallu EA, Nociti FH, Caffesse RG, Sallum AW. Enamel matrix derivative and bone healing after guided tissue regeneration in dehiscence-type defects around implants. A histomorphometric study in dogs. *J Periodontol.* 2002;73:789-796.
- Caton J, Nyman S, Zander H. Histometric evaluation of periodontal surgery. II. Connective tissue attachment levels after four regenerative procedures. *J Clin Periodontol.* 1980;7:224-231.
- Caton JG, DeFuria EL, Polson AM, Nyman S. Periodontal regeneration via selective cell repopulation. *J Periodontol.* 1987;58(8):546-552.
- Chaudhuri RK, Majewski G, Gutierrez G, Serran M. Collagen III amplifier system. *Cosmet and Toilet.* 2000;115(3):53-59.

- Chavrier C, Couble ML, Magloiere H, Grimaud JA. Connective tissue organization of healthy human gingiva. Ultrastructure localization of collagen types I-III-IV. *J Periodont Res* 1984;19:221-229.
- Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin alpha(v)beta(3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue Int.* 2003;72:197–205.
- Chiba S, Okada K, Lee K, Segre GV, Neer RM. Molecular analysis of defect healing in rat diaphyseal bone. *J Vet Med Sci.* 2001;63(6):603-608.
- Choi SY, Nilveus RE, Minutello RD, Zimmerman GJ, Wikesjö UM. Effect of a collagen matrix on healing in periodontal fenestration defects in dogs. *J Periodontol.* 1993;64(9):878-882.
- Christensen SB, Ming C, Andersen L, Hjørne U, Olsen CE, Cornett C ve ark. An antileishmanial chalcone from Chinese licorice roots. *Planta Med.* 1994;60(2):121-123.
- Cipil HS, Koşar A, Kaya A, Uz B, Haznedaroğlu IC ve ark. İn-vivo hemostatic effect of the medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper in rats pretreated with warfarin. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2009;15(3):270-276.
- Claffey N, Bogle G, Bjoruatn K, Selvig K, Egelberg J. Topical application of tetracycline in regenerative periodontal surgery in beagles. *Acta Odontol Scand.* 1987;45(3):141-146.
- Claffey N, Motsinger S, Ambruster J, Egelberg J. Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs. *J Clin Periodontol.* 1989;16(1):12-16.
- Cochran DL, King GN, Schoolfield J, Velasquez-Plata D, Mellonig JT, Jones A. The effect of enamel matrix proteins on periodontal regeneration as determined by histological analyses. *J Periodontol.* 2003;74:1043-1055.
- Cochran DL, Wozney JM. Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontol* 2000, 1999;19:40-58.
- Corrêa MG, Gomes Campos ML, Marques MR, Ambrosano GM, Casati MZ, Nociti FH Jr, Sallum EA. Alcohol intake may impair bone density and new cementum formation after enamel matrix derivative treatment: histometric study in rats. *J Periodontal Res.* 2016;51(1):60-69.
- Cortellini P, Nieri M, Pini Prato G, Tonetti MS. Single minimally invasive surgical technique with an enamel matrix derivative to treat multiple adjacent intra-bony defects: clinical outcomes and patient morbidity. *J Clin Periodontol.* 2008;35:605-613.
- Cortellini P, Tonetti MS. A minimally invasive surgical technique with an enamel matrix derivative in the regenerative treatment of intra-bony defects: a novel approach to limit morbidity. *J Clin Periodontol.* 2007;34:87-93.

- Demircan S, İşler C, Çakarer S, Yüzbaşıoğlu E, Soluk M ve ark. Ankaferd® Blood Stopper' in erken dönem kemik dokusu iyileşmesi üzerine etkileri: Sıçanlar üzerinde deneysel bir çalışma. Oral Cerrahi Derneği VIII. Uluslararası kongre, Antalya, 2008, 14. sözel sunum.
- Dodds RA, Connor JR, James IE, Rykaczewski EL, Appelbaum E, Dul E ve ark. Human osteoclasts, not osteoblasts, deposit osteopontin onto resorption surfaces: an in vitro and ex vivo study of remodeling bone. *J Bone Miner Res.* 1995;10(11):1666-1680.
- Dragoo MR, Sullivan HC. A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. II. External root resorption. *J Periodontol.* 1973;44(10):599-613.
- Driessens FC, Planell JA, Boltong MG, Khairoun I, Ginebra MP. Osteotransductive bone cements. *Proc Inst Mech Eng.* 1998;212:427-435.
- Erçetin S, Haznedaroğlu IC, Kurt M, Önal IK, Aktaş A, Kurt KO ve ark. Safety and Efficacy of Ankaferd Blood Stopper in Dental Surgery. *UHOD.* 2010;20(1):1-5.
- Francischetti IM, Monteiro RQ, Guimaraes JA. Identification of glycyrrhizin as a thrombin inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235(1):259-63.
- Froum SJ, Weinberg MA, Rosenberg E, Tarnow D. A comparative study utilizing open flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry. *J Periodontol.* 2001;72:25-34.
- Froum S, Lemler J, Horowitz R, Davidson B. The use of enamel matrix derivative in the treatment of periodontal osseous defects: a clinical decision tree based on biologic principles of regeneration. *Int J. Periodontics Restorative Dentistry.* 2001.
- Garg AK. Bone Biology, Harvesting, and Grafting For Dental Implants: Rationale and Clinical Applications. In: Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Review of Bone-Grafting Materials.* Quintessence Publishing, Chicago, 2004a:20-56.
- Garg AK. Bone Biology, harvesting, grafting for dental implants: rationale and clinical applications. Quintessence Publishing. 2004b.
- Garrett JS. Periodontal regeneration around natural teeth. *Ann Periodontol.* 1996;1:621-666.
- Gericke A, Qin C, Spevak L, Fujimoto Y, Butler WT, Sørensen ES, Boskey AL. Importance of phosphorylation for osteopontin regulation of biomineralization. *Calcif Tissue Int.* 2005;77(1):45-54.

- Gestrelius S, Andersson C, Johansson AC, Persson E, Brodin A, Rydhag L, Hammarstrom L. Formulation of enamel matrix derivative for surface coating. Kinetics and cell colonization. *J Clin Periodontol*, 1997a;24:678-684.
- Gestrelius S, Andersson C, Lidström D, Hammarström L, Somerman M. In vitro studies on periodontal ligament cells and enamel matrix derivative. *J Clin Periodontol* 1997b;24:685-692.
- Gestrelius S, Lyngstadaas SP, Hammarström L. Emdogain–periodontal regeneration based on biomimicry. *Clin Oral Invest*. 2000;4:120-125.
- Goker H, Haznedaroglu IC, Ercetin S, Kirazli S, Akman U, Ozturk Y ve ark. Haemostatic actions of the folkloric medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper. *J Int Med Res*. 2008;36(1):163-170.
- Goodson JM, Tanner AC, Haffajee AD, Sornberger GC, Socransky SS. Patterns of progression and regression of advanced destructive periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1982;9(6):472-481.
- Gottlow J, Nyman S, Karring T, Lindhe J. New attachment formation as the result of controlled tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 1984;11:494-503.
- Gottlow J, Nyman S, Lindhe J, Karring T, Wennstorm J. New attachment formation in the human periodontium by guided tissue regeneration. Case reports. *J Clin Periodontol*. 1986;13:604-616.
- Gundersen HJG. Stereology of arbitrary particles. *J Microscop*. 1986;143:3-45.
- Hammarstrom L. Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J Clin Periodontol* 1997a;24:658-668.
- Hammarström L, Hejil L, Gestrelius S. Periodontal regeneration in a buccal dehssence model in monkeys after application of enamel matrix proteins. *J Clin Periodontol* 1997b; 24:669-677.
- Hasgul R, Uysal S, Haltas H, Akyol S, Yuksel Y, Gurel A, Armutcu F. Protective effects of Ankaferd blood stopper on aspirin-induced oxidative mucosal damage in a rat model of gastric injury. *Toxicol Ind Health*. 2014;30(10):888-895.
- Heard RH, Melloning JT, Brunsvold MA, Lasho DJ, Meffert RM, Cochran DL. Clinical evaluation of wound healing following multiple exposures to enamel matrix protein derivative in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Periodontol* 1999;71:1715-1721.
- Heden G, Wennström J, Lindhe J. Periodontal tissue alterations following Emdogain® treatment of periodontal sites with angular bone defects. A series of case reports. *J Clin Periodontol*. 1999;26:855-860.

- Heden G, Wennström JL. Five-year follow-up of regenerative periodontol therapy with enamel matrix derivative at sites with angular bone defects. *J Periodontol.* 2006;77:295-301.
- Hejil L, Heden G, Svardstöröm G, Östgren A. Enamel matrix derivative (EMDOGAIN) in the treatment of intrabony periodontal defects. *J Clin Periodontol.* 1997;24:705-714.
- Hejil L. Periodontal regeneration with enamel matrix derivative in one human experimental defect. Acase report. *J Clin Periodontol.* 1997;24:693-696.
- Heng BC, Cao T, Stanton IW, Robson P, Olsen B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *Journal of Bone Miner Res.* 2004;19:1379-1394.
- Hoexter DL. Bone regeneration materials. *J Oral Implantol.* 2002;28:290-94.
- Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Bagcioglu M, Germiyanoglu C. First clinical experience of Ankaferd Blood Stopper as a hemostatic agent in partial nephrectomy. *Kaohsiung J Med Sci.* 2010;26(9):493-495.
- Huri E, Akgul T, Ayyildiz A, Germiyanoglu C. Hemostasis in retropubic radical prostatectomy with Ankaferd BloodStopper: a case report. *Kaohsiung J Med Sci.* 2009;25(8):445-447.
- Igarashi A, Yamaguchi M. Increase in bone protein components with healing rat fractures: enhancement by zinc treatment. *Int J Mol Med.* 1999;4(6):615-620.
- Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, Yamashita T, Kurosawa H, Denhardt DT, Nifuji A, Noda M. Resistance to unloading-induced threedimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2002;17:661-667.
- İşler SC, Demircan S, Çakarar S, Çebi Z, Keskin C, Soluk M, Yüzbaşıoğlu E. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper on early bone healing. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(4):409-414.
- Iynen I, Bozkus F, San I, Alatas N. The hemostatic efficacy of Ankaferd Blood Stopper in adenoidectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2011;75(10):1292-1295.
- İşler SC, Demircan S, Çakarar S, Çebi Z, Keskin C, Soluk M ve ark. Effects of folk medicinal plant extract Ankaferd Blood Stopper® on early bone healing. *J Appl Oral Sci.* 2010;18(4):409-414.
- Joseph W, Margaret W, Elizabeth B. Claus. Epidemiology and etiology of Meningioma, *J Neurooncology.* 2010;99:307-314.
- Kagayama M, Li HC, Zhu J, Sasano Y, Hatakeyama Y, Mizoguchi I. Expression of osteocalcin in cementoblasts forming acellular cementum. *J Periodont Res.* 1997;32:273-278.

- Kalfas IH. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus*. 2001;10(4):7-10.
- Karasoy Yeşilada A, Tatlıdede S, Bayraktaroğlu SB, Sakız D, Bai L. Ankaferd Blood Stopper hemostatik ajanın flep yaşanabilirliğine etkisinin ratlarda değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma. 34.Ulusal hematoloji kongresi, İzmir, 2008.
- Karring T, Isidor F, Nyman S, Lindhe J. New attachment formation on teeth with reduced but healthy periodontal ligament. *J. Clin. Periodontol*. 1985;12:51-60.
- Karring T, Nyman S, Gottlow J, Laurell L. Development of the biological concept of guided tissue regeneration - animal and human studies. *Periodontol* 2000, 1993;1:26-35.
- Karring T, Nyman S, Lindhe J. Healing following implantation of periodontitis affected roots into bone tissue. *J Clin Periodontol*. 1980;7:96-105.
- Kılıçoğlu S. Mikroskopi Düzeyinde Kırık Gıyileşmesi. *Ankara Üni Tıp Fak Mecm*. 2002;55(2):143-150.
- King GN, King N, Crurhley AT, Wozney JM, Hughes FJ. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Dent Res*. 1997 Aug;76(8):1460-1470.
- Kitahara K, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Kurosawa H, Nifuji A, Denhardt DT, Noda M. Osteopontin deficiency induces parathyroid hormone enhancement of cortical bone formation. *Endocrinology*. 2003;144(5):2132-2140.
- Klausen B. Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. *J Periodontol*. 1991;62(1):59-73.
- Koo KT, Polimeni G, Albandar JM, Wikesjo UM. Periodontal repair in dogs: analysis of histometric assessments in the supraalveolar periodontal defect model. *J Periodontol*. 2004;75(12):1688-1693.
- Kurtiş B. Rejeneratif Periodontal Tedavide Doku Mühendisliği Yaklaşımları. *Derleme. Gazi Üni Diş Hek Fak Derg*. 2008;25(1):51-57.
- Laurie SWS, Kaban B, Mulliken JB, Murray JE. Donor site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast Recons Surg*. 1984;73(6):933- 938.
- Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. *Food Chemistry*, 2005;91:131-137.
- Lindhe J, Karring T, Araujo M. The anatomy of periodontal tissues. Lindhe J, Land NP, Karring T, editors. *Clinical periodontology and implant dentistry*. 5th ed., Oxford, Blackwell publishing ltd. 2008; 27-30.



- Lorenzen JM, Nickel N, Krämer R, Golpon H, Westerkamp V, Olsson KM, Haller H, Hoeper MM. Osteopontin in patients with idiopathic pulmonary hypertension. *Chest*. 2011;139(5):1010-1017.
- Lowenguth RA, Blieden TM. Periodontal regeneration: root surface demineralization. *Periodontol 2000*, 1993;1:54-68.
- Lynch SE, Genco RJ, Marx RE. *Tissue Engineering Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Publishing. 1999.
- MacNeil RL, Berry J, D'Errico J, Strayhorn C, Piotrowski B, Somerman M. Role of two mineral-associated adhesion molecules, osteopontin and bone sialoprotein, during cementogenesis. *Connect Tissue Res*. 1995;33:323-329.
- MacNeil RL, Somerman MJ. Development and regeneration of the periodontium: parallels and contrasts. *Periodontol 2000*. 1999;19:8-20.
- Maffei Facino R1, Carini M, Aldini G, Bombardelli E, Morazzoni P, Morelli R. Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from *Vitis vinifera*: a mechanism for their capillary protective action. *Arzneimittelforschung*. 1994;44(5):592-601.
- Mankin HJ, Gebhardt MC. Long term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res*. 1996;324: 86-97.
- Margolis HC, Beniash E, Fowler CE. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res*. 2006; 85: 775-93.
- Marks SC Jr, Mehta NR. Lack of effect of citric acid treatment of root surfaces on the formation of new connective tissue. *J Clin Periodontol*. 1986;13(2):109-116.
- Marx RE, Kline SN, Johnson RP, Malinin TI, Mathews JG, Gambil V. The use of freeze-derived allogenic bone in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Surg*. 1981;39:264-274.
- Marx RE. Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clin Plast Surg*. 1994;21(3):377-392.
- Matsuda H, Ando S, Kato T, Morikawa T, Yoshikawa M. Inhibitors from the rhizomes of *Alpinia officinarum* on production of nitric oxide in lipopolysaccharide-activated macrophages and the structural requirements of diarylheptanoids for the activity. *Bioorg Med Chem*. 2006;14(1):138-142.
- Mc Culloch CA. Basic considerations in periodontal wound healing to achieve regeneration. *J Periodontol*. 2000;1:16-25.
- McKee MD, Nanci A. Postembedding colloidal-gold immunocytochemistry of noncollagenous extracellular matrix proteins in mineralized tissues. *Microsc Res Tech*. 1995;31(1):44-62.

- Meade JB, Cowin SC, Klawitter JJ, Van Buskirk WC, Skinner HB. Bone remodeling due to continuously applied loads. *Calcif Tissue Int.* 1984;36: 25-30.
- Melcher AH. On the repair potential of periodontal tissues. *J Periodontol.* 1976;47:256-260.
- Melcher AH. Repair of wounds in periodontium of the rat. Influence of periodontal ligament on osteogenesis. *Archs Oral Biol.* 1970;15:1183-1204.
- Mellonig JT. Enamel matrix derivative for periodontal reconstructive surgery: Technique and clinical and histologic case report. *Int J Periodontics Rest Dent.* 1999;19:9-19.
- Miron RJ, Wei L, Bosshardt DD, Buser D, Sculean A, Zhang Y. Effects of enamel matrix proteins in combination with a bovine-derived natural bone mineral for the repair of bone defects. *Clin Oral Investig.* 2014;18(2):471-478.
- Miron RJ, Wei L, Yang S, Caluseru OM, Sculean A, Zhang Y. Effect of enamel matrix derivative on periodontal wound healing and regeneration in an osteoporotic model. *J Periodontol.* 2014;85(11):1603-1611.
- Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001;71:354-361.
- Mundy GR. *Bone remodeling and Its Disorders: Martin Dunits*, 1999;1-11.
- Narayanan AS, Clagett JA, Page RC. Effect of inflammation on the distribution of collagen types I, III, IV and V and Type I trimer and fibronectin in human gingiva. *J Dent Res.* 1985;64:1111-1116.
- Narayanan AS, Page RC. Connective tissues of the periodontium: a summary of current work. *Collagen Rel Res.* 1983;3:33-64.
- Nasr HF, Aichelmann-Reidy ME, Yukna RA. Bone and bone substitutes. *Periodontol* 2000. 1999;19:74-86.
- Nassar CA, Nassar PO, Andia DC, Guimarães MR, Spolidorio LC. The effects of up to 240 days of tacrolimus therapy on the gingival tissues of rats--a morphological evaluation. *Oral Dis.* 2008;14(1):67-72.
- Nemcovsky CE, Zahavi S, Moses O, Kebudi E, Artzi Z, Beny L, Weinreb M. Effect of enamel matrix protein derivative on healing of surgical supra-infrabony periodontal defects in the rat molar: a histomorphometric study. *J Periodontol.* 2006;77:996-1002.
- Nyman S, Gottlow J, Karring T, Lindhe J. The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in monkey. *J Clin Periodontol.* 1982b;9:257-265.

- Nyman S, Lindhe J, Karring T, Rylander H. New attachment following surgical treatment of human periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 1982a;9(4):290-296.
- Oringer RJ. Biological mediators for periodontal and bone regeneration. *Compend Contin Educ Dent.* 2002;23: 501-503.
- Palmer RM, Cortellini P. Periodontal tissue engineering and regeneration: Consensus Report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35.
- Papapanou PN, Tonetti MS. Diagnosis and Epidemiology of Periodontal Osseous Lesions, *Periodontol 2000.* 2000;22:8-21.
- Pereira AC, Fernandes RG, Carvalho YR, Balducci I, Faig-Leite H. Bone healing in drill hole defects in spontaneously hypertensive male and female rats' femurs. A histological and histometric study. *Arq Bras Cardiol.* 2007;88(1):104-109.
- Perry A, Stafford SL, Scheithauer BW, Suman VJ, Lohse CM. Meningioma Grading. An analysis of histological parameters, *Am J Surg Pathol.* 1997;21:1455-1465.
- Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: Continuous improvement of oral health in the 21st century - The approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2003;31(1):3-24.
- Petinaki E, Nikolopoulos S, Castanas E. Low stimulation of peripheral lymphocytes, following in vitro application of Emdogain. *J Clin Periodontol.* 1998;25:715-720.
- Petri III WH. Evaluation of antibiotic-supplemented bone allograft in a rabbit model. *J Oral Maxillofac Surg.* 1991;49:392-396.
- Pettersson EC, Aukhil I. Citric acid conditioning of roots affects guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *J Periodont Res.* 1986;21:543-552.
- Pilstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal Diseases. *Lancet.* 2005;19;366(9499):1809-1820.
- Pimentel SP, Sallum AW, Saldanha JB, Casati MZ, Nociti Jr FH, Sallum EA. Enamel matrix derivative versus guided tissue regeneration in the presence of nicotine: a histomorphometric study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2006;33:900-907.
- Pinholt EM, Solheim E, Bang G, Sudman E. Bone induction by composites of bioresorbable carriers demineralized bone in rats: A comparative study of fibrin collagen paste, fibrin sealant and polyorthoester with gentamicin. *J Oral Maxillofac Surg.* 1992;50:1300-1304.

- Pitaru S, McCulloch CAG, Narayanan SA. Cellular origins and differentiation control mechanisms during periodontal development and wound healing. *J Periodont. Res.* 1994;29:81-94.
- Polimeni G, Xiropaidis AV, Wikesjö UM. Biology and principles of periodontal wound healing/regeneration. *Periodontol 2000.* 2006;41:30-47.
- Polson AM, Proye MP. Fibrin linkage: a precursor for new attachment. *J Periodontol.* 1983;54(3):141-147.
- Ramseier CA, Abramson ZR, Jin Q, Giannobile WV. Gene therapeutics for periodontal regenerative medicine. *Dent Clin North Am.* 2006;50:245-263.
- Rasperini G, Ricci G, Silvestri M. Surgical technique for treatment of infrabony defects with enamel matrix derivative (Emdogain): 3 case reports. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1999;19:579-587.
- Reddy M. Regenerating periodontal support: a comparison of today's procedures. *JADA.* 1995;126(5):583-591.
- Regan A. The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine&Growth Factor Reviews,* 2003;14(6)479-488.
- Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegård D. Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87(12):4473-4475.
- Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanism of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol 2000.* 1997;14:144-157.
- Robinson C, Brookes SJ, Shore RC, Kirkham J. The developing enamel matrix: nature and function. *Eur J Oral Sci.* 1998;106:282-291.
- Romanos GE, Schroter KC, Hinz N, Wachtel HC, Bernimoulin J-P. Immunohistochemical localization of collagenous components in healthy periodontal tissues of the rat and marmoset (*Callithrix jacchus*). II. Distribution of collagen types IV, V and VI. *J Periodont Res.* 1991;26:323-332.
- Rosen PS, Reynolds MA, Bowers GM. The treatment of intrabony defects with bone grafts. *Periodontol 2000.* 2000;22:88-103.
- Rosenberg E, Rose LF. Biologic and Clinical Considerations for Autografts and Allografts in Periodontal Regeneration Therapy. *Advances in Periodontics, Part II.* *Dent Clin North Am.* 1998;42(3):467-490.
- Rossi AC, Freire AR, Perussi MR. Use Homologous Bone Grafts in Maxillary Sinus Lifting. *Int J Odontostomat.* 2012;6(1):19-26.
- Salgado AJ, Coutinho O, Reis RL. Bone tissue engineering: State of the art and future trends. *Macromol Biosci.* 2004;4(8):743-765.

- Sawae Y, Sagara T, Kawana F, Sasaki T. Effects of enamel matrix derivative on mineralized tissue formation during bone wound healing in rat parietal bone defects. *J Electron Microsc.* 2002;51:413-423.
- Schallhorn RG. Present status of osseous grafting procedures. *J Periodontol.* 1977;48:570-576.
- Schmitz JP, Hollinger JO. The critical size defect as an experimental model for cranio-mandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* 1986; 77: 1658-1664
- Schonfeld SE. Demonstration of an alloimmune response to embryonic enamel matrix proteins. *J Dent Res.* 1975;54:72-77.
- Schwartz Z, Carries Jr. DL, Pulliam R, Lohmann CH, Sylvia VL, Liu Y, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD. Porcine fetal enamel matrix derivative stimulates proliferation but not differentiation of pre-osteoblastic 2T9 cells, inhibits proliferation and stimulates differentiation of osteoblast-like MG63 cells, and increases proliferation and differentiation of normal human osteoblast NHOst cells. *J. Periodontol.* 2000;71:1287-1296.
- Schwartz Z, Mellonig JT, Carnes DL, De la Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, Boyan BD. Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol.* 1996;67:918-926.
- Sculean A, Donos N, Brex M, Reich E, Karring T. Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experimental study in monkeys. *J Clin Periodontol.* 2000;27:466-472.
- Sculean A, Donos N, Reich E, Karring T, Brex M. Regeneration of oxytalan fibres in different types of periodontal defects: a histological study in monkeys. *J Periodontal Res.* 1998;33(8):453-459.
- Sculean A, Donos N, Schwarz F, Becker J, Brex M, Arweiler NB. Five year results following treatment of intrabony defects with enamel matrix proteins and guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol.* 2004;31:541-549.
- Sculean A, Donos N, Windisch P, Brex M, Gera I, Reich E, Karring T. Healing of human intrabony defects following treatment with enamel matrix proteins or guided tissue regeneration. *J Periodont Res.* 1999a;34:310-322.
- Sculean A, Reich E, Chiantella GC, Brex M. Treatment of intrabony periodontal defects with an enamel matrix protein derivative (Emdogain): A report of 32 cases. *Int J Periodont Rest Dent.* 1999b;19:157-163.
- Sculean A, Schwarz F, Milianuskaite A, Kiss A, Arweiler N, Becker J, Brex M. Treatment of intrabony defects with an enamel matrix protein derivative or bioabsorbable membrane: an 8 year follow-up split mouth study. *J Periodontol.* 2006;77:1879-1886.

- Sculean A, Windisch P, Keglevich T, Chiantella C, Gera I, Donos N. Clinical and histologic evaluation of human intrabony defects treated with an enamel matrix protein derivative combined with a bovine-derived xenograft. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2003;23:47-55.
- Selvig KA, Bogle GC, Sigurdsson TJ, Wikesjö UM. Does root surface conditioning with citric acid delay healing? *J Clin Periodontol.* 1996;23:119-127.
- Selvig KA. Discussion: animal models in reconstructive therapy. *J Periodontol.* 1994;65(12):1169-1172.
- Shahmiri S, Singh IJ, Stahl SS. Clinical response to the use of the HTR polymer implant in human intrabony lesions. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 1992;12:294-299.
- Sheela ML, Ramakrishna MK, Salimath BP. Angiogenic and proliferative effects of the cytokine VEGF in Ehrlich ascites tumor cells is inhibited by *Glycyrrhiza glabra*. *Int Immunopharmacol* 2006;6(3):494-498.
- Sikavitsas VI, Temenoff JS, Mikos AG. Biomaterials and bone mechanotransduction. *Biomaterials.* 2001;22:2581-2593.
- Sodek J, Chen J, Nagata T, Kasugai S, Todescan R Jr, Li IW ve ark. Regulation of osteopontin expression in osteoblasts. *Ann N Y Acad Sci.* 1995;760:223-241.
- Sodek J, Ganss B, McKee MD. Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000;11(3):279-303.
- Sommers BN, Eisenstein SM. Donor site pain from the ileum: a complication of lumbar spine fusion. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;71:677-680.
- Spahr A, Lyngstaads SP, Boeckh C, Andersson C, Podbielski A, Haller B. Effect of the enamel matrix derivative (Emdogain) on the growth of periodontal pathogens in vitro. *J Clin Periodontol.* 2002;29:62-72.
- Spector M. Basic principles of scaffolds in tissue engineering in biomaterials. In: Lynch SE, Marx RE, Nevins M, Wisnerlynch LA. *Tissue engineering.* 2 baskı Hanover, Quintessence Pub Co. 2008; 26-35.
- Spector M. Basic principles of tissue engineering. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE, editors. *Tissue Engineering,* Quintessence Publishing Co, Inc., Chicago, Berlin, London, Tokyo, Paris, Barcelona, Sao Paulo, Moscow, Prague, Warsaw, 1999.
- Standal T, Borset M, Sundan A. Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Exp Oncol.* 2004;26(3):179-184.
- Stevenson S, Li XQ, Martin B. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue antigen match and mismatch edosteocondral allografts in dogs. *J Bone J Surg.* 1991;73:1143-1156.

- Şahin B, Aslan H, Ünal B, Canan S, Bilgiç S, Kaplan S, Tümkaya L. Brain volumes of the lamb rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. *Anal Stereol.* 2001;20:9-13.
- Taba M Jr, Jin Q, Sugai JV, Giannobile WV. Current concepts in periodontal bioengineering. *Orthod Craniofac Res.* 2005;8:292-302.
- Takano-Yamamoto T, Kawakami M, Sakuda M. Effect of a pulsed electromagnetic field on demineralized bone matrix induced bone formation in the premaxilla of rats. *J Dent Res* 1992;71(12):1920-1925.
- Tal H, Pitaru S, Moses O, Kozlovsky A. Collagen gel and membrane in guided tissue regeneration in periodontal fenestration defects in dogs. *J Clin Periodontol.* 1996;23:1-6.
- Teker AM, Korkut AY, Gedikli O, Kahya V. Prospective, controlled clinical trial of Ankaferd Blood Stopper in children undergoing tonsillectomy. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2009;73:1742-1745.
- Testai L, Chericoni S, Calderone V ve ark. Cardiovascular effects of *Urtica Dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: in vitro and in vivo pharmacological studies. *J Ethnopharmacol.* 2002;81(1):105-109.
- Thaller SR, Hoyt J, Borjeson K, Dart A, Tesluk H. Reconstruction of calvarial defects with anorganic bovine bone mineral (Bio-Oss) in a rabbit model. *J Craniofac Surg.* 1993;4:79-84.
- Thaller SR, Hoyt J, Dart A, Borjeson K, Tesluk H. Repair of experimental calvarial defects with Bio-Oss particles and collagen sponges in a rabbit model. *J Craniofac Surg.* 1994;5:242-246.
- Tonetti MS, Lang NP, Cortellini P, Suvan JE, Adrian P, Dubravec D ve ark. Enamel matrix proteins in the regenerative therapy of deep intrabony defects. A multicenter in the regenerative therapy of deep intrabony defects. A multicenter randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol.* 2002;9:317-325.
- Tuskan C, Yaltirik M. Oral ve Maksillofasiyal Cerrahide Kullanılan Biyomateryaller. *İst Üni Diş Hek Fak Yayın.* 2002;17-52.
- Tzaphlidou M. Diameter distributions of collagenous tissues in relation to sex. A quantitative ultrastructural study. *Micron.* 2001;32(3):333-336.
- Uitto J, Olsen, DR, Fazio MJ. Extracellular matrix of the skin: 50 years of progress. *J Soc Invest Dermatol.* 1989;92(4):61-77.
- Vacanti CA, Vacanti JP. The science of tissue engineering. *Orthop Clin North Am.* 2000;31(3):351-356.

- Van der Pauw M, Van den Bos T, Everts V, Beertsen W. Enamel matrix derived protein stimulates attachment of periodontal ligament fibroblasts and enhances alkaline phosphatase activity and transforming growth factor [1 release of periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontol.* 2000;71:31-43.
- Van Rossum TG, Vulto AG, Hop WC, Brouwer JT, Niesters HG, Schalm SW. Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *J Gastroenterol Hepatol.* 1999;14(11):1093-1099.
- Vertenten G, Gasthuys F, M C, Schacht E, Vlaminck L. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics. *Vet Comp Orthop Traumatol.* 2010;23(3):153-162.
- Wachtel H, Schenk G, Böhm S, Weng D, Zuhr O, Hürzeler MB. Microsurgical access flap and enamel matrix derivative for the treatment of periodontal intrabony defects: a controlled clinical study. *J Clin Periodontol.* 2003;30:496-504.
- Wang HL, Carroll WJ. Using absorbable collagen membranes for guided tissue regeneration, guided bone regeneration, and to treat gingival recession. *Compend Contin Educ Dent.* 2000;21(5):399-406.
- Wang HL, Greenwell H. Surgical periodontal therapy. *Periodontol 2000.* 2001;25:89-99.
- Wang HL, MacNeil RL. Guided Tissue Regeneration: Absorbable Barriers. *Dent Clin North Am.* 1998;42:505-522.
- Wikesjö UM, Kean CJ, Zimmerman GJ. Periodontal repair in dogs: supraalveolar defect models for evaluation of safety and efficacy of periodontal reconstructive therapy. *J Periodontol.* 1994;65(12):1151-1157.
- Wikesjö UME, Claffey N, Christensson LA. Repair of periodontal furcation defects in beagle dogs following reconstructive surgery including root surface demineralizing with tetracycline hydrochloride and topical fibronectin application. *J Clin Periodontol.* 1988;15(1):73-80.
- Wilczewska JS, Koszowski R, Pająk J. Comparison of postoperation bone defects healing of alveolar processes of maxilla and mandible with the use of Bio-Gen and Bio-Oss. *J Clin Exp Dent.* 2010;2(2):60-66.
- Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T, Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from Grape Seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis Jan.* 1999;142(1):139-149.
- Yenigün C. Mine matriks protein türevleri ile Trombositten Zengin Plazmanın Periodontal kemik defektlerin tedavisinde kullanımının klinik olarak karşılaştırılması. Yeditepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Doktora tezi, 2011.



- Yılmaz S, Kuru B, Altuna-Kırac E. Enamel matrix proteins in the treatment of periodontal sites with horizontal type of bone loss. *J Clin Periodontol.* 2003;30:197-206.
- Yokota T, Nishio H, Kubota Y, Mizoguchi M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. *Pigment Cell Res.* 1998;11(6):355-361.
- Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthoped Trauma.* 1989;3(3):192-195.
- Zeichner MD. Regeneration of periodontal tissues: cementogenesis revisited. *Periodontol 2000.* 2006;41:196-217.
- Zetterström O, Andersson C, Eriksson L, Fredriksson A, Friskopp J, Heden G ve ark. Clinical safety of enamel matrix derivative (Emdogain) in the treatment of periodontal defects. *J Clin Periodontol.* 1997;24:697-704.
- Zucchelli G, Bernardi F, Montebugnoli L, De Sanctis M. Enamel matrix proteins and guided tissue regeneration with titanium-reinforced expanded polytetrafluoroethylene membranes in the treatment of intrabony defects: A comparative controlled clinical trial. *J Periodontol.* 2003;73:3-12.



Ek. Hayvan deneyleri yerel etik kurul onayı



T.C.  
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU  
SAMSUN

Sayı : B.30.2.ODM.0.20.09.00-050.04 -92  
Konu : Araştırma Projeniz hk.

28/11/2013

Doç. Dr. Burcu ÖZKAN ÇETİNKAYA  
Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı

2013/55 numaralı "Ankaferd Kan Durdurucu®'nun Sıçanlarda Oluşturulan Periodontal Defektlerin Rejenerasyonuna Etkisi." konu başlıklı Projeniz; Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 27.11.2013 tarihli toplantısında görüşülmüş, Hayvan Hakları ve Dene Etiği açılarından uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.

Araştırmanın yürütüldüğü süreç içinde etik kurallar ve hayvan haklarına uygunluk yönünden sorumluluk araştırmacılara ait olmak kaydıyla ve 6 aylık dönemler halinde Çalışma Raporu verilmesi şartıyla çalışmanıza başlamanız uygun görülmüştür.

Prof. Dr. R. Cankon GERMİYANOĞLU  
HADYEK Başkan

---

Alınan kararlar Kurul kararıdır. Kararla ilgili Kurul üyelerinin aranması etik değildir. İtirazlarınızı yazılı olarak Etik Kurul sekreterliğine başvurmanız gerekmektedir.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Şevki GÜLER

Doğum Yeri: Samsun

Doğum Tarihi: 15/05/1985

Medeni Hali: Evli

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

1991-1996 İlköğretim, Mustafa Kemal İlkokulu, Samsun

1996-1999 Orta öğretim, İlkadım İlköğretim okulu, Samsun

1999-2003 Lise öğrenimi, Tülay Başaran Anadolu Lisesi, Samsun

2004-2010 Lisans, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Samsun

2010- Doktora, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Periodontoloji AD., Samsun

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

E-posta: dtsevkiguler@gmail.com

