

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE OTOJEN KEMİK
GREFTİ UYGULAMALARININ KÖPEKLERDE
FENESTRASYON TİPİ DEFEKTLERDE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

İlker KESKİNER

Samsun
Ağustos-2007

T.C.
ONDOKUZMAYIS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
PERİODONTOLOJİ ANABİLİM DALI

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE OTOJEN KEMİK
GREFTİ UYGULAMALARININ KÖPEKLERDE
FENESTRASYON TİPİ DEFEKTLERDE İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

İlker KESKİNER

Danışman: Prof. Dr. Gökhan AÇIKGÖZ
Yrd. Doç. Dr. Arzu ALKAN

Samsun
Ağustos-2007

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam ve doktora eğitimim boyunca tecrübe ve bilgisiyle bana yol gösteren; yardımlarını ve vaktini benden esirgemeyen değerli hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Arzu ALKAN'a, doktora eğitimim ve tez çalışmalarım boyunca bölümde rahat bir çalışma ortamı sağlayan ve hoşgörüsünü esirgemeyen hocam sayın Prof. Dr. Gökhan AÇIKGÖZ'e, tezin fikir aşamasından itibaren bilimsel ve teknik bilgilerinden faydalandığım, Ankara'dan desteğini sürekli hissettiğim hocam sayın Prof. Dr. Nejat ARPAK'a,

Cerrahi Araştırma Laboratuvarında, zor duruma düştüğümde yardımlarıyla işlerimi kolaylaştıran hocam sayın Doç. Dr. Murat HÖKELEK'e, tüm işlemlerde yardımlarından dolayı minnettar olduğum Mustafa İNCE'ye ve Faruk ÇEVİK'e,

OMÜ Tıp Fak. Kan Bankası'nın teknik şartlarından sorunsuzca faydalanmamı sağlayan hocam sayın Prof. Dr. Davut ALBAYRAK'a ve tezimin işleyişinde çok önemli olan işlemleri hassas ve özverili çalışarak halleden Salih KOÇ'a,

Tezin histolojik inceleme aşamasında bilgisi ve tecrübesi ile bana yardımcı olan O.M.Ü. Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyesi sayın Prof. Dr. Süleyman KAPLAN'a, Gazi Osman Paşa Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji AD. Öğretim Üyeleri sayın Yrd. Doç. Dr. Ayten Türkkani Tunç ve Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Aslan'a, ayrıca Fikret GEVREK'e,

Yardımlarından dolayı bölümdeki hocalarıma,

Başta İnanç CENGİZ olmak üzere, doktora ve tez çalışmalarım süresince emeği geçen bölüm arkadaşlarıma,

Tezimin istatistiksel analizinde vaktini ve yardımlarını esirgemeyen hocam sayın Doç. Dr. Tamer TÜRK'e,

Hayatım her döneminde doktora eğitimim boyunca da benden maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, bu günlere gelmemi sağlayan sevgili annem Remziye KESKİNER ve babam Mustafa KESKİNER'e, desteğini sürekli hissettiğim kardeşim Alper KESKİNER'e

Bu doktora tezi için en büyük fedakarlıkları yapan, oğlum ALP ile geceleri tek başına savaşan sevgili eşim Sevim KESKİNER'e

İçten ve sonsuz teşekkürler.

**TROMBOSİTTEN ZENGİN PLAZMA VE OTOJEN KEMİK GREFİ UYGULAMALARININ
KÖPEKLERDE FENESTRASYON TİPİ DEFEKTLERDE İNCELENMESİ**

İlker KESKİNER, Doktora Tezi

Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Samsun, Ağustos 2007

Trombositten Zengin Plazma (TZP), küçük hacimli bir plazma içinde trombositlerin konsantre edilmiş halidir. Trombosit konsantrasyonu olduğu için aynı zamanda tüm yara iyileşmelerini başlatan ve trombositlerden salındığı kanıtlanmış büyüme faktörlerinin de konsantrasyonudur. Bu çalışmanın amacı trombositten zengin plazmanın kemik ve sement dokularının rejenerasyonu üzerine etkilerini tek başına ve otojen kemik grefti ile beraber 3 farklı zaman aralığında değerlendirmektir.

Çalışmada 6 adet Türk çoban köpeği kullanılmıştır. Köpeklerden alınan kandan TZP hazırlanmasını takiben standart 4x4 mm fenestrasyon defektleri oluşturulmuştur. Defektler TZP, otojen kemik, otojen kemik + TZP uygulanan ve kontrol (boş defekt) olmak üzere 4 gruba ayrılmıştır. Histomorfometrik olarak stereolojik yöntem ile defektlerde trabeküler kemik ve sement alanı oranları 4., 8. ve 12. haftalarda incelenmiştir.

TZP'deki trombosit sayısı ortalaması kandakine göre 5.18 kat artmış bulunmuştur ($p < 0.05$). Trabeküler kemik alanı oranları grup içi karşılaştırıldığında tüm gruplarda 4. ve 8. haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenirken 8. ve 12. haftalar arasında fark gözlenmemiştir. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında 4. ve 8. haftalarda TZP, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak daha olumlu sonuçlar vermesine rağmen 12. haftada fark gözlenmemiştir. Tüm zaman aralıklarında trabeküler kemik alanı oranı yönünden otojen kemik grubu ve otojen kemik + TZP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Sement alanı oranları grup içi karşılaştırıldığında 4. haftada TZP ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir. Fakat otojen kemik ve otojen kemik + TZP grupları kontrol grubuna göre farklı bulunmuştur. 8. ve 12. haftalar karşılaştırıldığında tüm gruplar arasında fark gözlenmemiştir.

Sonuç olarak TZP tek başına kullanıldığında erken dönemde boş bırakılan defekte göre daha hızlı kemik oluşumuna neden olabilir. Otojen kemiğe TZP ilavesi otojen kemiğin tek başına kullanılmasına göre ilave fayda sağlamamaktadır. TZP'nin tek başına kullanıldığında erken dönemde trabeküler kemik alanı için sağladığı olumlu etki sement oluşumunda gözlenmemiştir. TZP; greftle beraber kullanıldığında uygulamayı kolaylaştıran, ekonomik, bulaşıcı hastalık riski bulunmayan ve tek başına kullanıldığında erken dönemde kemik oluşumuna olumlu etkileri olan bir yapıdır.

ABSTRACT**THE EXAMINATION OF PLATELET RICH PLASMA AND AUTOGENOUS BONE
GRAFT COMPARISION IN FENESTRATION DEFECTS IN DOGS****İlker KESKİNER, Ph.D. Thesis****Ondokuz Mayıs University, Samsun, August 2007**

Platelet Rich Plasma (PRP) is concentration of platelets in a small volume of plasma. Because it is a concentration of platelets, it is also a concentration of growth factors proved to be actively secreted by platelets to initiate all wound healing. The aim of this study was to evaluate the effect of platelet rich plasma on the regeneration of bone and cement tissues with using autogenous bone and alone in the 3 different time periods.

6 Turkish sheepdogs were included in the study. After preparing PRP from the blood taken from the dogs the standart 4x4 mm fenestration defects were formed. The defects were separated as PRP alone, autogenous bone, autogenous bone+PRP and no treatment as a control groups. Trabecular bone and cement ratios in the defects were examined histomorphometricaly with the stereologic method in the 4., 8. and 12. weeks.

The mean platelet number of PRP increased 5.18 times accordance with the blood's ($p<0.05$). When the trabecular bone area ratios were compared in the groups, there was statistically significant difference in the 4.and 8. weeks, however, no difference in the 8. and 12. weeks. Between the groups, PRP group gave statistically significant results in the 4. and 8. weeks when compared with the control group, however, there was no difference in the 12. week. In the all time intervals for trabecular bone area ratios there was no statistically difference in the autogenous bone and autogenous bone+PRP groups. When the cement area ratios were compared there was no statistically difference between PRP and control groups in the 4. week. When the 8. and 12. weeks were compared, there was no statistically difference between all the groups.

As a conclusion, PRP may cause faster bone formation when used alone accordance with the empty defect. The addition of PRP to the autogenous bone may secure no benefit when the trabecular bone ratios were evaluated. The benefit seen in the early time periods for the trabecular bone ratios when the PRP used alone, was not seen in the cement formation. PRP is a structure which facilitates the manipulation of the graft, which is economic and which has no disease transmission risk and has positive effects to the bone formation when used alone.

SİMGELER ve KISALTMALAR

DFDBA	Demineralize Edilmiş Dondurulmuş Kurutulmuş Kemik Allogrefti
e-PTFE	Genişletilmiş politetrafloroetilen (expanded Polytetrafluoroethylene)
FDBA	Dondurulmuş Kurutulmuş Kemik Allogrefti
FGF	Fibroblast Büyüme Faktörü (Fibroblast Growth Factor)
IGF:	İnsülin benzeri Büyüme Faktörü (Insulin-like Growth Factor)
PDAF	Trombosit Kaynaklı Anjiogenezis Faktörü (Platelet-derived Angiogenesis Factor)
PDGF	Trombosit Kaynaklı Büyüme faktörü (Platelet Derived Growth Factor)
PDEGF	Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü (Platelet-Derived Epidermal Growth Factor)
RPM	Dakikadaki Dönme Sayısı (Round Per Minute)
TGF- β	Transforme Edici Büyüme Faktörü- β (Transforming Growth Factor- β)
TZP	Trombositten Zengin Plazma
VEGF	Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (Vascular Endothelial Growth Factor)
YDR	Yönlendirilmiş Doku Rejenerasyonu

vii
İÇİNDEKİLER

İç Kapak	i
Kabul ve Onay	ii
Teşekkür	iii
Türkçe Özet	iv
İngilizce Özet	v
Kısaltmalar	vi
İçindekiler	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.Periodontal Rejenerasyon ve YDR Tekniği	3
2.2.Kemik Greftleri	5
2.2.1. Otojen Kemik Greftleri	8
2.3. Trombositten Zengin Plazma	11
2.3.1. Büyüme Faktörleri	13
2.3.1.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü	14
2.3.1.2. Transforme Edici Büyüme Faktörü-β	16
2.3.1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü	17
2.3.1.4. Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü	18
2.3.1.5. Trombosit Kaynaklı Anjiogenezis Faktörü	18
2.3.1.6. Fibroblast Büyüme Faktörü	18
2.3.1.7. Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü	19
2.3.1.8. Büyüme Faktörleri Arasındaki İlişkiler	19
2.4. Stereolojik Histolojik İnceleme Yöntemi	26
2.4.1. Hacim Hesaplaması İçin Kesit Yüzey Alanlarının Hesaplanması	28
2.4.2. Toplam Hacmin Hesaplanması	30
3. GEREÇ ve YÖNTEM	32
3.1. Çalışmada Kullanılan Denek Hayvanları	32
3.2. Deneklerin Hazırlanması	32

3.3. Trombositten Zengin Plazmanın Hazırlanması	32
3.4. Cerrahi İşlem	33
3.4.1. Otojen Kemik Greftinin Hazırlanması	36
3.4.2. TZP ve Otojen Kemik Greftinin Karşılaştırılması	36
3.5. Histolojik İnceleme	39
4. BULGULAR	43
4.1. Grup içi Trabeküler Kemik Alanı Oranları Karşılaştırması	44
4.2. Gruplar arası Trabeküler Kemik Alanı Oranları Karşılaştırması	45
4.3. Grup içi Sement Alanı Oranları Karşılaştırması	48
4.4. Gruplar arası Sement Alanı Oranları Karşılaştırması	49
4.5. İstatistiksel Analiz	57
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
7. KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	88

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Periodontal hastalıklar gelişmiş ülkeler de dahil olmak üzere tüm toplumlarda en sık gözlenen hastalıklardan biridir. Günümüz periodontoloji biliminde hastalığın durdurulması yanında kaybedilen dokuların rejenerasyonunun sağlanması temel hedeflerden biri haline gelmiştir. Periodontal rejenerasyonun başarısı; enflamasyon ile zarar görmüş dişeti bağ dokusunun rejenerasyonunu, sement oluşumunu, kayıp kemiğin tamirini, bağ dokusu fibrillerinin yeniden oluşumunu gerektirir. Rejenerasyonu sağlamak amacıyla günümüzde çok çeşitli insan, hayvan ve sentetik kaynaklı kemik greft materyalleri, bariyer membranlar ve büyüme faktörlerinin tek başına veya birlikte kullanıldığı farklı teknikler mevcuttur. Kemik greft materyalleri arasında otojen kemik grefti altın standart olarak kabul edilmektedir. Otojen kemik greftinin diğer tüm greft materyallerine göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlar arasında hastanın kendisinden elde edilmesinden dolayı içerdiği progenitör hücreler ile en yüksek rejeneratif kapasiteye sahip olması, antijenik ve toksik olmayışı, çapraz enfeksiyon riskinin bulunmayışı en başta gelen özellikleridir. Ayrıca maliyetinin olmaması da diğer bir önemli ekonomik özelliktir. Son yıllarda çalışmaların ivme kazandığı alanlardan biri trombositten zengin plazma (TZP) kullanılarak yapılan rejeneratif işlemlerdir. TZP'nin kullanılışındaki amaç basittir. Trombositlerin hemostaz dışında görevleri olduğu çok iyi bir şekilde bilinmektedir. Trombositlerin granülleri içinde salındıklarında mitozisi, kollajen sentezini artıran, diğer hücreleri yara bölgesine çeken, vasküler gelişimi başlatan, hücre farklılaşmasını arttıran büyüme faktörleri bulunmaktadır. Bu olaylar yara iyileşmesinde önemli olan aşamalardır. Bu fikirden yola çıkarak azı bile iyi ise çoğu daha iyidir mantığı ile trombositlerin konsantrasyonu artırılarak yara bölgesinin hızlı ve daha iyi bir şekilde iyileşebileceği düşünülmektedir. Bu mantık zinciri kemik söz konusu olduğunda daha yoğun bir kemiğin daha hızlı bir şekilde elde edilebilme ihtimalini akla getirmektedir. Otojen kemik grefti için yukarıda sözü geçen tüm olumlu özellikler trombositten zengin plazma için de geçerlidir. Günümüze kadar trombositten zengin plazma çeşitli greft materyalleri ile karıştırılarak klinik olarak kullanılmıştır. Fakat histolojik olarak iyileşmeyi inceleyen çalışma az sayıda olup, trombositten zengin plazmanın otojen kemik grefti ile birlikte periodontal defektlerde kullanımını inceleyen ve yeni oluşan sementi değerlendiren çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmanın amacı TZP ve otojen kemik greftinin tek başlarına veya beraber kullanılmalarının kemik ve sement oluşumlarına olan etkilerini belli zaman aralıklarında stereolojik metod kullanarak karşılaştırmalı olarak incelemektir. Böylelikle, iki otojen kaynaklı ürün birlikte kullanılarak rejeneratif kapasitenin artırılmasının mümkün olup olmadığı test edilecek ve sonuçların olumlu olması durumunda ülke ekonomisine yük getirmeyen otojen kaynaklı ürünlere dikkat çekilmiş olacaktır. Çünkü, ülkemizde sıkça kullanılan biyomateryallerin tamamı yurtdışından ithal edilmekte olan son derece pahalı malzemelerdir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Periodontal Rejenerasyon ve YDR Tekniği

Periodonsiyum; dişeti, alveol kemiği, periodontal ligament ve sementten oluşan, dişi destekleyen bir doku bütünüdür ve kaybedilmesi durumunda periodontal hastalık ortaya çıkar. Bunun sonucu meydana gelen kemik defektlerinde rejenerasyonun sağlanması periodontoloji biliminde üzerinde en çok çaba harcanan konulardan biridir. Periodontal tedavinin esas amacı, hastalık sonucu kaybedilmiş periodontal dokuları orijinal yapı ve fonksiyonu ile mümkün olan en kısa zamanda hastaya geri kazandırmaktır. Fakat hasarlı periodonsiyumun tam olarak rejenerasyonunu sağlamak kolay değildir.

Rejenerasyonun kriterleri temel olarak; dişlerin apikalinden koroneline doğru uzanan yeni sement oluşumu, yeni oluşan sementle yeni oluşan kemik arasında uzanan fonksiyonel olarak düzenlenmiş periodontal ligament fibrillerinin varlığı şeklinde tanımlanmaktadır (Melcher, 1976).

Periodontal ligament hücrelerinin rejenerasyon için yara bölgesinde çoğalması gerekmektedir; bunun nedeni sadece periodontal ligament hücrelerinin; sement ve kollajen liflerin oluşumu ile yeni bağ dokusu ataşmanını gerçekleştirebilmeleridir. Periodontal ligament hücreleri dişında kemik hücrelerinin de kökte rezorbsiyon ve ankiloz oluşturma riski bulunmasına rağmen farklılaşma potansiyelleri olduğu bilinmektedir (Karring ve ark., 1993). Osteoblastlar tamamen periodonsiyum hücrelerine dönüşemeseler de oluşacak yeni kemik, periodontal rejenerasyon için oldukça önemlidir. Komşu yeni kemik oluşumu olmaksızın yeni sement birikiminin olduğu bölgeler rejenerasyon kriterlerini tam olarak sağlamamaktadır.

Bariyer membranla yönlendirilmiş doku rejenerasyonunun (YDR), epitel ve dişeti bağ dokusu hücrelerinin kök yüzeyindeki pıhtı içine göç etmesini engellemede başarılı olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Magnusson ve ark., 1985, Aukhil ve ark., 1986, Salama ve ark., 1994). Bu teknikte, YDR yapılmak istenen bölge üzerine fiziksel bir bariyer (membran) yerleştirilir. Bariyer, kemik defekti ve kök üzerinde bir boşluk yaratacak biçimde şekillendirilir. Bu sayede, bariyer altındaki boşlukta

periodontal ligament ve kemik hücreleri pıhtıya doğru göç eder ve rejenerasyonu sağlarlar. Bu yöntem ile yeni oluşan sement ve alveolar kemik arasında fonksiyonel olarak düzenlenmiş periodontal fibrillerin oluşması beklenmektedir (Cortellini ve Tonetti 2000).

Yönlendirilmiş doku rejenerasyonu çalışmalarında, 1993 yılında Cortellini, Pini-Prato ve Tonetti tarafından yapılan ve rezorbe olmayan e-PTFE membran ile tedavi edilmiş 40 kemikiçi defektin klinik sonuçlarının sunulduğu çalışmalar bir dönüm noktasını oluşturmuştur (Cortellini ve ark., 1993a; 1993b; 1993c; Prato ve ark.,1993; Tonetti ve ark., 1993). Yirmiüç hastada toplam 40 kemikiçi defektin rejeneratif yöntemle tedavi edildiği ve re-entry sonuçlarının değerlendirildiği çalışmalarda, tedaviden bir yıl sonra ortalama 4.1 mm ataşman kazancı ve ortalama 5.9 mm cep derinliği azalması elde edildiği (Cortellini ve ark. 1993a), ortalama 4.3 mm kemik rejenerasyonu olduğu ve histolojik incelemede ortalama 4.6 mm yeni sement ve içine gömülmüş kollajen liflerinin bulunduğu gösterilmiştir (Cortellini ve ark. 1993b). Aynı çalışmanın devamında Tonetti ve ark., (1993) membran altındaki defektin duvar sayısının rejenere olan dokunun miktarını etkilediğini belirtmişlerdir.

Cortellini ve ark., 1994 yılında yayınladıkları çalışmalarında, YDR yönteminin uzun dönem sonuçlarını değerlendirmiş ve sonuçta derin kemikiçi defektlerde elde edilen kazançların en az 4 yıl boyunca idame edebileceğini ve düzenli destekleyici periodontal tedavinin elde edilen ataşman kazancının korunmasını sağladığını belirtmişlerdir.

Kemik rejenerasyonu yöntemleri de günümüz diş hekimliğinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır ve yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu olarak tanımlanmaktadır (McAllister ve Haghghat, 2007, Simion ve ark., 2007). İmplant ve protez tedavisi öncesi kret ogmentasyonlarında, sinüs yükseltilmesi işlemleri sırasında, kist ve tümör operasyonları sonrasında, periodontal olarak desteğini kaybetmiş dişlerde yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ile birlikte yönlendirilmiş kemik rejenerasyonu işlemleri kullanılmaktadır (Carranza ve ark. 2002).

Periodontal dokuların rejenerasyonu için yalnızca periodontal ligament hücrelerinin ve osteoblastların koronale doğru ilerleyecekleri bir boşluk sağlamak yeterli olmamaktadır. Bu hücrelerin koronal yönde ilerleyerek ataşman, proliferasyon ve gerekli ekstraselüler matriks proteinlerinin sentezi ile önceden hastalıklı olan yüzeyde

sürekli fonksiyonlarını yerine getirmeleriyle gerçek bir periodontal rejenerasyon sağlanabilmektedir (Somerman ve ark. 1987).

Bu amaç için günümüzde başta büyüme ve farklılaşma faktörleri olmak üzere birçok sinyal molekülünün yara bölgesine uygulanması gündeme gelmiştir. Bunun dışında periodontal rejenerasyonu sağlamak amacı ile kemik greflerinin kullanımı kuşkusuz ki yıllardır en çok tercih edilen yöntemdir.

2.2. Kemik Greftleri

Doku ve organların kazanılmış veya konjenital defektlerinin rekonstrüksiyonunda yer tutucu ve kemik yapımını uyarıcı etkisi olan materyallere greft adı verilir. Kemik greftleri, periodontal kemik defektlerinin tedavisinde uzun yıllardan beri sıklıkla kullanılmaktadır. Kemiğin yeniden oluşumunun gerektiği cerrahi ve periodontal destek dokuların restorasyonuna ihtiyaç duyulan tüm durumlarda kemik greftleri kullanım alanı bulmaktadır. İdeal kemik greft materyalinin özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Antijenik özellik taşımamalı
2. Karsinojenik ve toksik olmamalı
3. Yapısal olarak güçlü ve dayanıklı olmalı, yeterli destek ve stabiliteyi sağlayabilmeli
4. Enfeksiyona dayanıklı olmalı
5. Kök rezorpsiyonu ya da ankiloza neden olmamalı
6. Kolay uygulanabilmeli ve istenilen forma kolayca getirilebilmeli
7. Hızlı ve yeterli miktarda elde edilebilmeli
8. Minimal cerrahi işlemle kullanılabilirmeli
9. Maliyeti ucuz olmalı
10. Osteoindüktif ve kondüktif özellikleri olmalı
11. Yeni ataşmanı tetiklemelidir. (Rosenberg ve Rose, 1998).

Periodontal dokuların rejenerasyonu açısından değerlendirildiğinde ise ideal kemik greft materyali osteogenez, sementogenez ve kök üzerinde daha koronal seviyede

ataşman sağlayabilmeli, fonksiyonel olarak düzenlenmiş periodontal ligament oluşturabilmelidir. (Aichelmann-Reidy ve Yukna, 1998).

Kemik greftlerinin sınıflandırılması (Nasr ve ark., 1999)

A- İnsan kaynaklı kemik greftleri

- 1- Otojen greftler (Otogreftler)
- 2- Allojenik greftler (Allogreftler)
 - a- Taze dondurulmuş kemik
 - b- Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (FDBA)
 - c- Demineralize edilmiş dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (DFDBA)

B- İnsan kaynaklı olmayan kemik greftleri

- 1- Ksenojenik greftler (Ksenogreftler)
 - a -Sığır kaynaklı hidroksiapatit
 - b-Mercan kalsiyum karbonat
- 2- Alloplastik greftler (Alloplastlar)
 - a-Polimerler
 - b-Bioseramikler
 - i- Trikalsiyum fosfat
 - ii- Hidroksiapatit
 - c- Bioaktif camlar

Greft materyalleri, organik yapıya olan yakınlıkları, bazı hücrelerin varlığı ve sahip oldukları bazı kemik oluşturucu mekanizmalarla çeşitli gruplara ayrılmaktadırlar. Bu mekanizmalar sırasıyla osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyondur (Sandor ve ark., 2003).

Osteogenez, kemik dokusu oluşturma kapasitesine sahip hücrelerin varlığında bu hücrelerin kemik yapımını gerçekleştirme durumudur. Bu hücrelerin kemik yapımını gerçekleştirebilmesi herhangi bir uyarandan veya çevre dokudaki olaylardan bağımsız olarak gerçekleşebilmektedir. Bilindiği gibi canlı kemik hücrelerine sahip tek greft materyali “otojen kemik” yani o canlının kendisine ait kemik dokusudur. Bir başka deyişle osteogenetik karaktere sahip tek greft materyali otojen kemiktir.

Osteoindüksiyon ise doku içerisindeki farklılaşmamış mezenkimal hücrelerin kemik yapıcı osteoblastik hücrelere dönüştürülmesi vasıtasıyla meydana gelen bir tür kemik oluşturma mekanizmasıdır. Otojen kemikle birlikte allogreftler osteoindüktif mekanizmaya sahip greft materyalleri olarak göze çarpmaktadırlar.

Allogreftler o türün içerisindeki başka cinslerin üzerinden elde edilen ve geçirdikleri çeşitli işlemler sonrasında uygulanmaya hazır hale getirilen greft materyalleridir. İnsan kemiği kaynaklı bir başka deyişle kadavralardan elde edilen bu materyaller; geçirdikleri süreçlere göre dondurulmuş, dondurulmuş-kurutulmuş, demineralize dondurulmuş kurutulmuş, demineralize olmayan dondurulmuş kurutulmuş gibi farklı tiplere ayrılmışlardır (Schwartz ve ark., 1996). Allogreftler spongiöz, kortikal ya da bunların kombinasyonu halinde bulunabilirler. DFDB greftlerinin üretimi sırasında takip edilen işlem basamaklarının markalar arasına farklılıklar göstermesi, donörün yaşı cinsiyeti ve ilaç kullanımı, osteoindüktif kapasitelerin standart olmamasına yol açmaktadır. Yaklaşık 30 senedir kullanılmalarına rağmen hastalık bulaşma riski, immün reaksiyona neden olma ihtimali, maliyetleri ile dini ve finansal nedenler kullanımını sınırlandırmaktadır (Ong ve ark., 1998; Parikh, 2002).

Xenogreftler ise hayvansal kaynaklı donörlerden elde edilmiş ve çeşitli işlemlerle deproteinize edilerek organik kısmı uzaklaştırılmış greft materyalleridir (Arpak ve ark.,1997). Bu materyaller kimi kaynaklara göre allogreftlerin bir alt grubu kimi kaynaklara göre ise alloplastlar içerisinde yer alan bir grup olarak kabul edilmektedir. Gerek allogreftlerin gerekse de xenogreftlerin içerdikleri organik yapıdan tam olarak arınmadıklarına ve viral kontaminasyon riski bulunduğuna dair çalışmalar bulunmaktadır (Buck ve ark., 1990).

Osteokondüksiyon ise fiziksel bir özelliktir ve greft materyalinin bir çatı oluşturması ve bu çatının yer tutucu olarak etrafındaki kemik yapıcı hücrelerden kaynaklı apozisyonel kemik büyümesine olanak sağlaması olarak tanımlanmaktadır. Ek olarak kemik defektini çevreleyen yumuşak dokuların defektin içine yürümesini engeller. Ayrıca mikroskobik olarak boşluklar ve kanallar içeren yapısal defekt bölgesinden gelecek olan damarlanmayı ve hücre gelişimini kolaylaştırır.

Sentetik kaynaklı greft materyalleri ya da diğer adıyla alloplastlar greft materyalleri arasında osteokondüktif özelliği dışında başka özelliği bulunmayan tek materyallerdir. Otojen ve allojen kemik greftlerinin bazı dezavantajları sentetik kemik

greftlerinin yaygın olarak kullanımını gündeme getirmiştir. Bu gruba dahil kemik greftleri osteokondüktif özellik gösterir. Bu tip materyaller kimyasal etkisi olmayan doldurma malzemeleridir ve kemikle bütünleşirler. Kemığın üzerlerine ve içlerine doğru birikmesine izin verecek bir iskelet oluştururlar. Klinik sondlama derinliklerinde ve ataşman seviyelerinde anlamlı gelişmeler sağlamalarına rağmen histolojik olarak sınırlı rejenerasyon sağlamışlardır (Nasr ve ark., 1999). Sentetik kemik greftlerinin allogreftlere karşı olan bir diğer avantajı ise bu greftlerde hastalık bulaşma riskinin bulunmamasıdır (Lovelace ve ark., 1998).

Otojen greft materyalleri yukarıda bahsedilen bu üç kemik oluşturucu mekanizmayı da bünyesinde barındırırken, allogreftler osteoindüktif ve osteokondüktif özelliklere sahiptirler (Sandallı ve Karabuda, 1995).

2.2.1. Otojen Kemik Grefti

Otojen kemik greftleri periodontolojide kemik defektlerinin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Biyomateryallerden farklı olarak otojen kemik altın standart olarak kabul edilmektedir. Bunun nedenleri;

- 1- osteogenezisi sağlayan hücrelere sahiptir
- 2- immunolojik cevabı azaltmadan doku reaksiyonları azalmaktadır
- 3- minimal enflamatuar cevap oluşmaktadır
- 4- greft partikülleri tarafında hızlı bir damarlanma oluşmaktadır
- 5- greft içinde bulunan büyüme ve farklılaşma faktörlerinin salınımı söz konusudur (Marx, 1994).

Otojen kemik ağız içi ve ağız dışı olarak iki yoldan elde edilebilir. Mandibulanın uç kısmı (simfiz bölgesi), gövdesi ya da ramus bölgesinden blok halinde intraoral kemik almak mümkündür. Büyük blok greftler periodontal cerrahiden çok implant öncesi ogmentasyon amacıyla kullanılmaktadır. Daha küçük hacimde grefte ihtiyaç olduğunda, maksiller tüber bölgesi, zygoma, ağızdaki mevcut toruslar, kret düzeltmesi sırasında elde edilen kemik parçaları, çekim soketleri, implant hazırlığı sırasında ortaya çıkan kemiklerin toplanması ile elde edilen kemik parçaları kullanılabilir (Misch ve Misch, 1999). Elde edilen otojen kemik belli işlemlerden geçirilip farklı form ve büyüklüklere dönüştürülebilir (kortikal çip (chip), osseoz koagulum, kemik karışımı (bone blend).

Örneğin osseoz koagulum döner başlıklı aletler ile elde edilen kemik parçacıkları ile kanın karıştırılması sonucu elde edilir. Bu tekniğin dezavantajı kemik parçacıklarının büyüklüğü ve miktarının standart olmamasıdır. Bir diğer teknik de trefan frez, çisel veya kemik pensi ile elde edilen kemiğin kemik değirmeninden geçirilerek partikül büyüklüğü daha belirgin kemik karışımı olan bone blend elde edilmesidir.

Çenelerdeki defektlerde kullanılan greftlerin intraoral kaynaklı olması, aynı embriyolojik kökenden geldikleri için avantajlıdır. Tek operasyon bölgesi olması, cerrahi ve anestezi zamanlarını azaltmaktadır. Ağız içi kaynaklı kemik greftleri çabuk iyileşirler ve iyileşirken minimal derecede rezorbe olup yoğun yapılarını korurlar (Misch ve Misch, 1999).

Genel olarak otojen kemiğin yüksek osteojenik potansiyele sahip olduğu kabul edilmektedir ve rejeneratif periodontal tedavi araştırma sonuçları olumludur (Dragoo ve Sullivan, 1973; Hiatt ve Shallhorn, 1973; Renvert ve ark., 1985). Renvert ve ark. (1985), derin kemikiçi defektlerde intraoral otojen kemik grefti uygulamasının başarılı sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Genel olarak partiküllü otojen kemik greftleri damarlanmayı arttırmakta ve böylece osteogenezis artmaktadır (Axhausen, 1956; Rivault ve ark., 1971)

Yapılan çalışmaların pek çoğunda, otojen kemik greftlerinin ağız içinde alındığı bölgeden bağımsız olarak konvansiyonel tedavi tekniklerine göre daha başarılı sonuçlar verdiği öne sürülmüştür. Ağız içi kaynaklı otojen kemik greftleri ile kemik içi defektlerde ağız içi kaynaklı kansellöz kemik ve iliği ile tedavi edilen 166 kemik defektinde ortalama 3.44 mm ve % 50 kemik dolumu sağlandığı bildirilmiştir (Hiatt ve Schallhorn, 1973). Araştırmacılar kemik dolum derecesinin kemik içi defektinin morfolojisine bağlı olduğunu gözlemlemişlerdir. Ellegaard ve Løe (1971), de çalışmalarında üç duvarlı kemikiçi defektlerin daha iyi sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Benzer şekilde kemik karışımı tipi greft kullanımı ile açık flep cerrahisine göre anlamlı derecede daha fazla kemik dolumu (sırasıyla 2.98/0.66, yaklaşık %75 defekt dolumu) elde edildiği bildirilmiştir.

Saplı otojen kemik grefti (bone swagging)'nin kemikiçi defektlerde kullanımı ile ilgili çok az çalışma mevcuttur. Zubery ve ark. (1993), başarılı bir "bone swagging" operasyonunun iyileşmesi sonucu histolojik olarak elde edilen klinik ataşmanın epitel ve bağ dokusundan oluştuğunu fakat her ne kadar radyografik olarak kemik oluşumu

gözlense de, sementogenezis ve yeni ataşman aparatının gözlenmediğini bildirmişlerdir. Alkan ve Keskiner (2006), klinik olarak başarılı bir bone swagging operasyonu sonrasında radyografik olarak kemik dolumu yanında 7 mm'lik ataşman kazancı elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Ağız dışı kaynaklı kemik greftleri daha çok oral-maksillofasial defektlerin tedavisi ve ileri derecede rezorbe olmuş maksilla ve mandibulada uygulanacak implant tedavisi öncesinde kullanılmaktadır. Sıklıkla tercih edilen ağız dışı kemik kaynakları iliak kret, tibia ve kranyumdur. Daha az sıklıkla olmak üzere, kaburgalar ve fibula da hekimler tarafından tercih edilebilmektedir (Misch ve ark., 1999).

İliak kansellöz kemik ve kemik iliğinden elde edilen otojen kemik kullanılarak yapılan çalışmalar sonucu yeni kemik oluşumu, histolojik olarak krestal kemik apozisyonu ve periodontal ligament oluşumu gözlenmiştir. Ayrıca iliak otogreftin krestal, fasial ve furkasyon defektlerinin dolumunda ağız içi kansellöz kemiğe göre daha iyi sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Hiatt ve Schallhorn, 1971). Ayrıca, tek duvarlı kemik içi defektlerde iliak kemik iliği kullanımının ağız içi kansellöz kemik greftine göre daha fazla kemik dolumu sağladığını bildirmiştir. Fakat iliak kansellöz kemik ve ilik kullanımı sonrası kök rezorpsiyonu ve ankiloz oluştuğuna dair kanıtlar da öne sürülmüştür. (Shallhorn ve Hiatt, 1972; Dragoo ve Sullivan, 1973).

Otojen kemik grefti uygulamalarında bazı dezavantajlar ve zorluklar da bulunmaktadır. Greft içinde kemik oluşturabilme potansiyeline sahip hücreler bulunduğundan, ağız içi kaynaklı otojen kemik greftlerinin kullanımı periodontistler tarafından sıklıkla tercih edilse de kemik alınabilecek bölgelerin sınırlı olması, ek bir cerrahi işleme gereksinim duyulması ve greft alınırken potansiyel implant sahalarının ortadan kaldırılması ihtimali otojen kemik kullanımının dezavantajlarını oluşturmaktadır (Froum ve ark., 1998).

Otojen kemik greftinin kullanımına karar verirken donör bölge, grefti elde etme tekniği ve elde edilen grefti uygulama tekniği değerlendirilmelidir. Örneğin ağız dışı donör bölgeler daha fazla miktarda greft elde etmeye olanak sağlarken hastaya ikinci bir cerrahi iyileşme bölgesi oluşturulması ve bu bölgeden kaynaklanan rahatsızlıklar meydana gelmektedir.

Sonuç olarak ağız dışı ve ağız içi otojen kemik grefti ve DFDB allogrefti kullanımı ile kemikiçi defektlerin tedavi sonuçlarında rejenerasyonun oluştuğuna dair

klirik ve histolojik kanıtlar oluşmuştur. Ayrıca uzun dđnem takiplerde rejenerasyon sonucu elde edilen kazancın kalıcı olduğu gđzlenmiřtir. Sentetik greft materyallerinin kullanımı sondalama derinliği ve klinik ataşman kazancında dđzelmelerle sonuşlanmış olsa da, yeni ataşman aparatı oluşturduğuna veya başlattığına dair bir kanıt henüz elde edilememiştir.

2.3. Trombositten Zengin Plazma (TZP)

Trombositler yuvarlak ya da oval, 2-4 μ çapında küçük disklerdir. Kemik iliğinde megakaryositlerden oluşurlar. Megakaryositler kemik iliğinde hematopoitik serinin oldukça byk hreleridirler ve kemik iliğinde ya da kana geçtikten bir süre sonra özellikle pulmoner kapillerden geçmeye çalışırken parçalanarak trombositleri oluştururlar. Trombositlerin kandaki normal konsantrasyonu milimetrekpte 150.000-350.000'dir.

Nkleusları olmamasına ve oğalamamasına rağmen trombositler hücrenin pek çok fonksiyonel karakteristiklerini taşırlar. Sitoplazmalarında çeşitli aktif faktörler vardır. Bunlar;

1- Trombositlerin kasılmasını sağlayan ve kas hücrelerindeki benzeyen aktin ve miyozin molekülleri ile diğer bir kontraktil protein olan trombostenin

2- Çeşitli enzimleri sentezleyen ve çok miktarda kalsiyum iyonlarını depolatan endoplazmik retikulum ve golgi apereyinin kalıntıları

3- Mitokondri, ATP ve ADP oluşturabilen enzim sistemleri

4- Lokal hormonlar olan birçok damarsal ve lokal doku reaksiyonlarını sağlayan prostoglandinleri sentezleyen enzim sistemleri

5- Daha sonra kan pıhtılaşması ile ilişkili olarak önemli bir protein olan fibrin stabilize edici faktör

6- Damar endotel hücrelerinin, damar düz kas hücrelerinin ve fibroblastların çoğalma ve büyümelerini ve böylece hasarlı damar duvarlarının tamiri için gerekli hücrenel büyümeyi sağlayan büyüme faktörleridir.

Trombositlerin hücre membranı da önemlidir. Yüzeylerini kaplayan glikoprotein örtüsü trombositlerin normal endotele yapışmasını önlerken, damar çeperlerinin hasarlanan alanlarına özellikle zedelenen endotel hücrelerine ve damar çeperinde daha

derinlerde açığa çıkan kollajene yapışmalarını sağlar. Aynı zamanda membranda çok miktarda fosfolipitler bulunur. Bunlar kan pıhtılaşma sürecini birçok noktada aktive edici rol oynar.

Trombositler çok aktif bir yapıdadır. Yarı ömrü dolaşımında 8-10 gündür. Bu süre sonunda yaşam süreçleri sona erer ve dolaşımdan başlıca doku makrofajları tarafından uzaklaştırılırlar.

Damar yırtıklarının tamiri trombositlerin önemli bazı fonksiyonlarına bağlıdır. Trombositler hasara uğrayan damar yüzeyine, örneğin damar yüzeyindeki kollajen liflere ve hatta hasarlı endotel hücrelerine dokundukları zaman karakteristiklerini açık bir şekilde değiştirirler. Şişmeye başlarlar, düzensiz bir şekil alarak yüzeylerinden sayısız psödopotlar uzatırlar. Kontraktil proteinleri güçlü bir şekilde kasılarak çok sayıda aktif faktör içeren granüllerin serbestleşmesini sağlarlar, yapışkan hale gelirler ve dokulardaki kollajene ve von Willebrand faktörü denen bir proteine tutunurlar. Çok miktarda ADP salgılanır, enzimleri tromboksan A₂'yi oluştururlar. ADP ve tromboksan daha sonra çevredeki trombositlere etki ile onları da aktive ederler. Bu yeni aktive edilmiş trombositler de yapışkanlıkları sayesinde başlangıçta aktive edilmiş trombositlere yapışırlar. Böylece damarın yırtılan herhangi bir noktasında, hasara uğrayan damar duvarı ya da damar dışı dokular gittikçe artan sayıda trombositin aktive olması ve bu aktive edilen trombositlerin de yeni trombositleri aktive etmesiyle gelişen bir kısır döngüyü başlatarak trombosit tıkaçının oluşumunu sağlarlar. Başlangıçta zayıf olan bu tıkaç, damar yırtığı küçükse kan kaybını önlemede yeterlidir. Pıhtılaşma sürecinin sonraki aşamalarında fibrin iplikleri oluşarak trombositlere bağlanır ve böylece sıkı ve dayanıklı bir tıkaç oluşur.

Trombositlerin α granüllerinde yüksek oranda PDGF - AA, PDGF - BB, PDGF - AB, TGF - β 1, TGF - β 2, IGF-I, VEGF ve EGF içermesi ve bu büyüme faktörlerini yara iyileşmesinin başında ortama salması, iyileşmenin ilerleyen safhalarında makrofajların aktivasyonu ile kemotaksisini arttırması ve yara iyileşmesinde en önemli kriter olarak düşünülen pıhtının stabilizasyonunu sağlaması, TZP'nin yara iyileşmesindeki önemini göstermektedir (Marx, 1998; 2004; Lynch, 1999).

2.3.1. Büyüme Faktörleri

Büyüme faktörleri (polipeptid büyüme faktörleri) hücrelerin proliferasyonu, kemotaksisi, farklılaşması ve matriks sentezi gibi doku tamirindeki anahtar hücresel olayları, spesifik hücre reseptörlerine bağlanarak düzenleyen biyolojik bir medyatör sınıfıdır (Position Paper, 1996). Periodontal dokuların tamiri sırasında sementogenezis, osteogenezis ve periodontal ligament fibrillerinin oluşması hedeflenmektedir. Diş gelişimi ve doku tamirini başlatan ve düzenleyen büyüme faktörleri hakkındaki bilgilerimizin artması sonucu periodonsiyumun rejenerasyonu amacı ile kullanıldıkları araştırmaların sayısı da artmıştır.(Cochran ve Wozney, 1999; Giannobile, 1996; Grzesik ve Narayanan, 2002; King ve Cochran, 2002)

Periodontal rejenerasyonun oluşması için başta periodontal ligament ile beraber sement ve alveoler kemiğin de oluşması gerekir. Bu sebeple periodontal ligament fibroblastlarının çoğalmasını, migrasyonunu ve kollajen biyosentezini arttıracak ajanlar periodontal ligamentin gelişimini de sağlayabilir düşüncesi ile büyüme faktörleri üzerinde pek çok çalışma yapılmış ve yapılmaktadır (Caton ve ark., 1987). Büyüme faktörlerinin periodonsiyumdaki yapısal hücrelerde çoğalmayı, migrasyonu ve farklılaşmayı düzenlemekte önemli görevlere sahip olduğu düşünülmektedir (Gao ve ark., 1998; Helder ve ark., 1998; Ivanovski ve ark., 2001; Plemons ve ark., 1996; Shroff ve ark., 1996).

Sementin oluşum aşamasında büyüme faktörlerine ait moleküllerin üretilip, periodontal rejenerasyon veya tamir gerektiği durumda kullanılmak üzere olgun sement matriksinde depolandığı bildirilmiştir (Somerman ve ark., 1987). İn vivo pek çok hayvan çalışmasında lokal olarak bölgeye verilen büyüme faktörlerinin histolojik olarak sement rejenerasyonuna neden olduğu gözlenmiştir (Wikesjö ve Selvig, 1999). Bu konuda yapılan pek çok araştırmaya ve bazı büyüme faktörlerinin sementte tespit edilmesine rağmen yine de sementogenezisin moleküler mekanizması tam olarak açıklanamamıştır (Miki ve ark., 1987; MacNeil ve Somerman, 1993).

Büyüme faktörleri hücre tarafından salgılandıktan sonra otokrin yoldan etki edip yine kendi büyümesini ve fonksiyonunu değiştirebilir veya parakrin yoldan etki edip bir hücrede salgılandıktan sonra başka bir hücrede etki gösterebilirler. Büyüme faktörlerinin çoğu ekstrasellüler matrikste depolanır. Matriks yıkılmasında ortama

salınan bu mediatörler doku remodelasyonu ve rejenerasyon sırasında farklı etkilere sahip karmaşık bir sinyal ağının bir parçası olarak görev yaparlar (Schliephake, 2002). Farklılaşma faktörleri ise tıpkı büyüme faktörleri gibi işlev görüp, bir hücrenin fenotipik karakterini kontrol eden öncü hücrelerin olgunlaşmış hücrelere dönüşmesini sağlayan proteinlerdir. Mezenşimal hücreler gibi öncül hücreler, osteoblast gibi tam olgunlaşmış fonksiyonel hücrelere değişirler (McCauley ve Somerman, 1998).

Yara iyileşmesine katılan büyüme faktörleri, hangi kaynaklardan salgılandıkları, etkilediği hücreler ve potansiyel etkileri Tablo 1.1’de görülmektedir.

Literatür incelendiğinde, PDGF (Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü), TGF- β (Transforme Edici Büyüme Faktörü) ve IGF (İnsulin Benzeri Büyüme Faktörü)’ün periodontal rejenerasyonu indüklemek amacıyla sıklıkla kullanıldığı görülmektedir (Lynch ve ark., 1991a;1991b; Rutherford ve ark., 1992).

2.3.1.1. Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF)

PDGF 30 kD ağırlığında, yüksek derecede bazik özellikli, dimerik bir glikoproteindir. PDGF; trombositlerin α granüllerinde yoğun şekilde bulunduğu için yara iyileşmesi sırasında ilk olarak ortaya çıkan polipeptid hormondur (Lynch ve ark., 1999). Genellikle eşit büyüklükte ve moleküler ağırlıkta bulunan iki heterodimer zincirin disülfit bağı ile birleşmesi sonucu oluşur. Bu zincirler A ve B olarak adlandırılmaktadır. A ve B zincirlerinin oluşturduğu kombinasyonlara göre PDGF-AA, PDGF-BB ve PDGF-AB formlarında bulunabilir. Bu hormon başta trombositler olmak üzere makrofajlar ve endotelial hücreler tarafından da salgılanmaktadır.

PDGF’in en önemli etkisi hücre çoğalmasını ve protein sentezini arttırmasıdır. Bu hormon hücreleri bölünmeye hazır hale getiren bir faktör olarak bilinir. Bu nedenden dolayı IGF-I gibi diğer büyüme faktörleri ile birlikte ortamda bulunursa, her iki büyüme faktörü sinerjistik bir etki ile hücre bölünmesini çok daha fazla arttırmaktadır (Giannobile ve ark., 1996). Bununla birlikte PDGF’in tek başına kullanıldığında bile osteoblastlar ve periodontal ligament hücreleri üzerindeki mitojenik etkisi yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir (Canalis ve ark., 1988; Centrella ve ark., 1991; Graves ve ark., 1989). PDGF’in aynı zamanda damarlanmayı ve makrofaj aktivasyonunu arttırdığı da bilinmektedir (Lynch ve ark., 1999).

Büyüme ve Farklılaşma Faktörü	Kaynak	Hedef Hücre	Etkisi
PDGF	trombosit, monosit, makrofaj, endothelial hücreler	fibroblast, düz kas hücreleri, glia hücreleri, makrofaj, nötrofil, osteoblast	fibroblast kemotaksisi, proliferasyonu, kollajen sentezi, makrofaj aktivasyonu
TGF- β	trombosit, t-lenfosit, makrofaj, monosit, nötrofil	fibroblast, kemik iliği hücreleri, endothelial hücreler, pre-osteoblastlar	osteoblast, fibroblast proliferasyonu, damarlanma, kollajen sentezi, kollajenaz kontrolü
IGF-I	trombosit, osteoblast, makrofaj, kondrosit	fibroblast, osteoblast, kondrosit	Osteoblast proliferasyonu, osteoblast sentezi, damarlanma
PDAF	trombosit, endothelial hücreler	endothelial hücreler	damarlanma, diğer büyüme faktörlerinin kontrolü
PDEGF	trombosit, makrofaj, monosit	fibroblast, endothelial hücreler, epitel hücreleri	proliferasyon, damarlanma, kollajenaz kontrolü
VEGF	makrofaj, keratinosit	endothelial hücreler	damarlanma
FGF	makrofaj, endothelial hücreler	fibroblast, keratinosit, endothelial hücreler	fibroblast proliferasyonu, kemotaksis, damarlanma

Tablo 1: Büyüme ve Farklılaşma Faktörlerinin kaynak ve fonksiyonları

PDGF ve IGF-1'in periodontal ligament hücrelerinin çoğalmasını ve kemotaksisini uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca bunların beraber kullanımı ile mitojenik aktivite daha da artmıştır. Mitojenik aktiviteye ek olarak PDGF periodontal ligament

hücrelerinde kollajen sentezini uyarmaktadır (Matsuda ve ark., 1992). Bunların ötesinde, PDGF insan dişeti fibroblastlarının çoğalmasında inhibitör görev alan lipopolisakkaritlerin etkilerini önleme özelliğine de sahiptir (Rutherford ve ark., 1992). Gr(-) bakterilerde bulunan lipopolisakkaritlerin dişeti fibroblastların çoğalmasını ve oluşumunu engellediği bilinmekte ve periodontal tedaviyi takiben oluşan yara iyileşmesini olumsuz yönde etkilediği düşünülmektedir (Bartold ve ark., 1992).

Köpek ve fare çalışmalarında PDGF ve IGF-1'in anlamlı derecede yeni kemik ve sement oluşumuna neden olduğu gözlenmiştir. Sadece IGF-1 ile yapılan tedavi sonuçları kontrol grubuna göre farksız bulunmasına karşın sadece PDGF kullanımı ile ataşmanın rejenerasyonunda anlamlı derecede artış gözlenmiştir (Lynch ve ark., 1991a; Rutherford ve ark., 1992). PDGF ve YDR beraber kullanıldığında tek başına kullanımına göre daha iyi sonuçlar vermektedir (Park ve ark., 1995).

Büyüme faktörleri sadece jel taşıyıcılarla değil kemik greftleriyle de defektlere uygulanmış, kollajen ve saflaştırılmış kemik matriksinde PDGF-BB'nin emilim ve salınım dinamikleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu çalışmadaki gözlemler saflaştırılmış kemik minerali, kollajen ve PDGF-BB içeren karışımın gelişmiş osteojenik özellikler içeren etkili bir kemik greft materyali olabileceğini göstermektedir (Stephan ve ark., 2000).

Wang ve ark.'nın (1994) köpeklerde yaptığı çalışmada kısa süreli PDGF uygulamasının, periodontal dokularda, fibroblastların proliferasyonunu stimüle edici etki gösterdiği gözlenirken, teflon membranla PDGF'nin beraber kullanılmasının sonuçlara ek bir fayda sağlamadığı belirtilmiştir.

2.3.1.2. Transforme Edici Büyüme Faktörü– β (TGF- β)

TGF- β ; birbirlerine disülfid bağlarla bağlanan iki zincirli, 25 kD moleküler kütleye sahip bir polipeptid hormondur (Schliephake, 2002). TGF- β 1, TGF- β 2 ve TGF- β 3 olmak üzere 3 farklı formda bulunurlar. TGF- β , fibroblast çoğalmasını uyaran plasenta kaynaklı bir madde olarak keşfedildikten sonra tüm vücutta yaygın olarak bulunduğu, hücre siklusu regülasyonu, embriyogenez ve organ gelişimi gibi pek çok biyolojik aktivitede görev aldığı fark edilip çeşitli araştırmalarda odak noktası olmuştur (Kanno ve ark., 2005; Pierce ve ark., 1992; Mohan ve Baylink, 1991). Üç farklı izoformundan TGF- β 1 ve β 2 trombositlerde bulunduğu ispatlanmış olan, bağ dokusu

iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda görev alan, TGF'ün en sık görülen alt gruplarıdır. Hücre büyümesi, extraselüler matriks üretimi, anjiogenezin uyarılması, yara iyileşmesi ve farklılaşması gibi çeşitli biyolojik olaylarda rol alırlar (Altmeyden ve ark., 2004; Ksander ve ark., 1990; O'Toole ve ark., 2001). Fibroblastları prokollajen üretimi için aktive ederek yarada kollajen depolanmasına neden olurlar (Ksander ve ark., 1990). TGF- β parakrin olarak etkilerini fibroblast, kemik iliği kök hücresi ve preosteoblast gibi hücreler üzerinde gösterebilirler ve bu hedef hücreler de yine TGF- β salgılayabilirler (Aukhil, 2000). Böylece TGF- β yalnızca yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu başlatmakla kalmaz, remodeling aşamaları ve kemik grefti olgunlaşmasında da etkili olur. (Lynch ve ark., 1999; Nall ve ark., 1996; Marx ve ark., 1998)

TGF- β 1 kemik ve trombositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Temel olarak hem parakrin hem de otokrin yolla hücreler üzerinde etkilidirler (Wirthlin, 1989). TGF- β ; hem kemik hücrelerinin proliferasyonunu, kemotaksisini hem de ECM sentezini artırır. Bu etki hem bu büyüme faktörünün ortamda bulunduğu konsantrasyona hem de osteoblastların farklılaşma zamanına göre değişiklik gösterebilmektedir. Bununla birlikte TGF- β 'nın osteoklast formasyonunu ve rezorpsiyon kapasitesini inhibe ettiği bilinmektedir (Cochran ve Wozney, 1999).

2.3.1.3. İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF)

İnsan proinsülinine benzerliği nedeniyle bu ismi alan IGF-I, fibroblast, kondrosit, keratinosit, osteoblast, mezangial eritroid progenitör hücreler gibi pek çok hücre tipinin çoğalmasını artırarak büyümeyi uyarır. Kemik matriksinde en fazla bulunan büyüme faktörüdür (Daughaday ve Rotwein, 1989; Mohan ve Baylink, 1991). IGF I ve IGF II olmak üzere iki formu vardır. IGF-I'in kemik oluşumuna etkisi IGF-II'den fazladır. Bu nedenle çalışmalar genellikle IGF-I üzerinde yoğunlaşmıştır (MCCarthy ve Centrella, 1989) . IGF I tek zincirli bir polipeptit hormondur. Bu büyüme faktörü osteoblastların hem büyümesini hem de pre-osteoblastların osteoblastlara farklılaşmasını sağlar. IGF'nin aynı zamanda osteoblastlardan tip-1 kollajen salgılamasını arttırdığı bilinmektedir (Canalis ve ark., 1993). IGF başta osteoblastlar ve trombositler olmak üzere makrofaj ve monositlerden de salgılanabilmektedir.

Diğer büyüme faktörleri sadece lokal ya da bölgesel düzeyde etki gösterirken IGF'ler birçok hücre ve dokuda hem metabolik aktiviteyi hem de büyümeyi destekleyen etkilere sahiptir (Schliephake, 2002).

2.3.1.4. Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü (PDEGF)

Cohen tarafından 1962'de keşfedilmiştir ve tanımlanan ilk büyüme faktörüdür. Keratinositlerin ve dermal fibroblastların proliferasyonunu stimüle ederek, epidermal rejenerasyonu ve yara iyileşmesini hızlandırır. Bunun yanı sıra diğer büyüme faktörlerinin üretimini ve etkilerini artırır (Sanchez ve ark., 2003). Epidermal büyüme faktörü, yara iyileşmesinin erken safhalarında fibronektin gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyarır (Machens ve ark. 2003). Kollajen üretimini arttırmadan fibroblastların çoğalmasını sağladığı düşünülmüştür. Bununla birlikte Brown ve ark. (1988), sıçanlarda insizyon bölgelerine biyosentetik EGF uygulamalarının ardından yaptıkları elektron mikroskopik incelemede artmış kollajen oluşumu göstermişler.

2.3.1.5. Trombosit Kaynaklı Angiogenesis Faktörü (PDAF)

Deneysel olarak PDAF'nin damarlanmayı artırıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Sanchez ve ark., 2003, Wang ve ark., 2004). Vasküler endotel hücreleri direkt veya indirekt yoldan etkilerler. Damarlanmanın olmadığı dokularda yeni kan damarlarının gelişmesini sağlarlar. Bazı sitokinlerin ve büyüme faktörlerinin düzenlenmesi PDAF tarafından yapılır. Bunlar, IGF-I, TGF α ve β , PDGF, temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF), PDEGF ve interlökin 1 β (IL-1 β) dir. Bu faktör hipoksi durumunda oldukça hızlı bir şekilde bölgede yerini alır (Sanchez ve ark., 2003).

2.3.1.6. Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF)

Fibroblast büyüme faktörleri mitojenik polipeptid ailesidirler. İçlerinde en çok incelenmiş olan altgrup bFGF; fibroblastlar, endotel hücreleri, osteoblastlar, kondrositler ve keratinositler üzerinde mitozu artırıcı etki gösterir, anjiogenez ve endotel hücre göçünde rol oynar, TGF- β 'nın dağılımını artırıcı etki yapar. (Klagsbrun ve D'amore, 1991 O'Toole ve ark., 2001). VEGF ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiogenez etkisini gösterir. Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olur. Anjiogenezin başlaması için gerekli

olan fibroblastlardan kollajenaz üretimi ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar (Currie ve ark., 2001; Ribatti ve ark., 2002). Granülasyon dokusu oluşumunu başlatmaya da yardımcı olur (Grotendorst ve ark., 1985). Rashid ve ark. (1999), bu faktörü kullanarak sıçan dorsal fleplerinde anjiogenezisi arttırdığını saptamışlardır. Fleplerin altına Khouri ve ark. (1991) bFGF'yi, Frank ve ark. (1996) ise rekombinant bFGF'yi uyguladıklarında damarlanmanın arttığını rapor etmişlerdir.

2.3.1.7. Vasküler Endotelial Büyüme Faktörü (VEGF)

VEGF'ün, tümör hücrelerinden salgılanan, damar geçirgenliğini artırarak asit oluşumuna katkıda bulunan bir madde olduğu düşünülmüş ve bu nedenle 1983'te "vascular permeability factor" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar doğrultusunda VEGF olarak ismi değiştirilmiş, en kuvvetli fizyolojik ve patolojik anjiogenez uyarıcısı olduğu tespit edilmiştir (Carmeliet, 2000; Currie ve ark., 2001; Klagsbrun ve D'amore, 1991). Beş adet izoformu bulunan VEGF kendi salınımından sonra diğer proteoglikan-bağlı salınımı olan büyüme faktörlerinin (bFGF) de salınımını uyarır ve bFGF ile sinerjistik anjiogenik etkisi gösterilmiştir (Distler ve ark., 2002). Anjiogenezin ilk basamaklarında vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli olan kollajenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra yine anjiogenez için gerekli olan α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak iyileşen dokuda anjiogenez başlatır. Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast, inflamatuvar ve endotelial hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği artırır (Becker ve ark., 2005; Colville-Nash ve Willoughby, 1997; Distler ve ark., 2002).

2.3.1.8. Büyüme Faktörleri Arasındaki İlişkiler

Kemik metabolizmasında pek çok büyüme faktörü arasındaki karmaşık ilişkiler bazı sebeplerden dolayı önemlidir;

- 1- Pek çok büyüme faktörü (ör. IGF-I, TGF- β , bFGF ve PDGF) kemikte yüksek konsantrasyonlarda bulunur (Hauschka ve ark., 1986).
- 2- Kemik hücreleri pek çok farklı büyüme faktörünü ortama salar (Zhang ve ark., 1991; Canalis ve ark., 1988; Robey ve ark., 1987).

3- Kemiğin tamiri esnasında büyüme faktörlerine ait genler ve gen ürünleri ekspresye edilir (Andrew ve ark., 1995; Bolander ve ark., 1992).

Sonuç olarak, kemiğin tamirinde ve olgunlaşmasında pek çok büyüme faktörü ve bunların birbirleri ile ilişkileri rol oynar. Örneğin IGF-I, PDGF ile beraber tek başlarına yapabildiklerinden daha fazla osteogenezise neden olurlar. Rutherford ve ark. (1992), maymunlarda oluşturdukları periodontitisi tedavi etmek için PDGF-BB ve PDGF-AA'yı IGF ile kombine olarak kullanmışlar ve büyüme faktörü kullanılan gruplarda elde edilen rejenerasyonun sadece flap yapılan gruplara göre anlamlı derecede fazla olduğunu göstermişlerdir.

Yapılan bir başka hayvan çalışmasında, Lynch ve arkadaşları (1991a) 13 adet beagle köpeğinde kronik olarak oluşturdukları defektlerde periodontal dokulara kısa dönem rekombinant PDGF-IGF kombinasyonu uygulamış ve sonuçta uygulamadan 4 hafta sonra kemik metabolizmasında ve periodontal rejenerasyonda artış gözlemişlerdir. Lynch ve ark.'nın (1991b) aynı yıl yaptıkları bir başka çalışmada ise, beagle köpeklerinde, özel olarak imal edilip üzerine boşluklar oluşturulmuş titanyum implant etrafına uygulanan PDGF-IGF kombinasyonunun erken dönemdeki iyileşmeyi stimüle ettiği ve klinik olarak bu kombinasyonu kullanmanın hızlanmış ve artmış osseointegrasyona yol açacağı belirtilmiştir.

Hayvanlar üzerinde yapılan bu çalışmalardan elde edilen olumlu sonuçlar büyüme faktör kombinasyonlarının insanlarda kullanımını gündeme getirmiştir. Howell ve ark.'nın 1997 yılında yaptıkları çalışma büyüme faktörü kombinasyonunun insanlarda kullanıldığı ilk çalışmadır. Bu çalışmanın amacı, insanlarda periodontal flep cerrahisi sırasında kemik defektlerine jel taşıyıcıda rekombinant olarak üretilmiş PDGF-BB ve IGF-I kombinasyonunun tek doz uygulanmasının güvenilirliğini belirlemektir. Çalışmanın ikinci amacı ise periodontal doku rejenerasyonu sağlanmasında büyüme faktörlerine karşı olan biyolojik cevabın değerlendirilmesidir. Çalışma, karşılaştırılabilir interproksimal açısız ve/veya sınıf II furka defekti olan 38 hasta üzerinde yapılmıştır. Çalışmanın sonuçları rekombinant faktörlerin insanlarda güvenle kullanılabileceğini, yüksek dozda (150 µg/ml) tek sefer uygulamanın etkili olduğunu göstermiştir. Kontrol grubunda %18.5 kemik defekt dolumu gözlenirken büyüme faktörü uygulanan grupta %43.2 oranında kemik dolumu meydana gelmiştir. Araştırmacılar aradaki farkın

istatistiksel olarak anlamlı olduğunu belirtmişlerdir. Pfeilcher ve arkadaşlarının (1990) yaptıkları bir başka in vitro çalışmada; IGF-I, TGF ve PDGF kombine olarak veya tek başlarına kültüre edilmiş osteoblastlara uygulanmış ve bu üç büyüme faktörünün kombine veya ikişer ikişer uygulanmasının tek başına uygulanmasına göre daha fazla kemik oluşumuna neden olduğu gösterilmiştir.

Piche ve arkadaşlarının (1989) yaptığı bir çalışmada ise en fazla osteoblast proliferasyonunun IGF-I, TGF- β , PDGF ve EGF kombinasyonu ile sağlanabileceği savunulmuştur.

Tüm bu büyüme faktörlerinin yarı ömürlerinin kısa olması, hedef hücrelerde yeterli konsantrasyonda bulunamamaları, çok pahalı olmaları ve etkin olmaları için kullanım sıklıklarının fazla olması gereksinimi bu büyüme ve farklılaşma faktörlerinin lokal ve kombine kullanımlarını oldukça zorlaştırmaktadır (Lynch ve ark. 1999). Bunun yanısıra, bu büyüme ve farklılaşma faktörlerinin önemli bir kısmını içeren ve hastanın kendi kanından elde edilebilen trombositten zengin plazmanın (TZP)'nin direkt olarak veya başka bir materyalle karıştırılarak kemik rejenerasyonunda kullanılması son dönemlerde birçok araştırmacı tarafından incelenmektedir. Bu yöntem hem daha kolay ve ucuz, hem de daha etkili gibi görünmektedir.

TZP, donörden alınan venöz kanın santrifüj işlemlerine tabi tutularak kan elemanlarından trombositlerin ayrıştırılmasıyla elde edilen bazı avantajları olan bir ajandır.

Bu avantajlar;

- 1- Alıcı ve verici alanda operasyon sırasında ve sonrasında kanamanın azalması
- 2- Yumuşak doku iyileşmesinin hızlandırılmasına yardımcı olması
- 3- Adeziv (Yapıştırıcı) etkisi sayesinde alıcı sahadaki greft materyalinin stabilitesini arttırması
- 4- Büyüme faktörleri sayesinde iyileşmekte olan dokuların vaskülarizasyonunun hızlandırılması
- 5- Kemik greftleri ile kombine kullanılarak rejenerasyonun arttırılması
- 6- Toksik olmaması
- 7- Orijinal donörden alındığında otojen materyal olduğu için immün reaksiyona sebep olmaması

8- Operasyon sırasında veya öncesinde kısa sürede hazırlanması (Operasyon sırasında zaman kaybına neden olmaz.)

9- Doku uyumlu olması

10- Enfeksiyöz hastalıkların geçiş riskinin bulunmaması (Ferreira ve ark., 2005; Tözüm ve Demiralp, 2003)

TZP'den salınan büyüme faktörleri hücre çekirdeğine etki etmeyip hücre membran reseptörleri ile etkileşime girerek hücre içi sinyal yolunu başlatıp hücrelerin çoğalmasını arttırmaktadır. Bu nedenle herhangi bir kanserojenik madde gibi tanımlanmamıştır (Marx, 2004).

TZP yaklaşık on senedir kullanılmasına rağmen fikir öncülüğü yapan oluşum fibrin yapıştırıcı uygulamasıdır ilk kullanılışı Bergel ile birlikte 1909 yılına kadar uzanmaktadır (Matras, 1985). Fibrinin kan pıhtılaşması ve yara iyileşmesindeki rolünün anlaşılması, bu proteinin öncülü olan fibrinojenin dokuları birleştirmek amacıyla kullanımını gündeme getirmiştir. Grey ve Harvey yine 1900'lü yılların başında fibrin tamponları kanamaları durdurmakta kullanmışlardır (Matras, 1985). Cronkite ve Tedrick 1944 yılında fibrinojen ve trombinin ilk olarak kombine etmiş ve deri greftlerinin yapıştırılmasında kullanmışlardır (Matras, 1985). Bu teknik aynı zamanda oral ve maksillofasial cerrahi uygulamalarında kullanım alanı bulmuş, kemik partiküllerinin otojen fibrin yapıştırıcı ile karıştırılarak kolay bir şekilde taşınabileceği ve yara iyileşmesine olumlu etkileri olabileceği bildirilmiştir (Tayapongsak ve ark., 1994). Whitman ve ark.'nın 1997 yılında yayınladıkları çalışma ile trombosit jeli tanımlanmış ve kullanılmaya başlanmıştır.

TZP'nin popüler olmasını sağlayan bu konuda daha sonra pek çok çalışma yayınlamış kişi Robert E. Marx'dır. Marx ve arkadaşlarının, benign ve/veya malign lezyon eksizyonu yapılmış fakat radyoterapi uygulanmamış 5 cm. ve daha büyük mandibula defektine sahip 88 hasta üzerinde yaptıkları araştırmada, 44 defektin tedavisinde posterior iliak bölgeden alınan otojen kemik grefti TZP ile beraber kullanılırken, diğer 44 hasta sadece otojen kemik grefti kullanılarak kontrol grubu olarak belirlenmiştir. Radyografik sonuçlar incelendiğinde TZP kullanılan bölgelerde kemik maturasyonunun TZP kullanılmayan bölgelere oranla 1.62 den 2.16'ya kadar değişen oranlarda daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Bu hastalarda yapılan histomorfometrik ölçümlerde, TZP eklenen bölgelerde kemik yoğunluğu ortalama %74

iken, TZP eklenmeyen bölgelerde bu oran %55.1 olarak bildirilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre TZP eklenmesi kemik oluşum oranını ve kemik grefti içinde kemik oluşumunun derecesini en azından ilk 6 ay boyunca hızlandırmaktadır (Marx ve ark., 1998). Bu çalışma sonrasında TZP'nin oral cerrahilerde kullanımı ile ilgili birçok çalışma yapılmış ve yayınlanmıştır.

Literatürde birbirinden farklı tekniklerden bahsedilmesine rağmen TZP elde etmek için izlenmesi gereken yol aynıdır. Bunun için öncelikle venöz kan elde edilir. Damar dışına çıkan kanın pıhtılaşmasını engellemek için antikoagülan bir madde ile karıştırılmalıdır. Bu karışım uygulanan tekniğin gerektirdiği sürede kanın pıhtılaşmasını engeller. Elde edilen karışım belli bir merkezkaç kuvvetine maruz bırakılır. Buradaki amaç kanda bulunan şekilli elemanların ağırlıklarına göre çökmesini sağlayarak istenen kan fraksiyonunu (trombosit) belirli bir bölgede toplamaktır. Antikoagülan ile karıştırılmış ve tüpe yerleştirilmiş kan ilk santrifüj sonrasında iki kısma ayrılmış gibi görünmektedir. Ağırlıklarından dolayı eritrositler tüpün alt kısmında birikirken, üst kısımda sarı renkli plazma görülür. Plazma kısmının eritrositlere yakın olan alt bölümünde ise trombositler yoğunlaşır. Yapılan incelemelerde yeni sentezlenen trombositlerin, eritrositlerin oluşturduğu fraksiyonun üst kısmında yoğun olarak bulunduğu anlaşılmıştır. Bu nedenle tüm plazma içeriğinin yanı sıra eritrositlerin bulunduğu kısmın üzerinden bir miktar alınması da önerilmektedir. Sonuçta elde edilen ve plazma ile az miktarda eritrositten oluşan karışım bir kez daha santrifüj edilerek trombosit fraksiyonunun tüpün alt kısmında toplanması sağlanır. Bu aşamadan sonra trombosit sayısı artmış olan plazma elde edilmiş olur ve antikoagülan etkinin ortadan kalkması için CaCl_2 , trombositleri aktive edip granül içeriklerini boşaltmalarını sağlamak için ise trombin ya da hastanın kendi kanı ile karıştırılır. Sonuçta normal trombosit sayısından daha yoğun miktarda trombosit içeren ve bu trombositlerin aktive olması sonucu granüllerindeki büyüme faktörlerinin ortama salındığı bir jel elde edilmiş olur.

TZP tanımlandıktan sonra birçok çalışmada kullanılmış ve elde edilen olumlu sonuçlar rapor edilmiştir. Anitua (1999), 20 sağlıklı insanda çekim sonrası soketlere sadece PDGF ve otojen greft ile kombine uygulamışlar ve 5 tanesini de kontrol amaçlı boş bırakmışlardır. PDGF uygulanan grupta iyileşmenin çok daha iyi olduğu gözlenmiştir. 10.-16. haftada alınan biyopsilerde olgun kompakt kemik izlenmiştir.

PDGF uygulanan bölgelerde epitelizasyonun çok daha hızlı olduğu görülmüştür. İyi organize olmuş trabeküler yapı ve daha fazla kemik rejenerasyonu gözlenmiştir. TZP ve PDGF kullanımının ileri dönem implant uygulamaları için avantajlı olduğu bildirilmiştir (Anitua, 1999; Kim ve ark.,2002).

Kassolis ve ark. (2000), TZP ile dondurulmuş kurutulmuş kemik allogreftini alveol kreti ve sinüs yükseltilmesi ameliyatlarında kullanmış ve bu hastaların implant bölgelerinden biyopsiler alarak sonuçları değerlendirmişlerdir. 12 ay sonra alınan biyopsilerde yapılan histolojik incelemelerde dondurulmuş-kurutulmuş kemik greftinin etrafında çok sayıda yeni kemik oluşumu ve osteoid alanları izlemişlerdir. Böylece dondurulmuş-kurutulmuş kemik grefti ile TZP'nin implant ameliyatlarında kombine uygulanmasını önermişlerdir. Aynı zamanda TZP'nin, jel halinde bulunabilmesi, greftle birlikte uygulanabilmesi, pıhtı stabilizasyonu ve adeziv özelliğe sahip olmasından dolayı avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

TZP enfekte olmuş implant bölgelerinin tedavisi amacıyla da kullanılmıştır. Vaka raporu şeklindeki bu çalışmada az sayıda implant tedavi edilmiş olmasına rağmen, implant etrafında meydana gelen defektlerin tedavisinde greft ile TZP'nin kombine kullanılmasının greftin iyileşme ve olgunlaşma sürecini hızlandırdığı belirtilmiştir (Petrungaro, 2002).

Camargo ve ark.'nın (2002), periodontal cerrahide kemikiçi defektlerin tedavisi için 2 farklı rejeneratif tekniğin etkinliğinin klinik olarak karşılaştırılmasını amaçladıkları çalışmaya 18 kişi dahil edilmiştir. İnterproksimal kemik defektlerinde, absorbe olabilen polilaktik asit membran kullanarak sadece YDR veya TZP, pöröz sığır kemiği allogrefti (PSKA) ve YDR kombinasyonu uygulanmıştır. Her iki tedavi yönteminde de başlangıç değerleriyle karşılaştırıldığında önemli miktarda cep derinliğinde azalma ve klinik ataşman kazancı gözlenmiştir. Ancak iki grup arasındaki bütün değişkenler istatistiksel olarak anlamlı derecede TZP+PSKA+YDR grubunun lehine bulunmuştur. Aynı grubun bir başka çalışmasında, kemikiçi defekt tedavisinde TZP/greft/YDR kombinasyonu TZP/greft kombinasyonu ile kıyaslanmış ve her iki tedavinin de etkili olduğu, YDR'nin herhangi bir ek yarar sağlamadığı belirtilmiştir (Lekovic ve ark., 2002).

Lekovic ve ark.'nın (2003) sınıf II furka defektlerinde yaptığı bir başka çalışmada ise TZP/greft/YDR tedavisi sadece flep operasyonu ile karşılaştırılmış ve

sonuçta kombine tedavinin sadece flep operasyonuna göre çok daha başarılı olduğu belirtilmiştir.

Okuda ve ark. (2003) 20 sağlıklı bireyden elde ettikleri TZP'deki toplam trombosit sayısını, PDGF-AB ve TGF- β 1 miktarlarını incelemişlerdir. Sonuçta elde edilen TZP içerisindeki trombosit sayısının normal kandan %283 oranında daha fazla bulunduğunu; bununla paralel olarak TZP içerisinde bulunan TGF- β 1 miktarının % 346, PDGF-AB miktarının % 440 oranında daha fazla olduğunu göstermişlerdir.

TZP'nin bu yedi adet büyüme faktörü dışında fibrin, fibronektin ve vitronektin gibi içerdiği 3 adet hücre adezyon molekülü yara iyileşmesi sırasında hayati önem taşıyan hücrelerin migrasyonuna, kemik ve bağ dokusu adezyonuna neden olmaktadır (Marx, 2004).

TZP'nin periodonsiyumda bulunan hücreler üzerindeki etkisini gösteren ve bu etkiyi hangi mekanizma ile yaptığını açıklamaya çalışan birçok araştırma yapılmıştır. Okuda ve arkadaşları (2003) *in vitro* çalışmalarında; TZP'nin osteoblastik, epitel, fibroblastik ve periodontal ligament hücreleri üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Sonuçta; TZP'nin epitel hücrelerinin çoğalmasını %80 oranında azalttığı, diğer hücrelerin çoğalmasını arttırdığı gözlemlenmiştir. Bu etki osteoblast hücrelerinde %138 oranına kadar çıkmıştır. TZP'nin bu özelliği ile periodontal dokuların rejenerasyonunda başarı ile kullanılabileceği ileri sürülmüştür.

Kawase ve ark. (2003) *in vitro* çalışmalarında, TZP'nin osteoblastlardan ve periodontal ligament hücrelerinden tip-1 kollajen sentezini arttırdığını göstermiş ve TZP'nin bu etkiyi göstermesi için jel formunun elde edilmesinin şart olduğunu savunmuşlardır.

TZP; birçok greft materyali ile birlikte kemik rejenerasyonunda kullanılmıştır. Kim ve arkadaşları; köpeklerin iliak kretlerinde daha önceden yerleştirilen dental implantlar çevresinde oluşturdukları defektlere Paris alçısını TZP ile birlikte veya tek başına uygulamışlar ve yaptıkları histomorfometrik incelemelerde TZP ile kombine uygulanan Paris alçısının daha fazla kemik dolumuna neden olduğunu göstermişlerdir. Sonuç olarak TZP'nin kullanılan greft materyalinin etkinliğini arttırdığını savunmuşlardır (Kim ve ark., 2002).

TZP ile ilgili pek çok çalışma yapılmıştır fakat bunlar incelendiğinde olumlu sonuçlar verenlerin yanında etkisinin bulunmadığını hatta olumsuz etki yarattığını

bildiren çalışmaların da sayısı az değildir. Wiltfang ve ark., 2004 yılında domuzların alın bölgelerine 10 mm çapında defektler açmış ve TZP'yi bu defektlere; otojen kemik, trikalsiyum-fosfat granülleri, sığır kaynaklı spongiyoz kemik ve sığır kaynaklı kollajen ile beraber uygulamışlardır. İki, 4 ve 8 hafta sonunda alınan biyopsi örnekleri histomorfometrik olarak değerlendirilmiş ve yalnızca otojen kemik ile beraber uygulanan TZP'nin materyale ek avantajlar getirdiği ve bu etkinin 2. haftadan sonra kesildiği gösterilmiştir. Bu durum TZP'nin yara iyileşmesinin erken safhalarında etki etmesi ile açıklanmaktadır. TZP'nin diğer kemik greftleri ile kombine kullanımı hiçbir dönemde fazladan bir kemik dolumuna neden olmamıştır. Sonuçta araştırmacı TZP'nin otojen olmayan kemik greftleri ile birlikte kullanılmaması gerektiğini savunmuştur.

Grageda ve ark. (2005), koyun maksiller sinüslerinde allojen greftleri tek başına ve TZP ile kombine olarak kullanmışlardır. TZP ilavesinin olumlu etkilerini saptamamışlardır.

Tavşan modelinde kranial kemikte trefan frez ile 4 defekt hazırlanmış; defektlerden biri kontrol olarak bırakılırken diğerlerine; otojen kemik, otojen kemik+TZP ve sadece TZP uygulanmıştır. Daha sonra 1, 2. ve 4. aylarda histolojik ve histomorfometrik olarak defekt bölgeleri değerlendirilmiş ve sadece otojen kemik ve otojen kemik+TZP grubunun diğerlerine göre kemik densitesinin fazla olduğu gösterilmiştir. Sadece TZP uygulamasının kontrol bölgesine göre anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı gözlemlenmiştir (Aghaloo ve ark. 2002).

2.4. Stereolojik Histolojik İnceleme Yöntemi

Morfometrik çalışmalarda, bir organın veya organ bileşeninin hacmi, bir yapıdaki değişik bileşenlerin hacimleri ve bu bileşenlerin birbirlerine veya yapının tamamına göre hacim oranları sıklıkla kullanılan önemli parametrelerdir. Belli bir bileşenin birim hacimdeki sayısından (sayısal yoğunluk; N_v) o bileşenin toplam sayısına ulaşmak istenen çalışmalarda da toplam hacim bilinmek durumundadır. Organ veya yapıların toplam hacimlerini veya bileşenlerinin hacimlerini hesaplamak için bir dizi değişik yöntem kullanılmaktadır (Cruz-Orive ve Weibel, 1990; Gundersen, 1986; Gundersen, 1988a; 1988b; Mayhew ve Gundersen, 1996; Weibel, 1969).

İlgilenilen ve hacmi hesaplanmak istenen yapı, sözgelimi karaciğer, akciğer veya dalak gibi çevresindeki diğer organ veya yapılardan izole edilebilecek makroskobik bir yapılanmaya sahipse, hacim hesaplaması yerine doğrudan ölçüm yapılabilir. Bu gibi durumlarda sık kullanılan bir yöntem, yapıyı içi su ile doldurulmuş dereceli bir silindir içine atarak, artan su miktarını ölçmektir. İlgilenilen organ akciğer gibi doğal iç boşluklar (kaviteler) içeriyorsa, böyle yapılarda sıvı yer değiştirme yöntemini uygulamak için organ boşluklarının girişleri (örneğin akciğerlerde primer bronşlar) su geçirmeyecek bir biçimde tıklandıktan sonra hacim ölçümü yapılmalıdır. Aksi takdirde, organın boşluklarına su dolması sonucu hacim gerçek hacimden daha küçük olarak ölçülebilir (Cruz-Orive ve Weibel, 1990; Howard ve Reed, 1998). Fakat çoğu zaman ilgilendiğimiz yapılar çevrelerindeki bileşenlerden izole edilemezler, çevrelerindeki diğer yapılarla iç içe bir ilişki içerisindedirler ve bu yapıları izole ederek doğrudan bir hacim ölçümü yapılması, çoğu kez olanaksızdır. Bu durumda, Cavalieri prensibi olarak bilinen ve ilk kez İtalyan matematikçi Bonaventura Cavalieri tarafından XVII. yüzyılda ortaya konmuş olan prensip uygulanabilir.

Cavalieri prensibi, stereolojik yöntemlerde en sık kullanılan hacim hesaplama yoludur (Howard ve Reed, 1998; Gundersen ve Jensen, 1987). Cavalieri prensibini uygulamak için, hacmi hesaplanmak istenen yapı eşit aralıklı ve birbirine paralel kesilerle başından sonuna kadar dilimlere ayrılır. Daha sonra her bir dilimin aynı yöne bakan yüzeylerinin alanları uygun bir yöntemle hesaplanır. Tüm dilimlerden elde edilen toplam yüzey alanı değeri, dilimlerken kullandığımız ortalama dilim kalınlığı ile çarpılırsa, yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplaması elde edilir. Bunu matematiksel olarak şu şekilde formüleştirebiliriz (Gundersen ve ark., 1988a; Royet, 1992):

$$V_{\text{ref}} = \sum a_{i,t}$$

Burada V_{ref} ilgilendiğimiz yapının toplam veya diğer bir ifade ile referans hacmini; a_i , i numaralı kesitteki yapı izdüşümünün (veya izdüşümlerinin) toplam yüzey alanını; t ise ortalama kesit veya dilim kalınlığını belirler. Bu yöntemle, gerek mikroskobik, gerekse makroskobik ölçekte, etrafındaki yapılarla ilişkilerine bakılmaksızın, sınırları yeterli kesinlikte belirlenebilen her türlü yapının hacmi rahatlıkla hesaplanabilir (Gundersen ve Jensen, 1987; Mayhew, 1992).

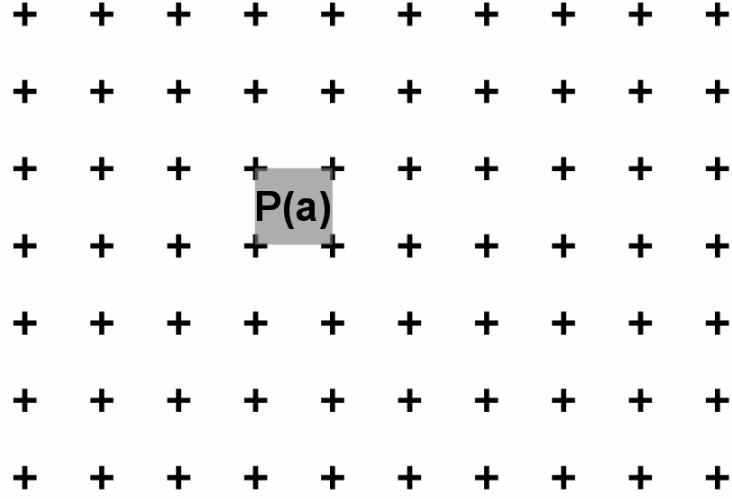
2.4.1. Hacim Hesaplaması için Kesit Yüzey Alanlarının Hesaplanması

Mikroskobik kesitler veya makroskobik dilimler üzerinde uygulanabilen Cavalieri hacim hesaplama yöntemi için ilk aşama, ilgilenilen bölgenin izdüşümlerinin (kesitlerdeki görüntülerinin) alanlarını hesaplamaktır. Bunun için ilk akla gelen, bilgisayar destekli görüntü analiz cihazları aracılığıyla, planimetrik olarak izdüşüm alanlarını doğrudan ölçmektir. Bu yöntemde, uygun biçimde kalibrasyonu yapılmış, mikroskop görüntülerini işlemek üzere tasarlanmış bir bilgisayar yazılımı ile sınırlandırılan herhangi bir bölgenin yüzey alanı ölçülebilir. Bu yöntem oldukça hızlı ve güvenilir olmasına rağmen çoğu durumda, özellikle bu cihazların yüksek maliyetlerine bağlı olarak, böyle bir sistem hazır olarak bulunmayabilir.

Yüksek doğrulukta alan ölçümünün yapılabilmesi için mutlaka bilgisayarlı bir görüntü analiz sistemi kullanılmasına gerek yoktur. Denk doğrulukta ölçümler yapmaya imkan veren çok daha ucuz yöntemler de bulunmaktadır. Stereolojide en sık kullanılan izdüşüm alanı hesaplama yolu, "noktalı alan ölçüm cetvelleri"ni kullanmaktır (Şekil 1). Noktalı alan ölçüm cetvelleri birbirlerinden eşit aralıklarla ayrılmış noktalardan (şekilde artıların kollarının kesişim yeri) oluşan sistematik nokta dizgeleridir. Böyle bir dizgede, her bir artı işaretinin orta noktası, cetveldeki bir noktayı temsil eder. Bu noktalardan her biri ise, dört adet noktanın arasında kalan bir birim cetvel alanını temsil etmektedir ($P(a)$). Aralarındaki sabit mesafesi bilinen böyle bir noktalı alan ölçüm cetveli, alanı hesaplanmak istenen herhangi bir kesit görüntüsü üzerine rasgele biçimde atılırsa, yapının kesitteki izdüşümü üzerine isabet edecek noktaların sayısı, bu izdüşümün kesitte temsil ettiği alan miktarıyla doğru orantılı olacaktır. Yani, izdüşüm ne kadar büyükse, içine o kadar fazla sayıda nokta isabet edecektir (Canan ve ark., 2002).

Bu noktaların her biri belli bir birim alanı ($P(a)$) temsil ettiğinden, ilgilendiğimiz izdüşümün sınırları içine düşen toplam nokta sayısının (ΣP_i) bu birim alan değeriyle çarpımı, bize o kesitteki izdüşümün toplam alanının (A_i) tarafsız bir hesaplamasını verecektir (Gundersen 1986, Gundersen ve Jensen, 1987):

$$A_i = \Sigma P_i \cdot P(a)$$



Şekil 1: Noktalı alan ölçüm cetveli. Cetvelde artı işaretlerinin merkezleri ile simgelenen her bir nokta $P(a)$ ile gösterilen bir birim alanı temsil eder. Dolayısıyla, böyle bir cetvel rasgele olarak bir kesit yüzeyine atılırsa, kesit yüzeyi içerisine isabet eden noktaların sayısı, bize o yüzeyin kaç birim kare olduğunu gösterecektir.

Bu şekilde gerçekleştirilebilecek bir alan ölçümü hem uygulamada oldukça basit, hem de istatistiksel olarak çok güvenilir sonuçlar veren bir çözümdür. Noktalı alan ölçüm cetvelleri ile yapılan alan hesaplamalarının, uygun sıklıkta noktalar içeren cetveller kullanıldığı takdirde, görüntü analiz sistemleriyle yapılan hesaplamalar kadar güvenilir ve doğru sonuçlar verdiği ortaya konmuştur (Gundersen ve Jensen, 1987; Gundersen ve ark., 1999). Uygulamadaki basitlik de bu yöntemin bir başka çekici yönünü oluşturmaktadır. Çoğu durumda, bir şeffaf asetata çizilmiş noktalar dizgesi yeterli olmaktadır. Bu yöntem, büyütme derecesi doğru bir biçimde saptandıktan sonra, mikroskopta gözlenen, monitöre veya bir başka görüntü ortamına yansıtılan veya fotoğraflanmış her türlü görüntü üzerinde rahatlıkla uygulanabilmektedir. Tek bilinmesi gereken, cetveldeki noktalar arasındaki uzaklığın büyütme derecesine göre, doku düzeyindeki gerçek uzunluğudur. Sözelimi elimizde 1.5 cm aralıklarla birbirlerinden ayrılmış noktalar içeren bir noktalı alan ölçüm cetvelimiz varsa ve bunu, 1000 kez büyütülmüş bir görüntü üzerinde kullanıyorsak, noktalarımızın doku seviyesinde 15 mikrometrelilik bir aralıkla birbirlerinden ayrıldıkları anlamına gelir ($1.5 \text{ cm} = 1.5 \times 10 \text{ mm} = 15 \text{ mm} = 15 \times 1000 \text{ mikrometre}$; $15.000 \text{ mikrometre} / 1000 \text{ (büyütme)} = 15 \text{ mikrometre}$). Dolayısı ile doku düzeyinde her bir nokta, $15 \times 15 = 225$

mikrometrekarelik bir alanı temsil etmektedir ve yapı üzerine isabet eden noktaların sayısı bu değerle çarpılarak, izdüşümün toplam yüzey alanı saptanabilir. Büyütme derecesini bulmanın en güvenilir yolu, bir mikrometrik disk kullanmaktır.

Kullanılan noktalı alan ölçüm cetvelinin nokta sıklığı da bir diğer önemli konudur. Genellikle, sınırları karmaşık bir yapılanma gösteren iç içe izdüşümler için daha sık yerleşimli noktalar kullanmak gerekirken, düzgün sınırlara sahip yumuşak hatlı yapılar için daha seyrek noktalar yeterli olmaktadır. Nokta sıklığını artırmak, hesaplamaların daha doğru olmasını sağlasa da, belli bir hata payı dahilinde, mümkün olan en seyrek nokta dizgesini kullanarak bu ölçümleri gerçekleştirmek daha etkin bir yaklaşım olacaktır. Çalışılacak yapıya uygun bir noktalı alan ölçüm cetveli seçimi için Gundersen ve Jensen (1987) tarafından önerilen bir nomogram yol gösterici olabilir. Son yıllarda, bu nomogram aracılığıyla bulunan değerlerden daha fazla sayıda nokta sayılması gerekliliği öne sürülmekte ise de, bu konu halen tartışılmaktadır (Canan ve ark., 2002).

2.4.2. Toplam Hacmin Hesaplanması

Kesitlerde ilgilenilen bölgenin izdüşümlerinin toplam alanını hesapladıktan sonra, toplam hacmi elde etmek için, bu toplam alan değerinin, dilimler veya kesitler elde edilirken kullanılan ortalama kesit kalınlığı değeriyle çarpılması yeterli olacaktır. Bu şekilde yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplaması elde edilebilmektedir (Gundersen ve ark., 1986, Sahin ve ark., 2001).

Burada dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta, özellikle mikroskobik çalışmalarda karşımıza çıkan örnekleme işleminde, hacmin nasıl hesaplanacağıdır. Eğer kesitlerin alınması sırasında, toplam kesit sayısının çok fazla olmasından dolayı belli bir örnekleme yapılıyorsa, hacim hesaplamasında bu husus dikkatli biçimde hesaba katılmalıdır. Örneğin, mikrotomda 5 mikrometre aralıklarla kesitlere ayrılan bir yapıdan çıkan seri kesitler arasından, 1/30 oranında sistematik tekdüze rasgele bir örnekleme yapıldığında, bunun için yapıdan elde edilen ilk 30 kesit arasından rasgele bir tanesi seçildikten sonra, bunu takip eden her otuzuncu kesit sistematik olarak yapının tamamı kesilip bitene kadar seçilmelidir. Eğer bu şekilde örneklenmiş bir kesit serisindeki herhangi bir yapının toplam hacmi hesaplanacaksa ortalama kesit kalınlığı, değer,

aradaki örnekleri de kapsayacak biçimde genişletilmelidir. Buradaki varsayımsal örneğe göre, her örneklenen kesit arasında 5 mikrometre kalınlıkta 30 tane kesit bulunduğundan, alan hesaplaması yapılan her bir kesit, 150 mikrometrelik bir kalınlığı temsil etmektedir. Dolayısıyla, hesaplamalarda kesit kalınlığı olarak kullanmamız gereken değer budur. Bir başka seçenek ise, ortalama kesit kalınlığı olarak 5 mikrometreyi kullandıktan sonra elde edilen hacim değerini, örnekleme oranı olan 30 sayısıyla çarpmaktır. Her iki seçenek de birbirleriyle eşdeğerdir ve yapının toplam hacminin tarafsız bir hesaplamasını verir (Gundersen ve ark., 1988a, Howard ve Reed, 1998).

TZP kısmında bahsedilen çalışmaların sonuçları değerlendirildiğinde TZP kullanımının kemik iyileşmesi üzerine etkisinin çelişkili olduğu görülmüştür. TZP kullanımının özellikle periodontal defektlerdeki rejenerasyonu ne ölçüde etkilediğini ortaya koyan yeni çalışmaların gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Bu bilgilerin ışığında, çalışmamızda, rejeneratif materyallerin sonuçlarının en doğru bir şekilde değerlendirmesini mümkün kılan köpeklerde oluşturduğumuz “fenestrasyon” tipi periodontal defektlerde, otojen kemik ve TZP uygulamalarını değişik zaman aralıklarında stereolojik metot kullanarak değerlendirmeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Denek Hayvanları

Çalışmada Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi tarafından sağlanan, ağırlıkları 16-20 kg, yaşları 2-2.5 yıl arasında değişen 6 adet erkek Türk çoban köpeği kullanılmıştır. Köpeklerin sistemik olarak herhangi bir hastalığının bulunmamasına ve daha önce herhangi bir çalışmada kullanılmamış olmalarına dikkat edilmiştir.

Çalışmada kullanılan hayvanlara yapılacak her türlü işlem Ondokuz Mayıs Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu kararları dahilinde gerçekleştirilmiştir. (Karar Sayısı:2004/028)

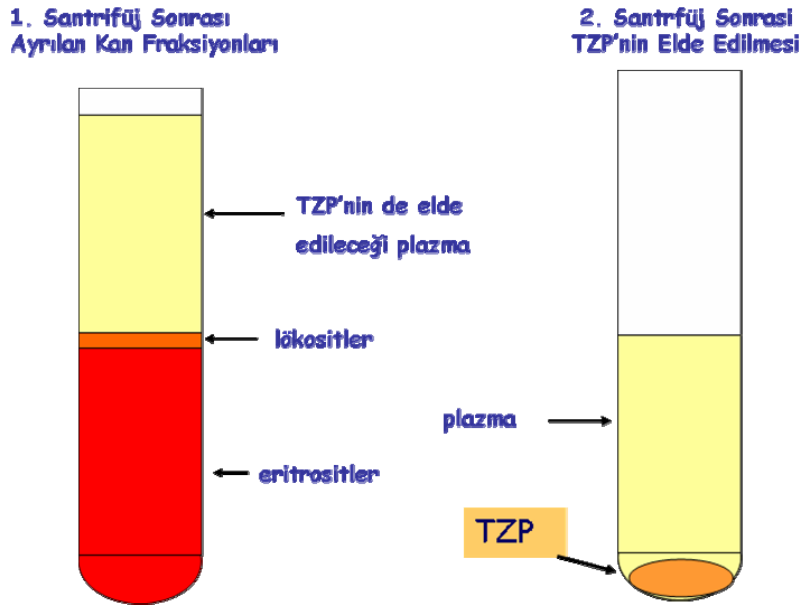
3.2. Deneklerin Hazırlanması

Cerrahi işlemler Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi ve Cerrahi Araştırma Merkezi Ameliyathanesi'nde gerçekleştirilmiştir. TZP hazırlanması için gerekli kanın alınması ve cerrahi işlemler öncesinde, ilk önce bir H2 reseptör blokörü olarak Atropin Sülfat (Drogsan, Ankara. 0.04 mg/kg) subkütan olarak verilmiştir. Bu işlemten 5-10 dakika sonra Ksilazin HCL (Rompun, Bayer, İstanbul)(2.2 mg/kg i.m.) ile sedasyonu takiben Ketamin HCL (Ketalar, Pfizer, İstanbul) (11mg/kg i.m.) ile genel anestezi sağlanmıştır.

3.3. TZP'nin Hazırlanması

Trombositten zengin plazma hazırlanması için gerekli olan yaklaşık 20 cc kan ön ekstremitede vena cephalica'dan veya buradan başarısız olunduğu durumlarda vena jugularis'den alınmıştır. TZP, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Kan Bankası'nda hazırlanmıştır. Köpeklerden alınan 20 ml kan daha önceden 3 ml sitrat çekilmiş 50 ml'lik enjektörlere çekilmiştir. Antikoagülan madde ve kanın homojen karışması için enjektör birkaç kez ters çevrilmiş fakat trombositlerin hemolize uğramaması için çalkalanmamasına dikkat edilmiştir. Zaman kaybetmeden kan bankasına götürülen kandan örnek alınarak trombosit sayısı ölçülmüştür. Kan santrifüj cihazına (ALC Centrifuge PK 130, Monzeerre, Italy) yerleştirilerek 7 dakika süre ile 200 g kuvvetinde santrifüj edilmiştir. Eritrositler ağırlıkları nedeniyle dibe çökerek üst

kısımda açık renkte plazma kısmı kalmıştır (Şekil 2). Üstteki plazma kısmı dolaşıma yeni katılan trombositleri de içerdiğinden eritrosit tabakasının üstten 1-2 mm'lik kısmıda dahil edilmek suretiyle bu plazma 8 dakika süreyle 250 g kuvvetinde santrifüj edilmiştir. Bunun sonucunda altta trombosit zengin plazma ve üstte trombosit fakir plazma tabakaları oluşmuştur (Şekil 2). TZP'da tekrar trombosit sayısı ölçülerek kandaki ve TZP'deki trombosit sayıları karşılaştırılabilmektedir. Trombosit fakir plazmada da trombosit sayısı ölçülerek içinde TZP kısmından kaçan trombosit olup olmadığı kontrol edilmiştir. Elde edilen TZP zaman kaybetmeden daha önceden başlatılmış olan ameliyata ulaştırılmıştır. Antikoagülan etkiyi ortadan kaldırmak amacıyla 0,3 ml $CaCl_2$ ile ve trombositlerin aktivasyonunu sağlamak için ise kanla karıştırılarak zaman kaybetmeden defekt bölgesine uygulanmıştır (Şekil 12).



Şekil 2: TZP hazırlanması sırasında 1. ve 2. santrifüj sonrası gözlenen durum

3.4. Cerrahi İşlem

Köpeklerin üst çenede sağ-sol 3. keser, kanin ve 1. molar dişleri, alt çenede ise sağ-sol kanin ve 1. molar dişleri kullanılmıştır (Şekil 3). Molar dişlerde her iki köke ayrı ayrı defektler açılmıştır. 15 numaralı bistüri ucu kullanılarak sulkuler insizyon defekt oluşturulacak dişin mezyal ve distalinde gerekli mesafeye kadar uzatılmış ve yapılan vertikal insizyonlar ile birleştirilmiştir (Şekil 4). Mukoperiosteal flebin kaldırılmasını takiben koronal alveolar kemik kenarından en az 5 mm uzaklıktan başlamak üzere 4x4 mm boyutunda pencere tipi defektler 12 numaralı fissür frez ve ince keski kullanmak

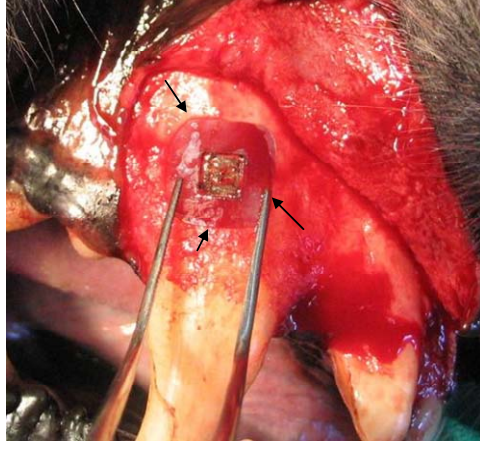
suretiyle hazırlanmıştır (Şekil 6). Herbir defektin aynı boyutlarda standart açılabilmesini sağlamak amacıyla esnek bir yapıya sahip röntgen filminden daha önceden istenen boyutta hazırlanmış şablon plakalar (oklar ile şekilde gösterilmiştir) kemik üzerine yerleştirilerek açılacak defekt sınırları ince uçlu bir kurşun kalem ile belirlenmiştir (Şekil 5). Kök eğimleri dikkate alınarak hazırlanan pencere tipi defektlerin kök sınırları içinde kalmasına özen gösterilmiştir. Kemik, steril serum fizyolojik solüsyonu kullanılarak soğutma altında semente kadar uzaklaştırılmıştır. Böylelikle, kemikteki aşırı ısınma engellenerek muhtemel bir kemik nekrozunun önüne geçilmiştir. Açığa çıkan kök yüzeyindeki sement tabakası ince uçlu keskiler ile uzaklaştırılarak dentin tabakası açığa çıkarılmıştır. Hazırlanan kemik defektlerinin koronal ve apikal sınırlarının belirlenmesi amacı ile sivri alev uçlu frez yardımı ile dentinde çentikler açılmıştır. Defekt bölgesi spanç ile kurutulurken elastomerik ölçü maddesi ile defektin ölçüsü alınmıştır (Şekil 7). Alınan ölçülere daha sonra alçı dökülerek defektin dişe göre lokalizasyonu belirlenmiştir. Bu işlem dişin parafine gömülmesi sırasında daha hassas davranılmasına yardımcı olduğu gibi, kesitlerin mümkün olduğunca defektin uzun aksına paralel bir şekilde alınmasına da olanak yaratmıştır.



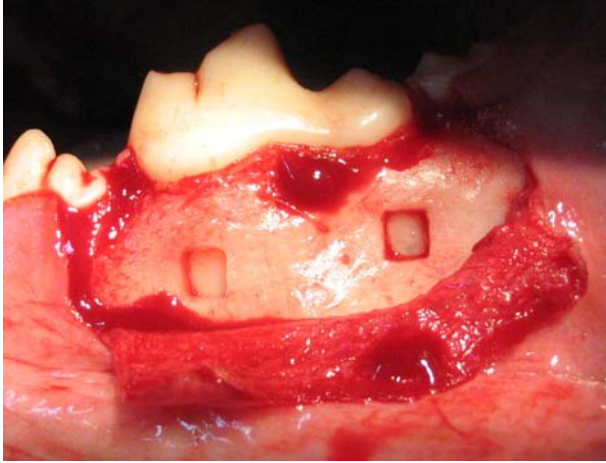
Şekil 3: Fenestrasyon tipi defektlerin oluşturulacağı bölgeler



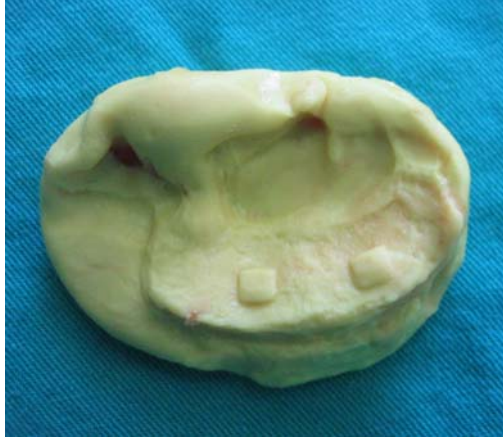
Şekil 4: Sulkuler ve vertikal insiyonlar



Şekil 5: Defekt sınırlarını belirlenmesi



Şekil 6: Oluşturulan fenestrasyon tipi defektler



Şekil 7: Elastomerik ölçü maddesi ile alınan defekt ölçüleri

3.4.1. Otojen Kemik Greftinin Elde Edilmesi

Operasyonlarda kullanılan otojen kemik grefti üst çenede 3. kesici ve kanin dişler bölgesinde hazırlanan fenestrasyon defektlerinin en az 7-8 mm komşuluğundan, kemik keski ile kortikal kemikten kazıma yapılarak elde edilmiştir (Şekil 8) . Greft materyali ister tek başına isterse de TZP ile karıştırılarak uygulanacağı bölgeye zaman kaybetmeden yerleştirilmiştir.

3.4.2. TZP ve Otojen Kemik Greftinin Karıştırılması

Tüm defektlerde homojen bir TZP ve otojen kemik grefti karışımı sağlamak amacı ile, Whitman ve Berry'nin (1997) greft partiküllerinin defekt bölgesine taşınmasını kolaylaştırmak amacı ile geliştirdikleri tekniğe benzer bir yöntem kullanılmıştır. Bir insülin enjektörünün piston kısmı çıkarılıp elde edilmiş olan otojen kemik grefti 1 ml seviyesine kadar enjektör içine doldurulmuş ve piston yerleştirilip hafif basınçla itilerek kemik partikülleri arasındaki büyük boşluklar ortadan kaldırılmıştır (Şekil 9) . Bu işlem 1 ml seviyesine kadar olması kaydıyla gerektiğinde tekrarlanmıştır. Daha sonra aynı hacimde TZP, otojen kemik grefti üzerine eklenerek basınç uygulanmış ve TZP'nin greft partikülleri arasına iyice nüfuz etmesi sağlanmıştır (Şekil 10). Sonrasında enjektörün uç kısmı bistüri ile kesilip, piston itildikten sonra TZP ve greft karışımı tek parça halinde enjektörden çıkarılmıştır (Şekil 11). Böylelikle, karışım Whitman ve Berry'nin de tarif ettiği gibi taşınması ve defekt bölgesine uygulanması kolay bir yapı kazanmıştır (Şekil 12).

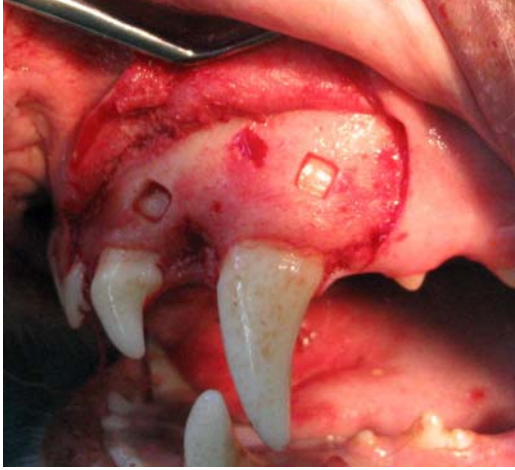
Oluşturulan defektler aşağıdaki şekilde gruplara ayrılmıştır:

Grup 1: boş bırakılan kontrol grubu

Grup 2: sadece TZP uygulanan grup

Grup 3: sadece otojen kemik grefti uygulanan grup

Grup 4: TZP+otojen kemik grefti uygulanan grup



şekil 8: Otojen kemik greftinin elde edilmesi



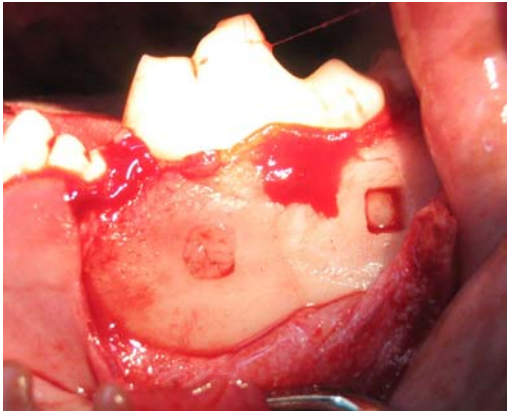
şekil 9: otojen kemik grefti



Şekil 10: TzP ve otojen kemik grefti ile karıştırılması



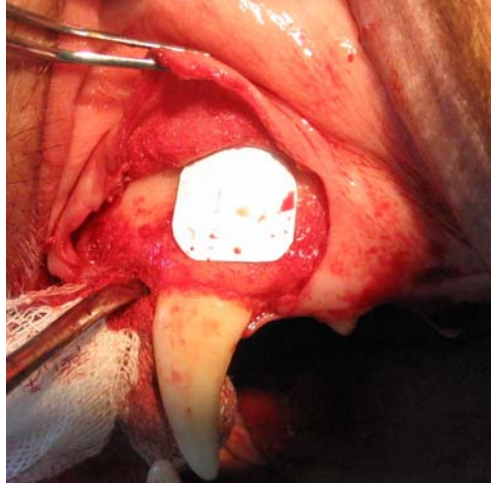
Şekil 11: İşlemler sonrası TzP ve otojen kemik grefti karışımı



Şekil 12: Sırasıyla TzP+otojen kemik ve TzP'nin defekte yerleştirilmiş görünümü

Kontrol grubu da dahil olmak üzere tüm gruplarda defektlerin tamamen izole edilerek bağ dokusu ve epitelin yara bölgesine göçünün engellenmesi amacıyla e-PTFE esaslı bir bariyer membran olan Cytoflex® (Unicare Biomedical, ABD) kullanılmıştır. Membranların defekte uygun olarak şekillendirilmelerinin ardından

defekt kenarlarından en az 3mm uzakta yerleştirilmelerine dikkat edilmiştir (Şekil 13). Daha sonra flepler gerilimsiz bir şekilde 3-0 ipek dikişler ile kapatılmıştır (Şekil 14). Operasyon sonrası antibiyotik olarak köpeklere 3 gün süre ile sefozin sodyum (Cefozin, Bilim İlaç, İstanbul) (10-12 mg /kg gün), postoperatif analjezi için non steroid antienflamatuar (Caprofen-Rimadyl, Pfizer, İstanbul)(2-4 mg/kg) verilmiştir.



Şekil 13: e-PTFE membran yerleştirildikten sonraki görünüm



Şekil 14: Suturlar atıldıktan sonraki görünüm

Dikişler operasyondan 14 gün sonra alınmış, ötanazi gününe kadar deneklere yumuşak diyet verilmiştir.

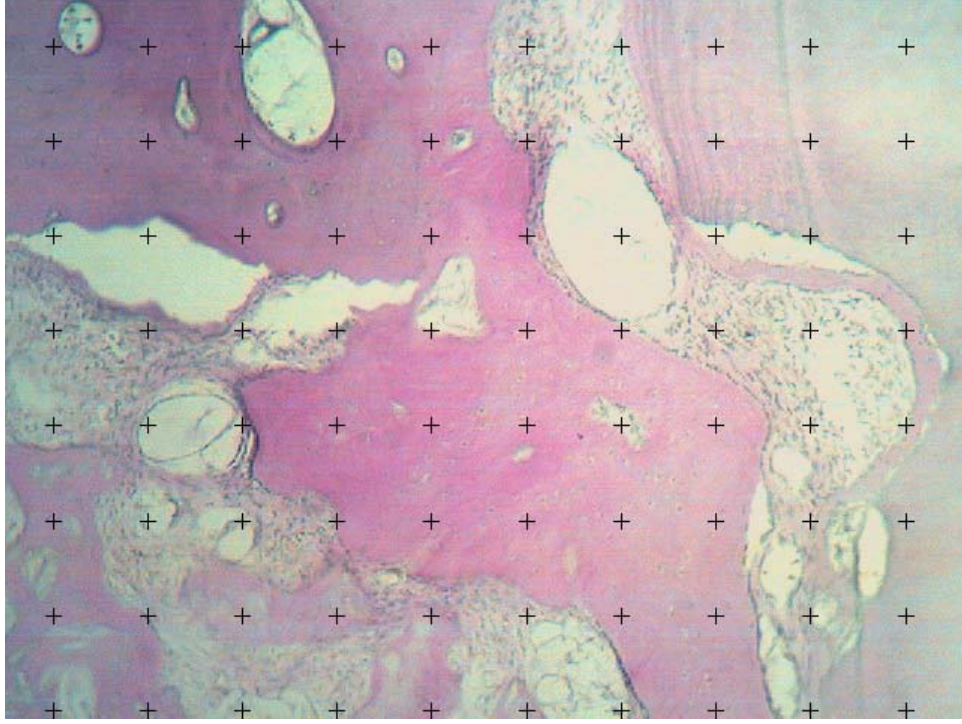
Deneklerin her birine intravenöz sodyumpentobarbital verilmek suretiyle sakrifiye edildikten sonra (sacrifikasyon zamanları aşağıda gösterilmiştir) operasyon bölgelerinden ilgili diş ve etrafındaki dokuları içerecek şekilde blok biyopsiler alınmıştır.

3.5. Histolojik İnceleme

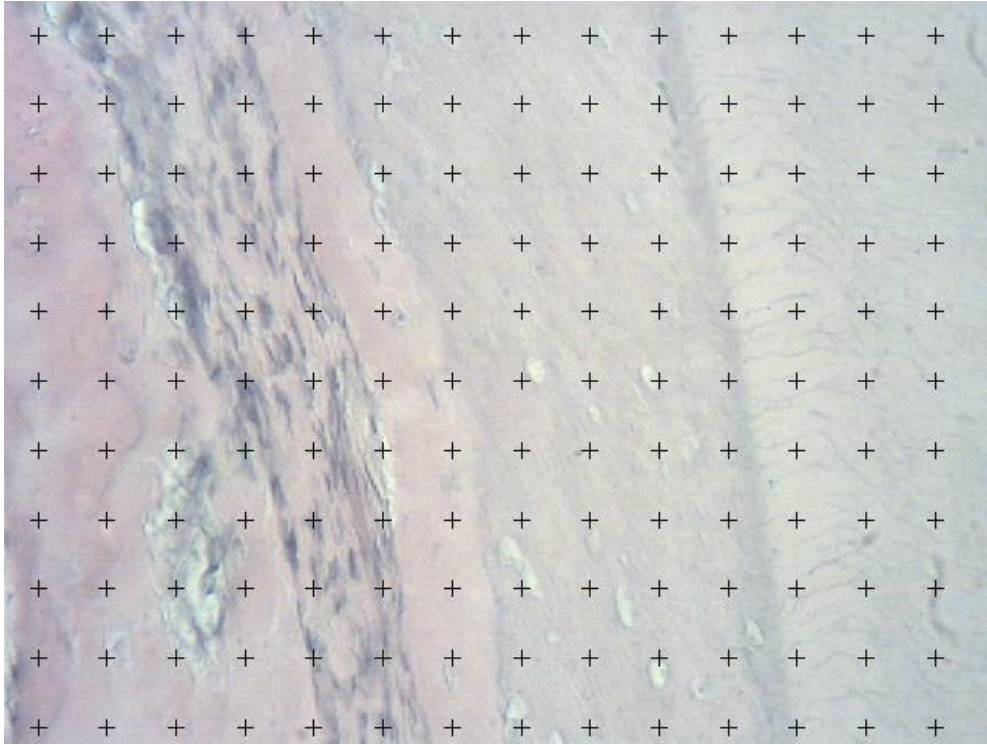
Örnekler %10 tamponlanmış formalin içinde fikse edilmiştir. %5'lik formik asit içinde dekalsifiye edilen örnekler inceltildikten sonra alkol içinde dehidrate edilmiş

daha sonra ise parafine gömülmüştür. Seri kesitler 8 µm kalınlıkta ve dişin bukkolingual yönünde alınmıştır. Her 10. kesit hematoksilin ve eozin ile boyanarak 80 µm'lik mesafeler ile ölçüm yapılması sağlanmıştır. Değerlendirmeler ışık mikroskobu (SOIF, Shanghai, China) ile x10 ve x40 büyütme ve bilgisayar destekli ImageJ programı (National Institutes of Health, USA) kullanılarak ve MD130 Electronic Eyepiece (1.3 megapiksel) kamerası ile yapılmıştır. Sement incelemesi sırasında 40x büyütme, diğer incelemelerde ise 10x büyütme kullanılmıştır. Kesitler sistematik bir sıra ile, x10 büyütmedeki ölçümlerde 1000 µm x 800 µm'lik adımlar (alan ölçümü için) ve x40 büyütmedeki ölçümlerde 200 µm x 277 µm'lik adımlar ile incelenmiştir. Alan ve daha sonra hesaplanan hacim ölçümleri mikroskop okulerine takılan bir kamera ile bilgisayar ekranına aktarılan görüntü üzerinde Imagej programı kullanılarak yapılmıştır. x10 büyütmede 107 µm ve x40 büyütmede 19 µm aralıklarla dizili "+" şekilli gridlerin rasgele yerleştirilmesi ile yapılmıştır (Şekil 15a, 15b). Daha sonra ilgili doku üzerine gelen nokta sayısının toplanıp incelenen defekt bölgesi üzerindeki toplam nokta sayısına bölünmesi ile incelenen dokunun yüzde oranı hesaplanmıştır. Sistematik rasgele örnekleme ise kadranlı indikatörler yardımı ile yapılmıştır (Kaplan ve ark., 2001; 2005) (Şekil 16). Mikroskoba monte edilmiş bu kadranlar ile incelenen bir görüntü sonrası diğer görüntü alanına geçerken kaydırılan alan kontrol edilip aynı alanın tekrar sayılması veya sayılmamış alanın bırakılması engellenmiştir.

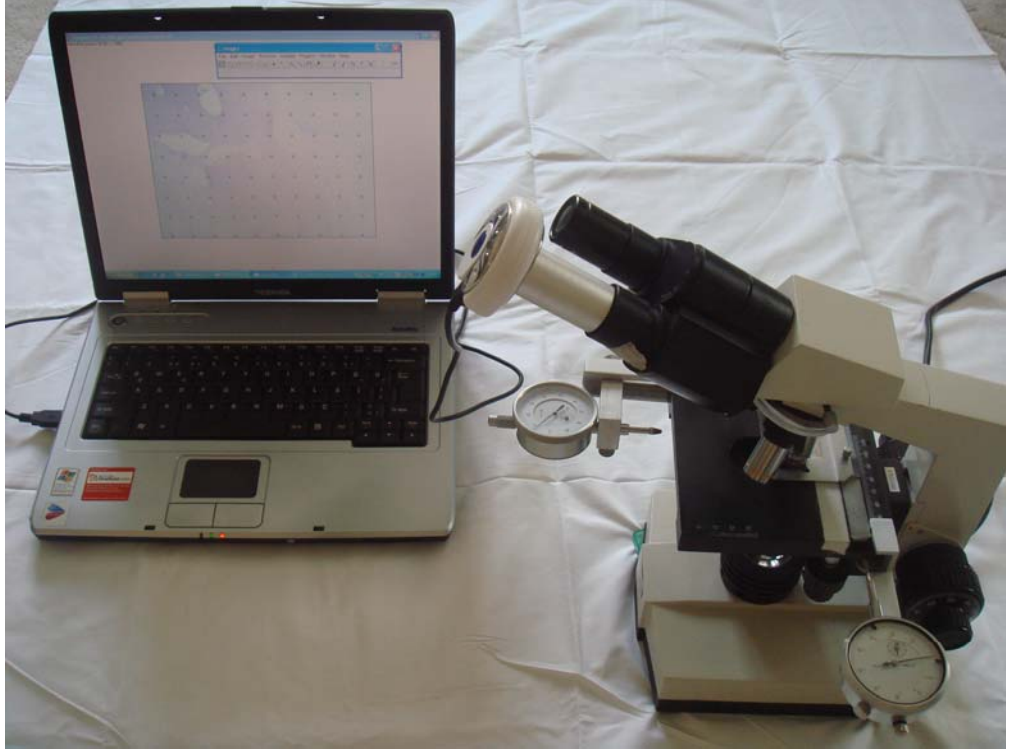
x10 büyütmede incelenen görüntüde mineralize kemik matriksi üzerindeki nokta sayısının, incelenen tüm defekt alanındaki nokta sayısına bölünerek yüzdesinin alınması sonucunda trabeküler kemik alanı yüzdesi hesaplanmıştır. Yine x40 büyütmede sement üzerine düşen nokta sayısının incelenen defekt alanındaki nokta sayısına bölünüp yüzdesinin alınması ile sement yüzdesi hesaplanmıştır. İncelenen dokulardaki hacim hesabı genel bilgiler kısmında ayrıntılı bir şekilde anlatılan yöntem ve formüller kullanılarak hesaplanmıştır (Gundersen ve ark., 1986).



Şekil 15a : 10x büyütmede uygulanan noktalı alan ölçüm cetveli



Şekil 15b: 40x büyütmede uygulanan noktalı alan ölçüm cetveli



Şekil 16: Histolojik inceleme düzeneği; mikroskobun tablasına monte edilmiş kadranlar ve okülere yerleştirilmiş bilgisayara görüntü aktaran kamera

Operasyon zamanlarının tablodaki şekilde ayarlanması ile 4, 8 ve 12 haftalık sonuçlar elde edilmesi planlanmıştır.

1. ve 4. köpek (4 ve 8 haftalık sonuçlar elde edilecektir)

O. gün sağ çene operasyon	sol çene operasyon	ötenazi
4 hafta sonra	4 hafta sonra	

2. ve 5. köpek (4 ve 12 haftalık sonuçlar elde edilecektir)

O. gün sol çene operasyon	sağ çene operasyon	ötenazi
8 hafta sonra	4 hafta sonra	

3. ve 6. köpek (8 ve 12 haftalık sonuçlar elde edilecektir)

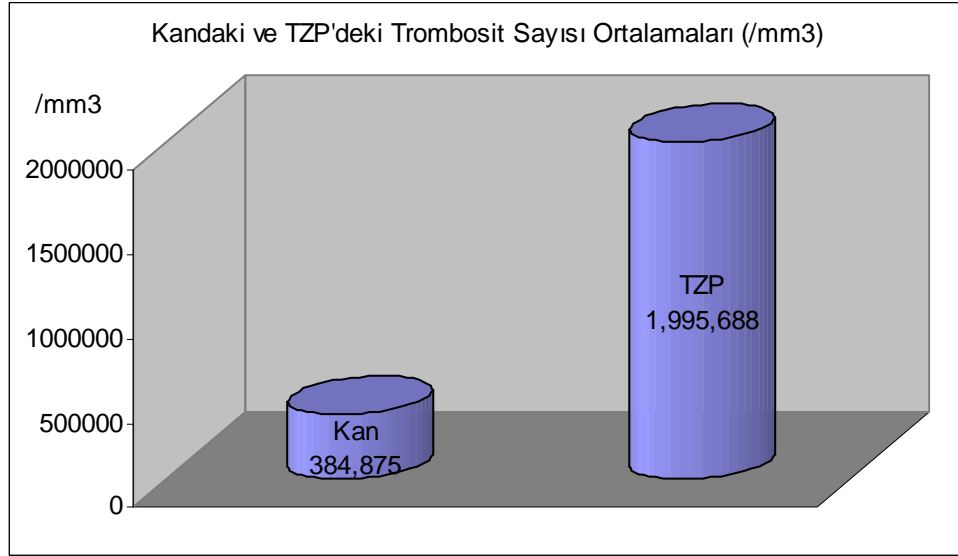
O. gün sağ çene operasyon	sol çene operasyon	ötenazi
4 hafta sonra	8 hafta sonra	

4. BULGULAR

Operasyon sonrası köpeklerde iyileşme sorunsuz olup membran açığa çıkmamıştır. 8. haftaya ait örneklerden histolojik kesitlerin alınması sırasında ve sonrasındaki boyama aşamalarında karşılaşılan sorunlar sonucunda 2 ve defekt açılması sırasında defekt tabanının kök yüzeyi dışına taşmasından dolayı 1 adet olmak üzere toplam 3 defekt çalışma dışı bırakılmıştır.

Gruplara göre defekt dağılımına bakıldığında, Grup 1'in (kontrol) 8. haftasında 5, Grup 3'ün (sadece otojen kemik grefti) 8. haftasında 6 defekt ve diğer tüm gruplarda 7'şer defekt istatistiksel olarak incelenmiştir.

Operasyon öncesinde köpeklerden alınan kandaki ve sonrasında hazırlanan TZP'deki trombosit sayıları Grafik 1'de gösterilmiştir. Kandaki ve TZP'deki trombosit sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p=0,000$). TZP'deki trombosit sayısının kandakine göre 5.18 kat arttığı tespit edilmiştir.



Grafik 1: Kan ve TZP'deki Trombosit Ortalaması Değerleri

		Tedavi Grupları			
		Grup 1 (kontrol)	Grup 2 (TZP)	Grup 3 (otojen greft)	Grup 4 (TZP+otojen greft)
Zaman	4. hafta	36.86±2.82	43.91±1.60	48.05±2.32	50.98±1.11
	8. hafta	45.64±3.13	51.25±2.06	53.09±0.76	56.01±2.39
	12. hafta	48.68±5.23	51.38±2.68	54.50±1.05	58.61±2.09
ort±std. hata					

Tablo 2: Ortalama Trabeküler Kemik Alanı Oranları (%)’nın tüm tedavi gruplarında zamana göre dağılımı

x10 büyütmede trabeküler kemik alanı oranları yüzde olarak hesaplanmış ve Tablo 2’de standart hata değerleri ile gösterilmiştir. Stereolojik metot kullandığımız için incelediğimiz dokunun hacmi de mm³ cinsinden hesaplanabilmiştir. Bu sonuçlar da trabeküler kemik alanı oranları ile paralellik göstermektedir ve istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Trabeküler kemik alanları ortalamaları % olarak Tablo 2’de gösterilmiştir.

4.1. Grup içi Trabeküler Kemik Alanı Oranları Karşılaştırması

Grup 1 (kontrol grubu): 4. ve 8. haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenmişken (p=0.000), 8. ve 12. haftalar arasında anlamlı bir fark izlenmemiştir (p=0.664).

Grup 2 (TZP): Kontrol grubuna benzer bir durum ile karşılaşılmıştır. 4. ve 8. haftalar arasında ortalama trabeküler kemik alanı değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenirken (p=0.000), 8. ve 12. haftalar arasındaki anlamlı bir fark mevcut değildi (p=1.00).

Grup 3 ve 4 (otojen kemik grefti; TZP+otojen kemik grefti): 4. ve 8. haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı (p<0.05), 8. ve 12. haftalar karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı olmayan (p>0.05) sonuçlar elde edilmiştir.

4.2. Gruplar arası Trabeküler Kemik Alanı Oranları Karşılaştırması

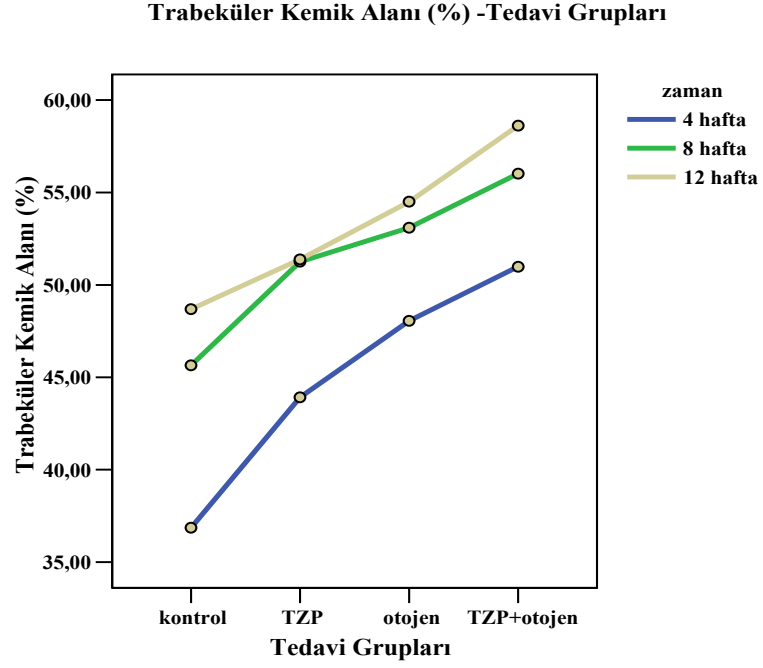
Tek tek zaman aralıkları dikkate alınarak gruplar arasındaki ortalama trabeküler kemik alanı yüzdesi karşılaştırıldığında:

4. hafta sonuçlarında *Grup 1 (kontrol)* değerlerinin tüm gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p < 0.05$). *Grup 2 (TZP)* ile *Grup 3 (otojen kemik grefti)* arasında fark gözlenmemiştir ($p = 0.118$). *Grup 4 (TZP+otojen kemik grefti)* grup 2'ye göre anlamlı derecede fazla trabeküler kemik alanı oranına sahip iken ($p = 0.000$), grup 3 ile grup 4 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir ($p = 0.584$).

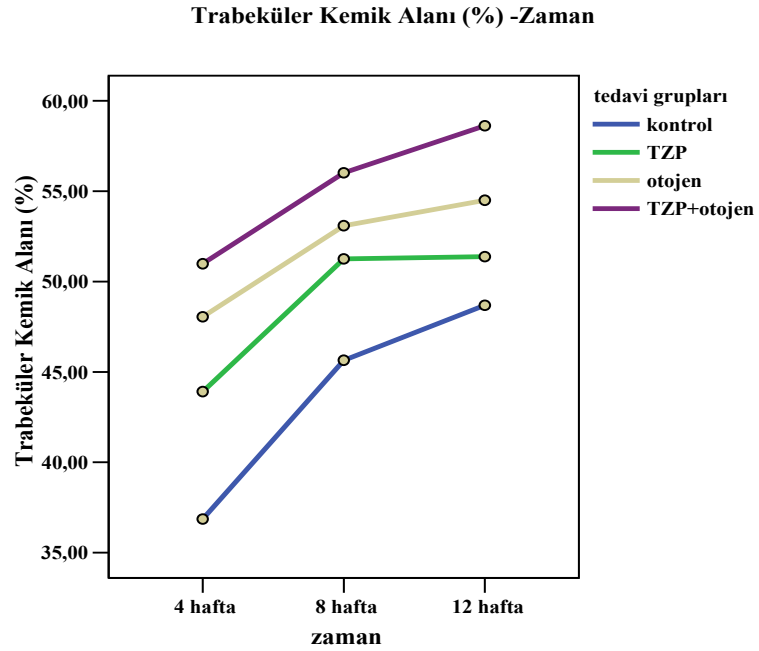
8. hafta sonuçları değerlendirildiğinde kontrol grubu ile *grup 2 (TZP)* arasında 4. haftadakine göre oranı azalmakla beraber, yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmiştir ($p = 0.017$). *Grup 2 (TZP)* ve *Grup 3 (otojen kemik grefti)* arasında 4. haftadakine benzer olarak yine fark gözlenmemiştir ($p = 0.976$). *Grup 3 ve grup 4 (TZP+otojen kemik grefti)* arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmez iken ($p = 0.648$), grup 4 grup 2'ye göre anlamlı derecede fazla trabeküler kemik alanı yüzdesine sahipti ($p = 0.036$).

12. hafta sonuçları karşılaştırıldığında, *kontrol grubu* ile *grup 2 (TZP)* arasında fark kalmadığı görülmüştür ($p = 0.704$). *Grup 2 ve grup 3 (otojen kemik grefti)* arasında yine istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p = 0.490$). *Grup 3 ve grup 4 (TZP+otojen kemik grefti)* arasında fark gözlenmez iken ($p = 0.122$), *grup 4'ün grup 2'ye* göre istatistiksel olarak anlamlı bir derecede fazla trabeküler kemik alanı oranına sahip olduğu gözlenmiştir ($p = 0.000$). Tüm tedavi gruplarına ait trabeküler kemik alanı yüzdelilerinin tedavi gruplarına göre dağılımı Grafik 2'de, zamana göre dağılımı Grafik 3'de gösterilmiştir.

Grup içi ve gruplar arası karşılaştırma Tablo 3'de gösterilmiştir. 4 haftalık grup 1'in (kontrol-4hft) trabeküler kemik alanı yüzdesi bakımından diğer tüm gruplardan farklılık gösterdiği görülmüştür ($p < 0.001$). 4 haftalık grup 2 (TZP-4hft), 8 haftalık grup 1 (kontrol-8hft) ve 4 haftalık grup 3 (otojen kemik grefti-4hft) defektleri trabeküler kemik alanı yüzdesi bakımından birbirlerinden istatistiksel olarak farklı değildi ($p = 0.139$). 8 haftalık grup 2'ye (TZP-8hft) ait değerler de 12 haftalık grup 3'e (otojen kemik grefti-12hft) ait değerlerden istatistiksel olarak farklılık göstermemekteydi ($p = 0,427$).



Grafik 2: Ortalama Trabeküler Kemik Alanı Oranlarının Tedavi Gruplarına Göre Değişimi



Grafik 3: Tüm tedavi gruplarındaki trabeküler kemik alanı yüzdelerinin zamana göre değişimi

12 haftalık grup 3'e (otojen kemik grefti-12hft) ait trabeküler kemik alanı yüzdesi 8 haftalık grup 4'e (tzp+otojen kemik grefti-8hft) ait ve 12 haftalık grup 2'ye (tzp-12hft) ait değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık göstermemekteydi ($p= 0,993$; $p=0.490$).

	Kontrol 4. hafta	Kontrol 8.hafta	Kontrol 12. hafta	TZP 4. hafta	TZP 8. hafta	TZP 12. hafta	Otojen kemik 4. hafta	Otojen kemik 8. hafta	Otojen kemik 12. hafta	TZP+otojen kemik 4. hafta	TZP+otojen kemik 8. hafta	TZP+otojen kemik 12. hafta
Kontrol 4. hafta	-	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***
Kontrol 8.hafta	***	-	X	X	**	*	X	***	***	*	***	***
Kontrol 12. hafta	***	X	-	*	X	X	X	X	**	X	***	***
TZP 4. hafta	***	X	*	-	***	***	X	***	***	***	***	***
TZP 8. hafta	***	**	X	***	-	X	X	X	X	X	*	***
TZP 12. hafta	***	*	X	***	X	-	X	X	X	X	*	***
Otojen kemik 4. hafta	***	X	X	X	X	X	-	*	**	X	***	***
Otojen kemik 8. hafta	***	***	X	***	X	X	*	-	X	X	X	*
Otojen kemik 12. hafta	***	**	**	***	X	X	**	X	-	X	X	X
TZP+otojen kemik 4. hafta	***	***	X	***	X	X	X	X	X	-	*	***
TZP+otojen kemik 8. hafta	***	***	***	***	*	*	***	X	X	*	-	X
TZP+otojen kemik 12. hafta	***	***	***	***	***	***	***	*	X	***	X	-

$p < 0.05$ * $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ *** $p > 0.05$ X

Tablo 3: Tüm gruplardaki trabeküler kemik alanı değerlerinin Tukey HSD ile karşılaştırılması

Defektlerde trabeküler kemik hacim hesaplamaları da yapılmıştır. Çıkan sonuçlar alan ölçümleri ile paralellik göstermektedir ve defektteki incelenen dokuyu mm^3 cinsinden vermektedir. Bu değerlerin de istatistiksel olarak karşılaştırması Tablo 4'de verilmiştir.

	Kontrol 4. hafta	Kontrol 8.hafta	Kontrol 12. hafta	TZP 4. hafta	TZP 8. hafta	TZP 12. hafta	Otojen kemik 4. hafta	Otojen kemik 8. hafta	Otojen kemik 12. hafta	TZP+otojen kemik 4. hafta	TZP+otojen kemik 8. hafta	TZP+otojen kemik 12. hafta
Kontrol 4. hafta	-	**	***	*	***	***	***	***	***	***	***	***
Kontrol 8.hafta	**	-	X	X	*	*	X	***	***	*	***	***
Kontrol 12. hafta	***	X	-	*	X	X	X	X	**	X	***	***
TZP 4. hafta	*	X	*	-	***	***	X	***	***	***	***	***
TZP 8. hafta	***	*	X	***	-	X	X	X	X	X	*	***
TZP 12. hafta	***	*	X	***	X	-	X	X	X	X	*	***
Otojen kemik 4. hafta	***	X	X	X	X	X	-	*	***	X	***	***
Otojen kemik 8. hafta	***	***	X	***	X	X	*	-	X	X	X	*
Otojen kemik 12. hafta	***	***	**	***	X	X	***	X	-	X	X	X
TZP+otojen kemik 4. hafta	***	*	X	***	X	X	X	X	X	-	*	***
TZP+otojen kemik 8. hafta	***	***	***	***	*	*	***	X	X	*	-	X
TZP+otojen kemik 12. hafta	***	***	***	***	***	***	***	*	X	***	X	-

p < 0.05 * p < 0.01 ** p < 0.001 *** p > 0.05 X

Tablo 4: Tüm gruplardaki trabeküler kemik hacmi değerlerinin Tukey HSD ile karşılaştırılması

x40 büyütme ile sement alan oranları yüzde olarak hesaplanmış ve Tablo 5’de gösterilmiştir. Yine sement hacmi hesaplamaları da gruplar arasında istatistiksel olarak zamana göre karşılaştırılmıştır.

4.3. Grup içi Sement Alanı Oranları Karşılaştırması

Ortalama sement alanı yüzdesi her bir tedavi grubu için zaman göz önünde bulundurularak karşılaştırıldığında, tüm gruplarda 4. hafta ile 8.hafta arasında istatistiksel

olarak anlamlı bir fark olduğu gözlenirken, 8. ve 12. haftalar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık izlenmemiştir.

4.4. Gruplar arası Sement Alanı Oranları Karşılaştırması

Tek tek zaman aralıkları dikkate alınarak gruplar arasındaki ortalama sement alanı yüzdesi karşılaştırıldığında;

4. hafta sonuçlarında kontrol grubu değerlerinin TZP grubu hariç ($p=0.103$) diğer gruplardan istatistiksel olarak farklı olduğu görülmüştür ($p<0,05$). TZP grubu ile otojen kemik grefti ve TZP+otojen grubu arasında fark gözlenmemiştir ($p=0,999$). TZP+otojen grubu sadece kontrol grubuna göre anlamlı derecede fazla sement alanı oranına sahip olarak bulunmuştur ($p=0,013$). Gruplar 8. ve 12. hafta sonuçları açısından değerlendirildiğinde istatistiksel olarak aynı durum ile karşılaşılmaktadır. Grupların hiçbirinde istatistiksel

		Tedavi Grupları			
		Grup 1 (kontrol)	Grup 2 (TZP)	Grup 3 (otojen greft)	Grup 4 (TZP+otojen greft)
Zaman	4. hafta	2,13±0,32	2,68±0,42	2,85±0,55	2,80±0,53
	8. hafta	7,79±0,14	7,90±0,29	8,11±0,99	8,12±0,15
	12. hafta	7,86±0,30	7,99±0,13	7,98±0,20	8,31±0,21

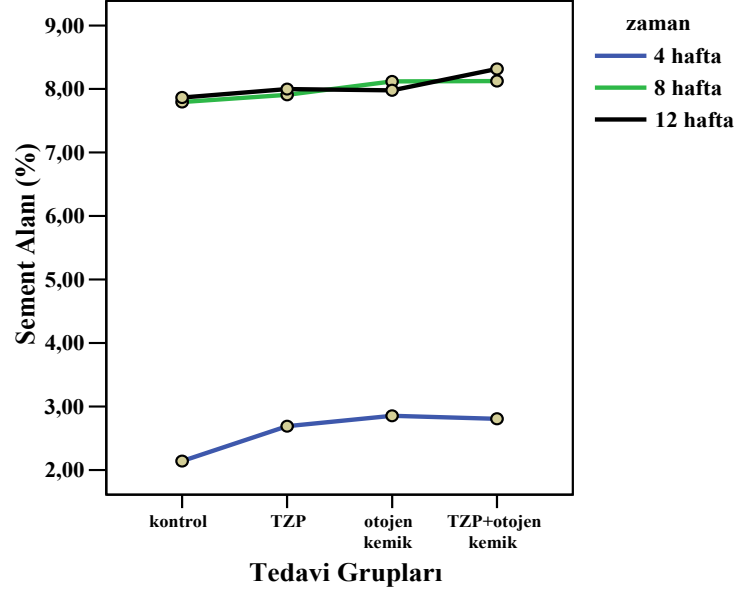
olarak fark gözlenmemiştir.

Tablo 5: Ortalama Sement Alanı yüzdelерinin tüm tedavi gruplarında zamana göre dağılımı

Sement alanı oranının tedavi gruplarına göre değişimi Grafik 4’de, zamana göre değişimi Grafik 5’de görülmektedir. Grup içi ve gruplar arası karşılaştırma sonucu ortaya çıkan durum Tablo 6’de gösterilmiştir.

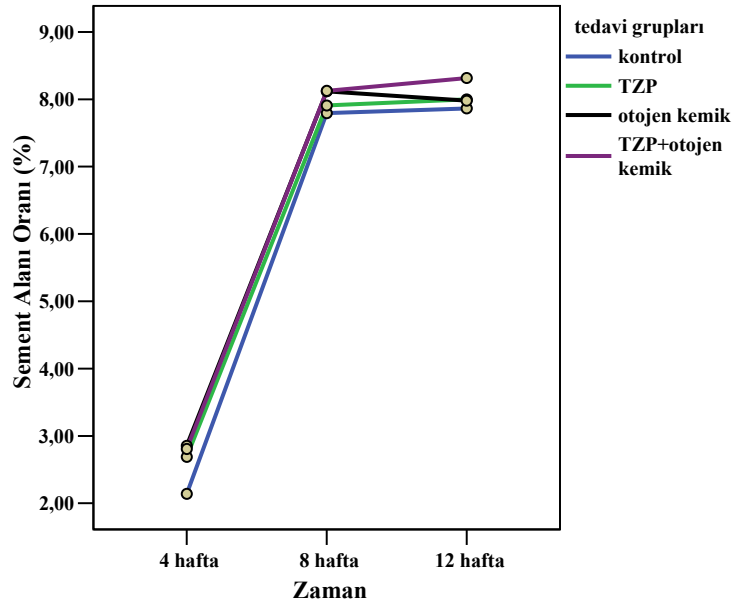
Sement hacim hesaplamaları da yapılmıştır. Çıkan sonuçlar alan ölçümleri ile paralellik göstermektedir ve defektteki incelenen sementi mm^3 cinsinden vermektedir. Bu değerlerin de istatistiksel olarak karşılaştırması Tablo 7’de verilmiştir.

Sement Alanı Oranı (%) - Tedavi Grupları



Grafik 4: Ortalama Sement Alanı yüzdesinin tedavi gruplarına göre dağılımı

Sement Alanı Oranı (%) - Zaman



Grafik 5: Ortalama Sement Alanı yüzdesinin zamana göre dağılımı

	Kontrol 4. hafta	Kontrol 8.hafta	Kontrol 12. hafta	TZP 4. hafta	TZP 8. hafta	TZP 12. hafta	Otojen kemik 4. hafta	Otojen kemik 8. hafta	Otojen kemik 12. hafta	TZP+otojen kemik 4. hafta	TZP+otojen kemik 8. hafta	TZP+otojen kemik 12. hafta
Kontrol 4. hafta	-	***	***	X	***	***	**	***	***	*	***	***
Kontrol 8.hafta	***	-	X	***	X	X	***	X	X	***	X	X
Kontrol 12. hafta	***	X	-	***	X	X	***	X	X	***	X	X
TZP 4. hafta	X	***	***	-	***	***	X	***	***	X	***	***
TZP 8. hafta	***	X	X	***	-	X	***	X	X	***	X	X
TZP 12. hafta	***	X	X	***	X	-	***	X	X	***	X	X
Otojen kemik 4. hafta	**	***	***	X	***	***	-	***	***	X	***	***
Otojen kemik 8. hafta	***	X	X	***	X	X	***	-	X	***	X	X
Otojen kemik 12. hafta	***	X	X	***	X	X	***	X	-	***	X	X
TZP+otojen kemik 4. hafta	*	***	***	X	***	***		***	***	-	***	***
TZP+otojen kemik 8. hafta	***	X	X	***	X	X	***	X	X	***	-	X
TZP+otojen kemik 12. hafta	***	X	X	***	X	X	***	X	X	***	X	-

p< 0.05 *

p< 0.01 **

p< 0.001 ***

p> 0.05 X

Tablo 6: Tüm gruplardaki sement alanı değerlerinin Tukey HSD ile karşılaştırılması

	Kontrol 4. hafta	Kontrol 8.hafta	Kontrol 12. hafta	TZP 4. hafta	TZP 8. hafta	TZP 12. hafta	Otojen kemik 4. hafta	Otojen kemik 8. hafta	Otojen kemik 12. hafta	TZP+otojen kemik 4. hafta	TZP+otojen kemik 8. hafta	TZP+otojen kemik 12. hafta
Kontrol 4. hafta	-	***	***	X	***	***	X	***	***	X	***	***
Kontrol 8.hafta	***	-	X	***	X	X	***	X	X	***	X	X
Kontrol 12. hafta	***	X	-	***	*	X	***	X	X	***	X	X
TZP 4. hafta	X	***	***	-	***	***	X	***	***	X	***	***
TZP 8. hafta	***	X	*	***	-	*	**	**	*	**	**	**
TZP 12. hafta	***	X	X	***	*	-	***	X	X	***	X	X
Otojen kemik 4. hafta	X	***	***	X	**	***	-	***	***	X	***	***
Otojen kemik 8. hafta	***	X	X	***	**	X	***	-	X	***	X	X
Otojen kemik 12. hafta	**	X	X	***	*	X	***	X	-	***	X	X
TZP+otojen kemik 4. hafta	X	***	***	X	**	***	X	***	***	-	***	***
TZP+otojen kemik 8. hafta	***	X	X	***	**	X	***	X	X	***	-	X
TZP+otojen kemik 12. hafta	***	X	X	***	**	X	**	X	X	***	X	-

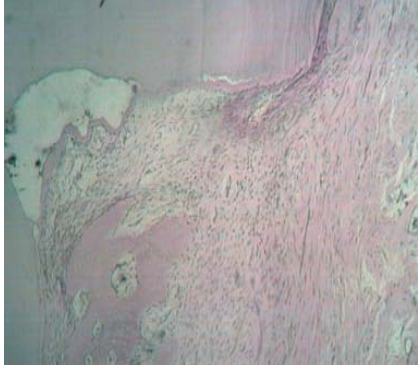

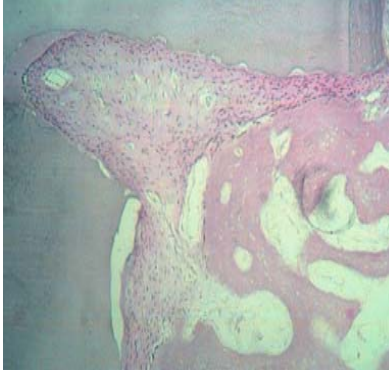
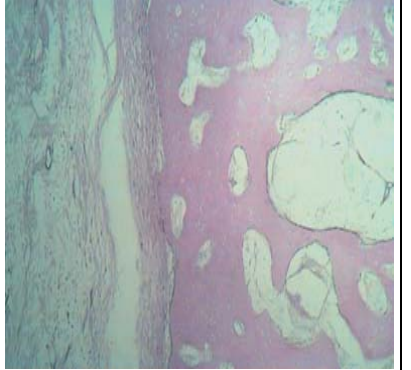
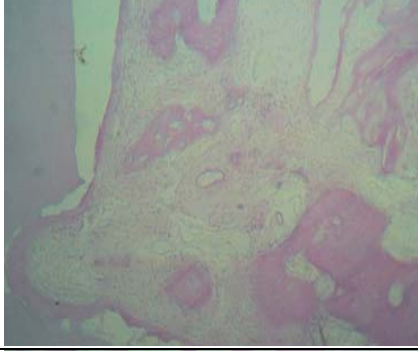
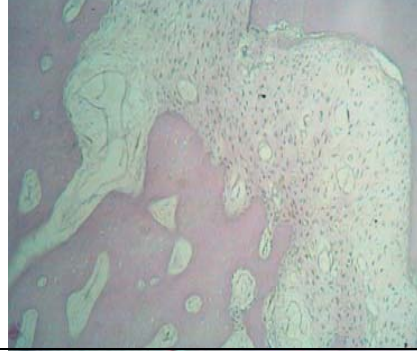
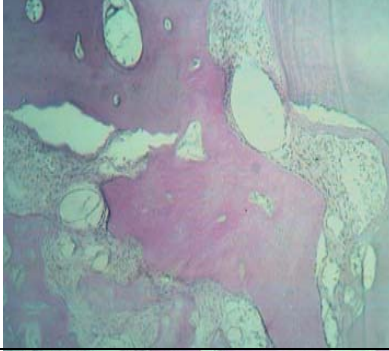
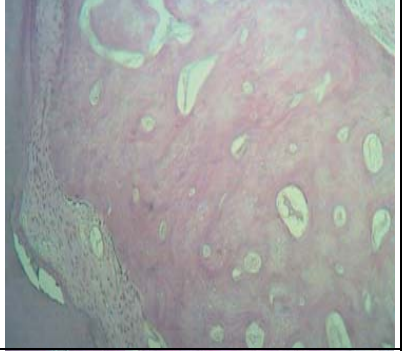
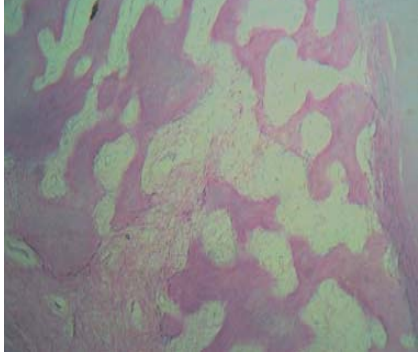

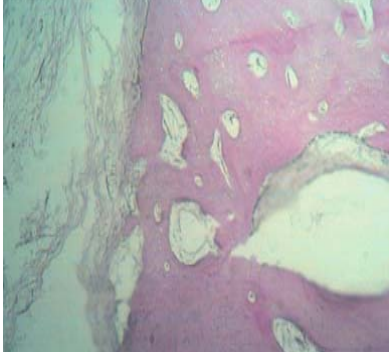
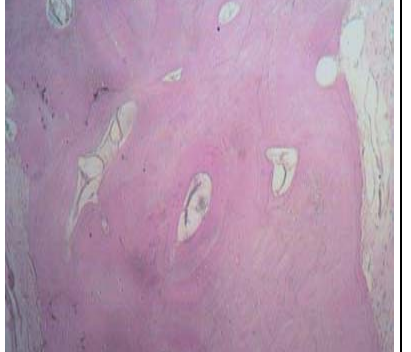
p< 0.05 *

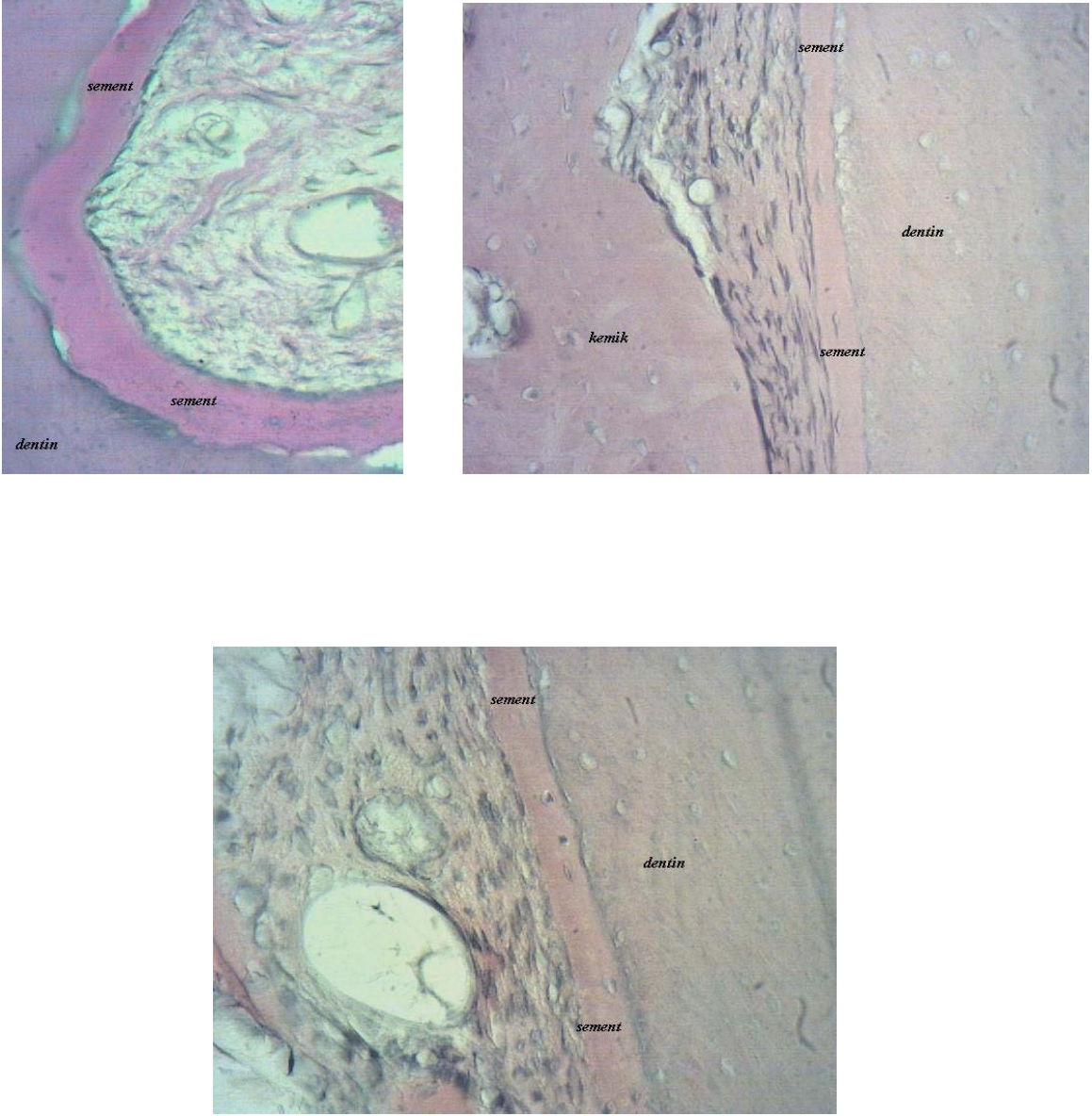
p< 0.01 **

p< 0.001 ***

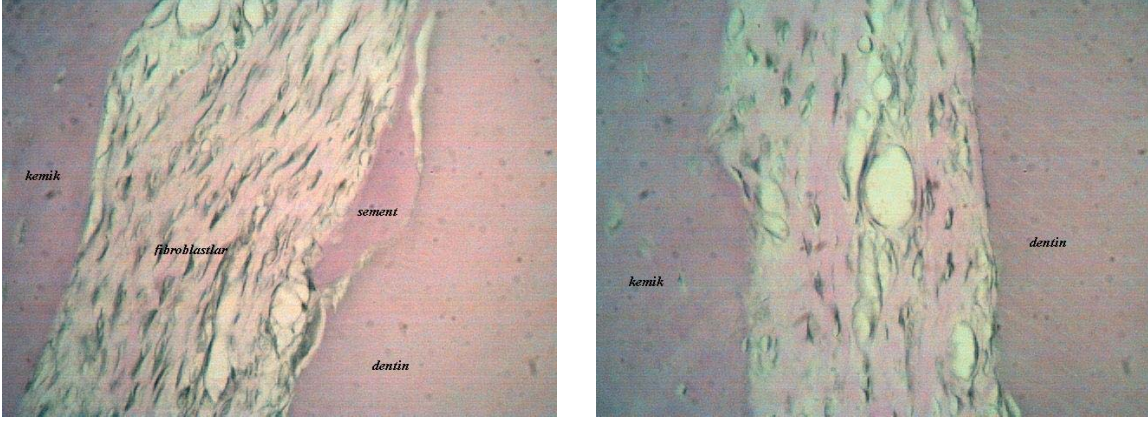
p> 0.05 X

Tablo 7: Tüm gruplardaki sement hacim değerlerinin Tukey HSD ile karşılaştırılması

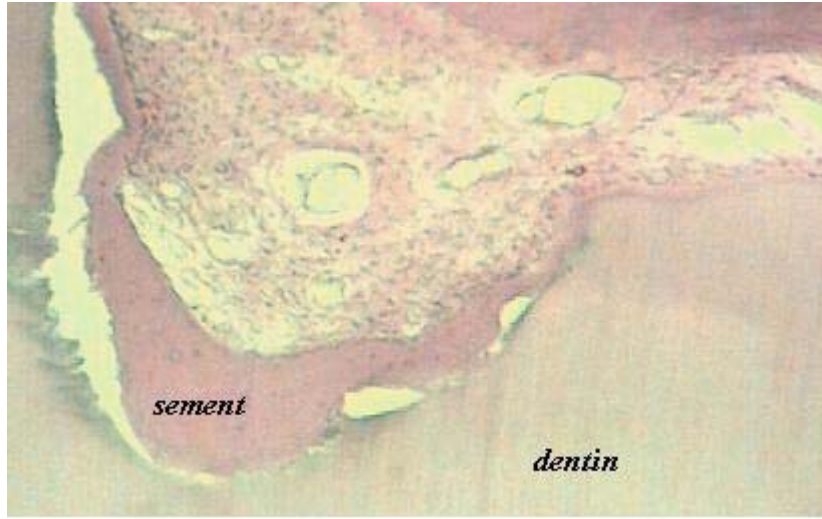
	Kontrol	TZP	otojen kemik grefti	TZP+otojen kemik grefti
4. hafta				
8. hafta				
12. hafta				



Şekil 18: x40 büyütmelelerde 8. ve 12. haftalara ait kalın seмент görünümleri; periodontal aralıkta yoğun vasküler yapı ile beraber fibroblastlar görülmekte



Şekil 19: x40 büyütmelerde 4. haftaya ait sement görünümleri; sement ince, hiç oluşmamış veya belli bir noktada kesintiye uğramakta



Şekil 20: x10 büyütmede defekt kenarında kalın olan sementin defektin merkezine doğru inceldiği görülmekte

Tüm gruplara ait histolojik kesitlerden görüntüler Şekil 17’de gösterilmiştir. Histolojik kesitlere ait genel yorumlar şöyledir;

4. Hafta

Tüm gruplarda yeni oluşan kemik trabekülleri arasında vasküler bağ dokusu yoğun olarak gözlenmektedir. TZP’nin yabancı cisim reaksiyonu yaratmadığı, enflamasyon oluşturmadığı izlenmektedir. Otojen kemik grefti kullanılan gruplarda trabeküler kemik miktarının arttığı dikkat çekmektedir.

8. Hafta

Yeni kemik yüzeyini örten periosta benzeyen bağ dokusu izlenmektedir. Kemik trabekülleri daha olgunlaşmıştır. Özellikle kontrol grubunda kemik trabekülleri arasında aktif fibroblastik yapıya sahip yoğun hücrel aktivite gözlenmiştir. Tüm gruplarda enflamasyon bulgusuna rastlanmamıştır. TZP+otojen kemik grefti grubunda diğer gruplara göre daha olgun karakterde kemik gözlenmektedir.

12. Hafta

Özellikle TZP+otojen kemik grefti grubuna ait kesit fotoğrafında da görüldüğü üzere kemiğin olgunlaştığı ve havers sisteminin geliştiği gözlenmektedir. Kontrol grubunda ise trabeküler yapının daha gevşek karakterde olduğu ve fibroblastik bağ dokusunun da boşlukları doldurduğu izlenmektedir. Artan kemik hacmi ile beraber periodontal aralık daha net bir şekilde ayırt edilebilmektedir.

Kesitlere ait fotoğraflarda defektlerde oluşturulmuş çentikler görülmektedir. Defekt kenarlarında kalın olan sement tabakasının defektin merkezine gidildikçe incelendiği veya kaybolduğu izlenmektedir (Şekil 20). Yer yer sementin bağlı bulunduğu dentin tabakasından ayrıldığı dikkat çekmektedir. 4. haftada ince gözüken sement tabakasının 8. ve 12. haftalarda kalınlaştığı görülmektedir (Şekil 18 ve 19) .

4.5. İstatistiksel Analiz

(2x2)x12 faktöriyel yapı için çift yönlü varyans analizi tedavi ve zaman grupları ve bunların ilişkileri için gerçekleştirilmiştir. Trabeküler kemi alanı ve sement için tüm tedavi kombinasyonları Tukey çoklu karşılaştırma testi ($\alpha=0.05$) ile yapılmıştır. Kandaki ve TZP'deki trombosit sayılarının karşılaştırılması Wilcoxon testi ($\alpha=0.05$) ile yapılmıştır. İstatistikler, SPSS 12.0 for Windows istatistik programı ile gerçekleştirilmiştir.

5. TARTIŞMA

Periodontoloji Bilimi yıllardır periodontal rejenerasyonu sağlamanın yollarını araştırmaktadır. Araştırmacılar rejenerasyonu sağlamanın yollarını organizma dışı kaynaklarda aradıktan sonra aslında hiç de yabancı olmayan fakat dikkat çekmeyen bir kaynak keşfettiler; bu organizmanın kendisiydi. Son yıllarda yoğunlaşan kök hücre çalışmaları ve trombositlerdeki büyüme faktörlerinden daha fazla yararlanma gibi fikirler bu felsefenin ürünleridir. Yaklaşık 10 yıldır üzerinde yoğun olarak çalışılan bir konu olmasına rağmen (Whitman ve ark., 1997), TZP'nin otojen kemik grefti ile birlikte periodontal defektlerde kullanıldığı ve iyileşmenin erken ve ilerleyen safhalarındaki kemik ve sement rejenerasyonunu histolojik olarak ortaya koyan bir çalışma henüz mevcut değildir. Çalışmamız bu yönüyle literatürdeki bir eksiği de tamamlamış olmaktadır. Üzerinde çok fazla bilgi sahibi olunmayan bir materyal veya yöntemin sonucunun sadece klinik veriler ile değerlendirilmesi yanıltıcı olabilmektedir. Bu gibi durumlarda histolojik değerlendirme ön plana çıkmaktadır. Histolojik inceleme, şüphesiz ki klinik olarak iyileşmenin değerlendirilebileceği en güvenilir yoldur. Bununla birlikte; etik sebepler ve kontrole olan ihtiyaç gereksinimi bu yöntemin çeşitli hayvan modelleri kullanarak uygulanmasını gerektirmiştir.

Bu çalışmada denek olarak köpek kullanılmıştır. Bunun nedenleri arasında, bu hayvandan elde edilen kan miktarının yeterli olması, üretilen TZP içindeki trombosit sayısının tatminkâr ve insandan elde edilene yakın olması, yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonu ile beraber periodontal dokuların değerlendirildiği diş hekimliği çalışmalarında iyi bir model olarak kabul edilmesi gösterilebilir (Page ve Schroeder, 1982). Bunlara ek olarak, köpeklerden kan alımı kolaydır. Çalışmamızda kan v. cephalica accesoria veya v. jugularis'den alınmıştır. Köpek kanında normal trombosit sayısı 175.000-500.000/mm³ (Turgut, 2000), insan kanında ise 150.000–400.000/mm³'tür. Bu da köpekten elde edilen TZP içindeki trombosit sayısının insandan elde edilene yakın olduğunu göstermektedir. Köpek dişlerinde fenestrasyon defektleri oluşturularak yeni oluşan dokuların histolojik olarak kolaylıkla değerlendirilebilir olması ve bakımlarının kolay olması da köpeğin denek olarak tercih edilmesinde rol oynayan diğer faktörlerdendir. Cerrahi işlemlerin gerek uzun sürmesi gerekse de birden fazla olan geniş bir bölgeyi içermesi ve travmatik olmasından dolayı

hayvanların erişkin, sağlıklı ve daha önceden hiç operasyon geçirmemiş olmalarına özellikle dikkat edilmiştir.

Çalışmamızda sıçanlar tercih edilmemiştir çünkü standart terapötik TZP hazırlanması için gerekli kan alındığında sıçanların hayatı tehlikeye girmektedir. Literatür incelendiğinde TZP hazırlamak için yetersiz kan miktarına sahip hayvanlarda yapılan bazı çalışmalarda donör kan kullanılmıştır (Ranly ve ark, 2005; Pryor ve ark, 2005). Fakat bu uygulamalara şiddetle karşı çıkan çalışmalar yayımlanmış ve yanlış sonuçların elde edileceği bildirilmiştir. TZP otojen bir uygulamadır ve donör kan kullanımının immün reaksiyonlara yol açabileceği belirtilmiştir (Marx, 2004). Bir diğer karşı çıkılan uygulama ise liyofilize trombositlerin kullanımınıdır. Bu tip trombositler canlı değildir ve biyoaktif büyüme faktörlerini salgılayamazlar. Homojen trombositler hücre membranına yapışmalarından dolayı da aynı zamanda antijeniktirler (Marx, 2004). Sıçanların tercih edilmemesindeki bir diğer sebep ise fenestrasyon defekti oluşturmak için sadece alt 1. molar dişlerinin kullanılabilir olması ve bu dişte de defekti oluştururken karşılaşılabilecek manüplasyon zorluğudur.

Araştırmalarda sıklıkla kullanılan köpeklerin iyileşme yetenekleri insandan farklı olmasına rağmen, bu çalışmaların sonuçlarının ileri dönem çalışmalar için önemli bir bilgi kaynağı oluşturduğu düşünülmektedir (Kovacs ve ark., 2005). Bu çalışmada kullanılan 6 adet köpeğin hiç birinde operasyon sırasında veya sonrasında herhangi bir komplikasyon gözlenmemiştir.

Biyolojik maddelerin etkilerini değerlendirmek amacı ile pek çok deneysel model 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 defektinin bu tip faktörlerin etkilerini bertaraf etmede etkili olacağı bildirilmiştir (Choi ve ark., 1993; Arpak ve ark., 1996). Akut fenestrasyon tipi defekt modeli farklı terapötik işlemler sonrasında erken iyileşme evrelerini incelemeye sıklıkla kullanılmaktadır (Caplanis ve ark., 1998; Selvig ve ark., 1996; Tal ve ark., 1996). Periodontal fenestrasyon tipi defektler biyomateryallerin, kök yüzeyi biyomodifikasyonlarının ve ekstrasellüler matriks faktörlerinin etkilerini göstermek amacı ile kullanılmıştır (Karring ve ark., 1993). Bu defekt modelinde, defekt boşluğu tamamen periodontal dokular ile çevrelenmiştir ve progenitör hücrelerin defekt kenarlarından defekt içine doğru çoğalmasına imkân verir.

Ayrıca, defekt lokalizasyonu itibariyle 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 (Caplanis ve ark., 1998; Caton ve ark., 1987; Claffey ve ark., 1989; Petterson ve Aukhil, 1986; Tal ve ark., 1996). Çalışmamızda da fenestrasyon tipi periodontal defektlerin kullanılmasına dayanak sağlayan faktörler yukarıda sözü geçen faktörlerdir.

Periodontal fenestrasyon defekt modelinde Choi ve ark. (1993) defektlerin alveoler kretten 6 mm apikalde konumlandırılması gerektiğini, bu şekilde dişeti kenarındaki enflamatuvar etkilerden minimal düzeyde etkilenileceğini belirtmelerine rağmen, aynı kişilerin de bulunduğu daha sonra yapılan çalışmalarda bu mesafeyi 3-6 mm arasında belirtmiş ve bunun etkilerinden bahsetmemiştir (Selvig ve ark., 1994;1996). Ayrıca, fenestrasyon tipi defekt modelinin kullanıldığı ilk çalışmalardan biri olan Pettersson ve Aukhil'in (1986) çalışmasında, bu tip dejeneratif etkileri elimine etmek için 2 mm'lik bir mesafenin yeterli olduğu öne sürülmüştür. Bu literatür bilgisi ışığı altında, çalışmamızda defektler alveoler kretten 5-6 mm uzaklıkta hazırlanmıştır.

Tal ve ark. (1996) fenestrasyon tipi defektin alveoler kretten 4mm uzaklıkta ve 5 mm çapında olması gerektiğini ve en uygun dişin üst çene kanin dişi olduğunu bildirmişlerdir. Fakat, bu cümleden daha küçük bir defektin yeterli olmadığı anlamı çıkarılmamalıdır. Çünkü yazarlar, 4x3 mm boyutunda fenestrasyon defektlerinin 3 aylık sonuçlarının değerlendirildiği Petersen ve Aukhil (1986) ve Caton ve ark.'nın (1987) çalışmalarını refere ederek spontan dolum olmayacağını da bildirmişlerdir. Çalışmamızda boş bırakılan defektlerin oluşturduğu bir kontrol grubu da bulunmaktadır. Böylece oluşabilecek spontan bir dolunun oluşması da kontrol edilmiştir.

Fenestrasyon tipi defekt modelinin kullanıldığı çalışmalar incelendiğinde, her iki çenenin kullanıldığı çalışmalara sıklıkla rastlanmaktadır.(Nyman ve ark., 1982; Caton ve ark., 1987; Selvig ve ark., 1993; 1994; Sculean ve ark., 2000). Ayrıca genellikle kanin dişlerin kullanımı yanında, üst çenede 2. ve 3. kesici, 2. premolar, alt çenede 2., 3., 4. premolar ve 1.molar dişlerin de fenestrasyon defekt modeli olarak kullanıldığı görülmektedir. Kanin dişler dışındaki dişlerde defekt oluşturmak biraz daha dikkat gerektirmektedir. Çalışmamızda alt 1. molar dişde sadece bir defektin oluşturulması sırasında defekt tabanı sement dışında kemiğe taşıdığı için defekt

değerlendirilmeye alınmamıştır. Ayrıca köpek dişlerinin büyüklükleri de bazı dişlerde fenestrasyon tipi defekt oluşturmayı güçleştirebilmektedir.

Çalışmamızda kullandığımız fenestrasyon tipi defekt boyutları bu zamana kadar çoğunlukla köpek ve çok az sayıda rat modelinde kullanılmıştır. Kabul edilen ve uygulanan defekt büyüklüğü köpek modelinde daha geçerlidir. Kullanılacak yeni bir modelde gruplarda kendiliğinden bir rejenerasyon olmamasını sağlayabilecek minimum defekt büyüklüğü (critical size defect) henüz belirli değildir (Wikesjo UM., kişisel görüşme).

TZP, fibrin yapıştırıcılara göre yüksek konsantrasyonlarda trombosit ve daha fazla yapıştırıcı proteinler içermesi bakımından fibrin yapıştırıcılardan ayrılmaktadır. Pıhtı direncinin %55'inin trombositlerden, %45'inin fibrinden kaynaklandığı düşünülürse TZP'deki pıhtı direncinin fibrin yapıştırıcılardan daha fazla olduğu savunulabilir. Aynı zamanda trombositler tarafından ortama salınan büyüme faktörleri göz önüne alındığında yara iyileşmesine katkısı olan bir uygulama olarak literatürdeki yerini almıştır (Bhanot ve Alex, 2002).

Literatür incelendiğinde, TZP hazırlanmasında pek çok farklı tekniğin kullanıldığı görülmektedir. Kullanılan santrifüj cihazının özelliği, uygulanan merkezkaç kuvvetinin değeri ve süresi, santrifüj sayısı ve jelasyon ve trombosit aktivasyonunda kullanılan ajanların farklılığı da araştırma sonuçlarını etkilemektedir.

Santrifüj sırasında, trombositlere içlerindeki büyüme faktörlerinin aktivasyonlarını ve salınımlarını önleyecek şekilde zarar verilmemeli ve kırmızı kan hücrelerinden trombositlerin tamamen ayrımı sağlanmalıdır (Marx, 2004). Marx (2004) TZP'nin yara iyileşmesi üzerine negatif etkisinin elde edildiği çalışmalarda, yeterli miktarda terapötik trombosit konsantrasyonunun kontrolünün gerektiğini bildirmiştir. Çalışmamızda santrifüj sonrası çıkarılan plazmada da trombosit sayımı yapılarak trombosit olup olmadığı kontrol edilmiştir. TZP hazırlanmadan önce kandaki ve sonrasında TZP'deki trombosit sayıları ölçülmüştür. Sonuçta TZP'deki trombosit sayısının kandakine göre 5.18 kat arttığı tespit edilmiştir. Weibrich ve ark.'nın (2004) tavşanlar üzerinde yaptığı çalışmada, TZP içindeki trombosit konsantrasyonunun optimal sonuç için belli sınırlarda olması gerektiği bildirilmiştir. Trombosit konsantrasyonunun 2-6 kat artmasının gerekli olduğu, bu değerlerden daha düşük seviyelerdeki artışlarda herhangi bir pozitif etki gözlenmezken, daha fazla seviyelerdeki

artışlarda TGF- β 'dan kaynaklanan inhibitör etkisinin olabileceği belirtilmiştir. Çalışmamızda kullandığımız TZP içindeki trombosit konsantrasyonu 5.18 kat artmıştır ve Weibrich ve ark.'nın belirttiği sınırlar içerisindedir.

TZP hazırlanması sırasında kullanılan santrifüj cihazı ve uygulanan teknik dışında bu işlemlerin yapıldığı ortam ve hazırlayan kişi de önemlidir. TZP hazırlanması esnasında sterilizasyona dikkat edilmeli, hazırlayan kişi, teknik hakkında bilgili ve tecrübeli olmalıdır. Çalışmamızda köpekten alınan kan ya da plazma tekrar köpeğin dolaşımına verilmemiştir. Kan alındıktan sonra, kan ve pıhtılaşmayı önleyici maddenin iyice karışması için enjektör birkaç kez ters çevrilmiş ancak hemolize yol açabileceği için çalkalanmamıştır.

Kanın pıhtılaşmasını önlemek için kullanılan antikoagülan seçimi bakımından literatür incelendiğinde büyük çoğunlukla sitrat türevlerinin kullanıldığı görülmektedir. Sitrat fosfat dekstroz adenozin, trisodyum sitrat, sodyum sitrat bu amaçla kullanılmaktadır. Landesberg ve ark. (2000), çalışmalarında sodyum sitratla beraber etilendiamintetraasetik asit (EDTA) kullanmışlar ve EDTA grubunda daha yüksek sayıda trombosit elde etmelerine rağmen, ışık mikroskobu incelemesi yapıldığında, bu gruptaki trombositlerin zarar gördüğünü, parçalandığını ve çok sayıda hücrese olmayan artık bulunduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda kullandığımız sodyum sitrat 0.105 M'dir. Bu karışım uygulanan tekniğin gerektirdiği sürede kanın pıhtılaşmasını engellemektedir.

TZP hazırlanması sırasında uygulanacak merkezkaç kuvvetinin değeri ve süresi ile uygulama sayısı konusunda da ortak kabul edilen bir değer henüz mevcut değildir. Yapılan çalışmalar incelendiğinde, yayınların bir kısmında tek, bir kısmında iki santrifüj yapıldığı, bazı yayınlarda santrifüjün dakikada dönme sayısını bildiren rpm (round per minute) değerinin bazılarında ise merkezkaç kuvvetini ifade eden g kuvvetinin belirtildiği görülmüştür. Merkezkaç kuvveti santrifüjün yarıçapı ve santrifüjün dakikada dönme sayısından etkilendiğinden, sadece rpm değerinin verilmesi kanın şekilli elemanlarına uygulanacak gerçek kuvvetin bilinmemesine yol açacaktır. Marx, 1998 yılında yayınladığı makalesinde uyguladığı santrifüjün rpm değerini vermiş olmasına rağmen, 2000 yılında yayınlanan ve Landesberg ve ark.'nın (2000) çalışmasını değerlendirdiği makalede rpm cinsinden değer vermenin anlamsız olduğunu ve g değerinin verilmesinin gerekliliğinden bahsetmektedir.

Merkezkaç kuvvetinin değeri kandaki şekilli elemanlara uygulanacak kuvvetin değerini belirtmektedir. Venöz kan alındığında bütün kan elemanları karışık halde bulunduğundan santrifüj sırasında kullanılan kuvvet önemlidir. Fazla kuvvet trombositlerin eritrositlerle beraber tüpün tabanına toplanmasına yol açmaktadır. Bu konuyu araştırmak üzere yapılan çalışmaların sonuçlarına göre aşırı g kuvvetlerinin kullanılması trombosit sayısının artmasından çok azalmasıyla sonuçlanmaktadır (Marx, 2000). Landesberg ve ark.'nın (2000) çalışması 200 g ve 10 dakika süre ile yapılan iki santrifüjün maksimum artışı sağlayabileceğini göstermiştir. Dugrillon ve ark. (2002) 205 g kuvvetinde santrifüj uyguladıktan sonra trombosit sayısında 1.4 kat artış elde etmişlerdir. Daha sonra farklı kuvvetler uygulayarak optimum ikinci santrifüj değerini belirlemeye çalıştıkları aynı çalışmalarında, 800 g'den fazla uygulanan ikinci santrifüjün elde edilen büyüme faktör miktarını arttırmaktan çok azalttığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada sonuçta elde edilen trombosit sayısı başlangıçta tam kanda bulunan trombositin 17 katıdır. Artış dikkat çekici derecede yüksek olsa da başlangıçta hastadan alınan kanın 250 ml olduğu ve sonuçta elde edilen konsantre trombositin 8 ml olduğu unutulmamalıdır. Marx ve ark.'na göre (1998) tam kana oranla %300 oranında artmış trombosit sayısına sahip plazma TZP olarak kabul edilmektedir. Farklı hazırlama yöntemlerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada kullanılan yöntemlerden bir tanesi trombosit sayısını 3 kat artırırken bir diğeri 7 kat artırmaktadır (Weibrich ve Kleis, 2002). Bizim çalışmamızda kullandığımız değerler birinci santrifüjde 200 g ile 7 dakika ve ikinci santrifüjde 250 g ile 8 dakikadır.

TZP hazırlandıktan sonra antikoagülan inhibitörü olarak kalsiyumun kullanılması konusunda literatür fikir birliği içindedir. Kalsiyumun kullanılmasının nedeni, başlangıçta antikoagülan amaçlı kullanılan sitratın görevini, pıhtılaşma mekanizmasında rol alan kalsiyumun inhibe etmesidir. Sonuçta, hazırlanan preparata kalsiyum eklenerek başlangıçtaki inhibisyon ortadan kaldırılmış olmaktadır.

TZP jeli hazırlığının son aşamasını, jelasyonu başlatacak ve trombositleri aktive edecek ajanın eklenmesi oluşturmaktadır. ITA jel ajanı, Tisseel fibrin, sığır kaynaklı trombin, hastanın kendi kanı ve otojen kemik bu amaçla kullanılan maddeleri oluştururken, literatürde en sık kullanılan ajanın sığır kaynaklı trombin olduğu göze çarpmaktadır. Sığır kaynaklı trombin kullanımının kan koagülopatilerine yol açabileceğini belirtilmiştir (Cmolik ve ark., 1993). TZP'nin kullanımında ve

yaygınlaşmasında büyük rolü bulunan Marx (2000), Landesberg'in makalesinde sözünü etmiş olduğu koagülopatilerin problem yaratmayacağını, bu vakalarda taze trombinin direkt olarak kanama bölgesinde kullanıldığını ve bu hastaların aktif antikoagülan tedavisi aldığını belirterek sığır trombininin güvenilirliğini savunmaktadır. Bununla beraber, hastanın kendi kanında ve kemiğinde trombin bulunması bu sorunu ortadan kaldırmaktadır ve hastanın kendi kanının kullanılabilceğini savunan yazarlar mevcuttur (Kassolis ve ark., 2000; Robiony ve ark., 2002; Gonshor, 2002). Su ve arkadaşları (2004) trombin ve insan kanı ile elde edilen TZP arasındaki farkları incelemişler ve TZP'nin son aşamada insan kanı ile karıştırılmasının pıhtılaşma zamanını 3 saniye daha kısalttığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda insan kanı ve trombin ile elde edilen TZP'den salınan PDGF-AB ve TGF- β 1 salınımını incelemişler ve insan kanı ile hazırlanan TZP'nin, PDGF-AB salınımını trombin ile hazırlanana göre 10 kat, TGF- β 1 salınımını ise 300 kat arttırdığını göstermişlerdir.

Bizim çalışmamızda jelasyonu sağlamak ve trombositleri aktive etmek amacıyla CaCl_2 'nin yanı sıra operasyon bölgesinden elde edilen otojen kan ve kemik kullanılmıştır. Hiçbir vakada jelleşme ile ilgili bir problem yaşanmamıştır.

TZP içinde bulunan trombositlerin α granüllerinde daha önceden sentezlenmiş büyüme faktörlerinin degranülasyonu ile TZP fonksiyon görmeye başlamaktadır. Bu büyüme faktörlerinin aktif olarak sekresyonu pıhtılaşmadan sonra 10 dakika içinde gerçekleşmektedir. Daha önceden sentezlenen büyüme faktörlerinin %95'i 1 saat içinde sekresyona uğrar. Bu nedenle TZP antikoagüle bir durumda oluşturulmalı ve operasyon bölgesinde pıhtı oluşumunu takiben 10 dakika içinde kullanılmalıdır. Antikoagüle kan kullanılmamış ve sonradan TZP'yi aktive etmek amacı ile pıhtılaştırılmış çalışmaların yanlış sonuçlar vereceği bildirilmiştir (Marx, 2004). Çalışmamızda, venöz kan alınmasını takiben laboratuvar koşullarında yaklaşık 45 dk.'da hazırlanan TZP, hazır olduğu andan itibaren 5 dakika içerisinde, standart 4x4 mm.lik fenestrasyon tipi defektlere tek başına veya otojen kemik grefti ile karıştırılarak uygulanmıştır.

Cerrahi işlemin her aşamasında standardizasyona dikkat edilmiştir. Fenestrasyon tipi defektler aynı cerrah tarafından standart olarak hazırlanmıştır. TZP'nin otojen kemik grefti ile karıştırılması aşamasında tüm deneklerde ve defektlerde TZP miktarının standardizasyonunu sağlamak amacı ile TZP ve otojen kemik grefti karışım oranları

aynı tutulmuştur. Köpekler, operasyon öncesi ve sonrası dönemlerde de standart besin ile beslenmişlerdir.

Marx 2004 yılındaki çalışmasında, TZP'nin bir kan pıhtısı olmasından dolayı bazı araştırmacıların enfeksiyona sebep olabileceği yönünde görüşlerine değinmiştir. Çünkü, bilindiği üzere kanlı agar mikrobiyolojik çalışmalarda besi yeri olarak kullanılmaktadır. Marx (2004), TZP'nin pıhtı ile benzer özellikleri barındırmasına rağmen, kan pıhtısının pH'sı 7–7,2 iken; TZP'nin 6,5–6,7 pH değerine sahip olmasının sanılanın aksine TZP'nin aslında bakteriyel gelişimi inhibe ettiğini bildirmiştir. Biz de TZP'nin hazırlanması ve kullanılması esnasında gerekli sterilizasyon kurallarına dikkat edildiği takdirde, herhangi bir enfeksiyon riski oluşturmayacağı düşüncesindeyiz. Çalıştığımız 6 köpekte yaptığımız 12 operasyon sonrasında TZP uyguladığımız defektlerin hiçbirinde enfeksiyon bulgusuna rastlanmamıştır.

Ayrıca bulaşıcı hastalık geçişi açısından da otojen bir preperasyon olduğu için TZP tamamen güvenilirdir, bu nedenle HIV, Hepatit, Cruetzfeld–Jacobs gibi hastalıkların geçişlerine sebep olmamakta ve immün reaksiyonlara yol açmamaktadır (Marx, 2004).

Marx ve ark (1998); olgun mezenşimal hücreler, osteoblastlar, fibroblastlar, endotelial hücreler ve epidermal hücrelerin TZP içerisindeki büyüme faktörlerine hücre membran reseptörlerini hızla ulaştırdıklarını bildirmişlerdir. Bu transmembran reseptörlerinin hücrel proliferasyon, matrix oluşumu, osteoid üretimi, kollajen sentezi gibi zincirleme olayların oluşumuna sebep olan endojen işaret proteininin aktivasyonunu indüklediklerini belirtmişlerdir. Bu mekanizmanın önemini şu şekilde açıklamışlardır. TZP hücre ve çekirdeğine girememektedir, mutajenik değildir; normal iyileşmeyi stimüle etmekte ve çok daha hızlı iyileşme sağlamaktadır (Marx, 2001; Schmitz ve ark., 2001).

Bariyer membranlar temel olarak rezorbe olanlar ve rezorbe olmayanlar olmak üzere ikiye ayrılırlar. Günümüzde rezorbe olmayan membran olarak en fazla, flurokarbon yapısında olan ePTFE kullanılmaktadır. ePTFE membranlar dışında rezorbe olmayan membranlara millipore, rubber-dam, resin-ionomer ve titanyum bariyerler örnek olarak gösterilebilir (Arpak ve ark., 2000). Millipore membran oldukça kırılğan ve uygulanmasının zor olması, rubber-dam bariyer ise yetersiz sertlik, manüplasyondaki zorluklar ve doku bütünlüğü oluşturamaması sebebiyle artık kullanılmamaktadırlar

(Zellin ve ark., 1995; Salama ve ark., 1994). Rezin-ionomer membranlar lokal iltihabi cevap oluşturması ve zor üretiliyor olmasından dolayı YDR'de kullanılmamaktadır (Wikesjö ve Selvig, 1999). Titanyum membranlar ise daha ziyade kret ogmentasyonlarında ve implantlar etrafındaki defektlerde kullanılmıştır ve halen kullanılmaktadırlar.(Liu ve ark., 2006)

Çalışmamızda kontrol defektleri de dahil olmak üzere tüm defektlerin üzeri membran ailesi içinde altın standart olarak yerini almış olan ePTFE esaslı bir bariyer membran olan Cytoflex® (Unicare Biomedical, A.B.D) membran kullanılmıştır. Bu sayede epitel ve bağ dokusu hücrelerinin yara bölgesine göçünün engellendiği ve sadece defektlere yerleştirilen biyomateryallerin etkilerinin değerlendirilebileceği bir ortam yaratılmıştır. Bu membranın kullanılmasına bağlı olarak bariyer membranın ameliyat sonrası iyileşme döneminde açağa çıkması da dahil herhangi bir komplikasyon gözlenmemiştir. Bu tip çalışmalarda ePTFE esaslı rezorbe olmayan bariyer membranların kullanılması gerektiği düşüncesindeyiz. Bu sayede hem erken rezorbsiyon riski olmadığı için membranın fonksiyon süresi kontrol altında tutulabilmektedir hem de membran kullanımına karşı gelişebilen hastalık geçişi, lokal iltihabi cevap oluşumu gibi riskler ortadan kalkmaktadır.

Literatür incelendiğinde rejeneratif tedavilerde sadece TZP yerleştirilen çalışmaların sınırlı olduğu göze çarpmaktadır. TZP'nin tek başına kullanıldığı çalışmalarda kesin bir yargıya varmak mümkün değildir. Anitua (1999) TZP'nin çekim boşluklarına yerleştirildiğinde epitelizasyonu ve kemik densitesini artırdığını bildirmiştir. Benzer şekilde Mancuso ve ark. TZP'nin yirmi yaş dişi çekim boşluğuna yerleştirildiğinde daha az ağrıya ve daha dens kemik oluşumuna neden olduğunu göstermiştir (2003). Sammartino ve ark. (2005) alt çene 2. molar dişin distalinde en az 7.5 mm cep derinliğine sahip periodontal defektlerde 3. molar diş çekimi sonucu TZP uygulanan grupta istatistiksel olarak anlamlı seviyede cep derinliğinde azalma ve daha hızlı kemik oluşumu gözlendiğini bildirmişlerdir. Zechner ve ark. (2003) ve Schlegel ve ark.'nın (2003) yaptıkları iki ayrı çalışmada ise, TZP'nin implantlarda hafif derecede osteointegrasyonu artırdığı gözlenmiştir. Fakat Farrell ve ark. (2002), TZP'nin köpeklerdeki mandibular defektlerde uygulandığında tek başına olumlu bir etki yapmadığını bildirmişlerdir. Yine Aghaloo ve ark. (2002), tavşanların kafatasında oluşturulan defektlerde TZP'li gruptan elde edilen sonuçların, kontrol (boş) grubundan

edilenlere göre bir farkı olmadığını göstermişlerdir. Fakat Aghaloo ve ark.'nın çalışması incelediğinde, TZP içindeki trombosit sayısının 7.29 kat arttığı görülmektedir ki, bu da Weibrich ve ark.'nın belirttiği optimal trombosit konsantrasyonunun üzerinde bir değerdir (2004). Weibrich ve ark. optimal düzeyin üzerine çıktığında TZP'nin etkisinin olmayacağını, hatta inhibitör etkisinin olacağını bildirmişlerdir. Ayrıca çalışmada TZP hazırlanması esnasında ikinci satrifüjde 863 g kuvvet uygulandığı dikkati çekmektedir. Dugrillon ve ark. (2002) bu değer 800 g nin üzerine geçtiği durumlarda büyüme faktörü miktarının azaldığını göstermişlerdir. Çalışmamızda, aynı zaman aralığında, sadece TZP yerleştirilen defektlerde kontrol grubuna göre daha fazla kemik oluştuğu gösterilmiştir. Yukarıda bahsedilen Aghaloo ve ark.'nın (tarih) çalışmasından farklı sonuçlara ulaşmamızın sebebi trombosit konsantrasyonu ve uygulanan g kuvveti ile alakalı olabilir. Çalışmamızda Weibrich ve ark. (2004) ile Dugrillon ve ark.'nın (2002) ön gördüğü değerler kullanılmıştır.

Çalışmamızın bulguları kontrol defektinin 12. haftada ulaştığı kemik dolum oranına sadece TZP yerleştirilen grubun 8. haftada ulaştığını göstermiştir. Bu da TZP'nin erken dönemde daha hızlı kemik oluşumuna neden olduğunu düşündürmektedir. Fakat, 12. haftalık sonuçlar karşılaştırıldığında TZP ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın kalmadığı gözlenmiştir. Bu durum uzun dönem değerlendirmeler söz konusu olduğunda belki bir avantaj sağlamayacaktır fakat, özellikle yerleştirilmeleri esnasında etrafında kemik defekti bulunan implantlarda membran uygulamasına ilave olarak kullanılacak TZP, erken dönemde hızlı kemik oluşumuna neden olarak erken yükleme için pozitif bir durum yaratabilecektir. Konu ile ilgili çalışmalar değerlendirildiğinde trombositlerin yaşam sürelerinin kısa olmasına bağlı olarak TZP'nin de etkinliğinin uzun sürmeyeceği yönünde görüşler vardır (Choi ve ark. 2004). Fakat Marx (2004) TZP oluşumunu takiben, trombositlerin büyüme faktörlerinin sekresyonu sonrasında da büyüme faktörlerini sentezlemeye devam ettiğini bildirmiştir. Trombositlerin yaşam süresi dolduktan sonra da kendileri tarafından stimule edilen makrofajların bölgede büyüme faktörü salınımına devam ettiğini de ayrıca belirtmiştir. Böylece, yara yerinde bulunan trombosit sayısının fazla olması ve aktive edilen bölgeye gelen makrofaj sayısının da artması sonucu iyileşmenin daha hızlı gerçekleşmesini beklemek mantıklı bir yaklaşımdır. Bütün bu bilgiler gözönünde bulundurulduğunda, TZP'nin zamanla

etkisinin azaldığı yorumu yerine bağ dokusu ve epiteli defekt bölgesinden uzak tutmak amacıyla yerleştirilen bariyer membranın kendinden beklenen etkileri yerine getirerek 12.haftada TZP ile eşit oranda yeni kemik oluşumu sağladığı şeklinde bir açıklamak daha doğru olabilir.

Çalışmamızda TZP, otojen kemik grefti ile karıştırılmak suretiyle de defektlere uygulanıp, iki materyalin sinerjistik olarak etki edip etmediği de araştırılmıştır. Her ne kadar TZP ve otojen kemik greftinin karıştırılarak kullanıldığı gruptaki defektlerde trabeküler kemik alanı yüzdesi sadece otojen kemik greftinin uygulandığı gruptaki defektlere göre daha fazla görünse de bu değerler istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamızın sonuçları aynı zamanda otojen kemik grefti ile birlikte kullanılan TZP'nin defektlerde kemik dolum hızını artırmadığını da göstermiştir.

TZP–kemik grefti kombinasyonunun kemik rejenerasyonunu arttırdığını gösteren çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen (Camargo ve ark., 2002; Kassolis ve ark., 2000; Kim ve ark., 2001; Kim ve ark., 2002; Marx ve ark. 1998), bizim çalışmamızın bulgularının da doğruladığı üzere, bunun tersinin savunulduğu çalışmalar da literatürde dikkat çekmektedir (Furst ve ark., 2003; Shanaman ve ark., 2001; Wiltfang ve ark. 2004):

Furst ve ark. (2003), TZP ve sığır kaynaklı hidroksiapatit kemik greftini domuzlarda sinüs yükseltme operasyonlarında kullanmışlar ve yapılan histolojik incelemelerde TZP'nin kemik grefti ile karıştırılmasının materyale ek bir avantaj getirmediğini vurgulamışlardır. Shanaman ve ark. (2001) yayınladıkları vaka serilerinde ise TZP ile insan kaynaklı DFDBA'yı karıştırarak kret ogmentasyonu operasyonlarında uygulamış ve yapılan klinik ve radyolojik tetkikler sonucu TZP ile DFDBA kombinasyonunun kemik kalitesini veya miktarını değiştirmedeğini bildirmişlerdir. TZP'nin trikalsiyum fosfat esaslı kemik grefti, sığır kaynaklı kemik grefti ve otojen kemik ile karıştırıldığı bir başka çalışmada ise TZP'nin trikalsiyum fosfat ve sığır kaynaklı kemik greftlerinin rezorbsiyonuna veya kemik yapımına herhangi bir katkısının olmadığı gösterilmiştir. Bununla birlikte, TZP'nin otojen kemik grefti ile karıştırılması yalnızca 2. hafta incelemelerinde diğer greftler ile olan kombinasyonuna göre üstünlük sağlamıştır (Wiltfang ve ark., 2004).

Gruplar arasında sement alanı ortalamaları karşılaştırıldığında 4. hafta değerleri arasında kontrol ve TZP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

bulunamamıştır. Bu da TZP içindeki büyüme ve farklılaşma faktörlerinin oluşan sement miktarında bir fark yaratmadığını düşündürmektedir. Fakat otojen kemik greftinin tek başına ve TZP ile birlikte uygulandığı gruptaki sement alanı yüzdesindeki artış kontrol defektine göre istatistiksel olarak anlamlıdır. Elde edilen bu sonuçtan otojen kemik grefti uygulamasının erken dönemde sementogenezisi artırdığı şeklinde yorum yapmak mümkündür. Fenestrasyon tipi defekt modelinin kullanıldığı köpek çalışmaları incelendiğinde sement oluşumunun en erken 2. haftada gözlemlendiği bildirilmiştir (Selvig ve ark., 1996). Çalışmamızda 4. haftada daha ince olarak gözlenen sement kalınlığının 8. ve 12. haftalarda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlenmiş, fakat 8. ve 12. haftalar arasında bir fark bulunamamıştır. İncelenen bazı kesitlerin yüzeyi üzerinde düzensizlikler gözlenmiştir. Bunlar kök rezorpsiyonuna bağlı olabileceği gibi cerrahi esnasında kullandığımız aletler veya frezler sonucu da oluşmuş olabilir. Nalbandian & Frank (1980) çalışmalarında bu olasılıktan bahsetmişlerdir. Melcher (1976) yaptığı çalışmada ortamdaki kollajenazın da kök yüzeyindeki kollajenöz yapıyı bozarak düzensizliklerin gözlenmesine yol açabileceğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da ender olarak gözlenen düzensizliklerin bu sebeplerin herhangi birinden kaynaklanmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Modern stereolojik yöntemlerin son 20 yıl içindeki hızlı ilerleyişi, değişik ihtiyaçlara yönelik yeni yöntemlerin ortaya çıkmasına ve bu yöntemlerin morfometrik çalışmalarda aranan standartlar haline gelmesine neden olmuştur. Modern stereolojik yöntemler tarafsızlık ve etkinlik gibi özellikleri nedeniyle morfometrik araştırmalarda merkezi bir konuma yerleşmektedirler. Niceliksel verilerle ilgili araştırmaların yayımlandığı, etki faktörü yüksek pek çok uluslararası bilimsel dergi kendilerine sunulan çalışmalarda stereolojik yöntemleri bir standart olarak aramakta veya başka yöntemlerin kullanılması durumunda, kullanılan yöntemin matematiksel ve teorik olarak doğrulanmasını istemektedir. Stereolojik yöntemlerin büyük bir kısmının kolayca anlaşılması ve uygulanabilmesi, bu yöntemleri daha da çekici hale getirmektedir. Araştırma laboratuvarlarında işleri hızlandırmak amacıyla tasarlanmış bilgisayar destekli stereolojik analiz cihazlarının sayısı her geçen gün artmakla birlikte, stereolojik yöntemlerin çoğu basit araç gereçler ve düşük maliyetlerle gerçekleştirilebilmektedir. Bu nedenle, sınırlı miktarda mali kaynak ayrılabilen büyük işgücü ve emek harcanarak gerçekleştirilen çalışmaların bilimsel açıdan anlamlı ve dünya literatüründe kabul

edilebilir düzeyde olabilmeleri için, geçerli ve uygun bir yöntem biliminin takip edilmesi kaçınılmazdır. Stereoloji bilimi, morfometrik çalışmalar için "altın standart" konumunda bulunmakta ve yapılan çalışmaların maliyetini azaltarak elde edilen verilerin güvenilirliğini de büyük ölçüde artırmaktadır (Ünal ve ark., 2002). Çalışmamızda kullandığımız stereolojik metot ile inceleme sonucunda ilgilendiğimiz dokunun miktarına ait elde edilen sayısal veriler tekrarlanabilir olduğundan, değerlendirme kişisel farklılıklardan etkilenmediğinden ve sayımın objektif kuralları içermesinden dolayı stereolojik inceleme metodu güvenilir sonuçlar vermektedir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1- TZP çalışmaları köpek modelinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir. Operasyon sonrasında köpeklerin hiçbirinde gelişen bir komplikasyon gözlenmemiştir. Kan alımı kolaydır ve TZP hazırlanması için gerekli kan miktarı elde edilebilmektedir.

2- Fenestrasyon tipi defekt modeli köpeklerde kanin dişler dışında da kullanılabilir.

3- TZP kemik grefti ile beraber kullanıldığında TZP'nin adeziv özelliğinden dolayı grefti uygulama işlemi kolaylaşmaktadır.

4- Kontrol grubunda 12. haftada ulaşılan trabeküler kemik oranına TZP yerleştirilen grupta 8. haftada ulaşılmıştır. TZP tek başına kullanıldığında boş defekte göre daha hızlı kemik oluşumuna neden olabilir.

5- Otojen kemiğe TZP ilavesi otojen kemiğin tek başına kullanılmasına göre ilave fayda sağlamamaktadır.

6- TZP'nin tek başına kullanıldığında erken dönemde trabeküler kemik alanı için sağladığı olumlu etki sement oluşumunda gözlenmemiştir.

7- İyileşmenin daha erken ve kısa aralıklarla incelendiği hayvan çalışmalarına ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

- Aichelmann-Reidy, M.E., Yukna, R.A. (1998). Bone replacement grafts. The bone substitutes. *Dental Clinics of North America*, **42**, 491-503.
- Aghaloo, T.L., Moy, P.K., Freymiller, E.G. (2002). Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **60**, 1176-1181.
- Alkan, A., Keskiner, I. Bone Swagging Revisited:A Modification of the Technique. (2006). *Clinical Periodontal Investigations*, **2**(no. 1),Jan 1.
- Altmeppen, J., Hansen, E., Bonnländer, G.L., Horch, R.E., Jeschke, M.G.(2004). Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *The Journal of Surgical Research*, **117**, 202-207.
- Andrew, J.G., Hoyland, J.A., Freemont, A.J., Marsh, D.R. (1995). Platelet-derived growth factor expression in normally healing human fractures. *Bone*, Apr, **16**(4), 455-460.
- Anitua, E. (1999). Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, **14**, 529-535.
- Arpak, M.N., Eskitaşoğlu, A., Kirişçi, N., Can, C. (1996). Histological evaluation of porous hydroxylapatite and guided tissue regeneration in a biologically closed model. *Türkiye Klinikleri Dişhekimliği Bilimleri Dergisi*, **2**,74-78.
- Arpak, M.N., Kirişçi, N., Can, C. (1997). Mercan kaynaklı biyomateryal Biocoral'in periodontal dokularla ilişkisinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi. *Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **7**(1), 21-24.
- Arpak, M.N., Alkan, A., Nergiz, I. (2000). A case of localized ridge augmentation from using a titanium membrane: a pilot study. *Journal of Oral Sciences*, **42**(3),133-138.
- Aukhil, I., Pettersson, E., Suggs, C. (1986). Guided tissue regeneration. An experimental procedure in beagle dogs. *Journal of Periodontology*, **57**, 727-734.
- Aukhil, I. (2000). Biology of wound healing. *Periodontology 2000*, **22**, 44-50.
- Axhausen, W. (1956). The osteogenetic phases of regeneration of bone; a historial and experimental study. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, **38**, 593-600.
- Bartold, P.M., Narayanan, A.S., Page, R.C. (1992). Platelet-derived growth factor reduces the inhibitory effects of lipopolysaccharide on gingival fibroblast proliferation. *Journal of Periodontal Research*, **27**, 499-505.

- Becker, J.C., Beckbauer, M., Domschke, W., Herbst, H., Pohle, T. (2005). Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointestinal Endoscopy*, **61(4)**, 560-566,
- Bhanot, S., Alex, J.C. (2002). Current applications of platelet gels in facial plastic surgery. *Facial Plastic Surgery*, **18(1)**, 27-33. Review.
- Bolander, M.E.(1992). Regulation of fracture repair by growth factors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, **200(2)**, 165-170.
- Brown, G.L., Curtsinger, L.J., White, M., Mitchell, R.O., Pietsch, J., Nordquist, R., von Fraunhofer, A., Schultz, G.S. (1988). Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β . *Annals of Surgery*, **208**, 788-794,
- Buck, B.E., Resnick, L., Shah, S.M., Malinin, T.I. (1990). Human immunodeficiency virus cultered from bone. Implications for transplantation. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **(251)**, 249-253.
- Butterfield, K.J., Bennett, J., Gronowicz, G., Adams, D. (2005). Effect of platelet-rich plasma with autogenous bone graft for maxillary sinus augmentation in a rabbit model. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **63**,370-376.
- Camargo, P.M., Lekovic, V., Weinlaender, M., Vasilic, N., Madzarevic, M., Kenney, E.B. (2002). Platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral combined with guided tissue regeneration in the treatment of intrabony defects in humans. *Journal of Periodontal Research*, **37**, 300-306.
- Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., Rydziel, S., Varghese, S. (1993). Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures. *Endocrinology*, **133(1)**, 33- 38.
- Canalis, E., McCarthy, T., Centrella, M. (1988). Isolation of growth factors from adult bovine bone. *Calcified Tissue Intentional*, **43(6)**, 346-351.
- Canan, S., Şahin, B., Odacı, E., Ünal, B., Aslan, H., Bilgiç, S., Kaplan, S. (2002). Toplam hacim, hacim yoğunluğu ve hacim oranlarının hesaplanmasında kullanılan bir stereolojik yöntem: Cavalieri Prensibi. *Turkish Clinical Medical Science*, **22**,7-14.
- Caplanis, N., Lee, M.B., Zimmerman, G.J., Selvig, K.A., Wikesjö, U.M. (1998). Effect of allogeneic freeze-dried demineralized bone matrix on regeneration of alveolar bone and periodontal attachment in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, **25(10)**, 801-806.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*, **6(3)**, 389-395

- Carranza, F.A., McClain, P., Schallhorn, R. (2002). Regenerative osseous surgery. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA *Carranza's Clinical Periodontology*. **9th ed.** Philadelphia: WB Saunders.: 804-824.
- Caton, J.G., DeFuria, E.L., Polson, A.M., Nyman, S (1987). Periodontal regeneration via selective cell repopulation. *Journal of Periodontology*, **58(8)**, 546-552.
- Centrella, M., McCarthy, T.L., Kusmik, W.F., Canalis, E. (1991). Relative binding and biochemical effects of heterodimeric and homodimeric isoforms of platelet-derived growth factor in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Journal of Cellular Physiology*, **147(3)**, 420-426.
- Choi, B.H., Im, C.J., Huh, J.Y., Suh, J.J., Lee, S.H. (2004). Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **33(1)**, 56-59.
- Choi, S.Y., Nilveus, R.E., Minutello, R.D., Zimmerman, G.J., Wikesjö, U.M. (1993). Effect of a collagen matrix on healing in periodontal fenestration defects in dogs. *Journal of Periodontology*, **64(9)**, 878-882.
- Claffey, N., Motsinger, S., Ambruster, J., Egelberg, J. (1989). Placement of a porous membrane underneath the mucoperiosteal flap and its effect on periodontal wound healing in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, **16(1)**, 12-16.
- Cmolik, B.L., Spero, J.A., Magovern, G.J., Clark, R.E. (1993). Redo cardiac surgery: late bleeding complications from topical thrombin-induced factor V efficiency. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, **105(2)**, 222-227.
- Cochran, D.L., Wozney, J.M. (1999). Biological mediators for periodontal regeneration. *Periodontology 2000*, **19**, 40-58.
- Colville-Nash, P.R., Willoughby, D.A. (1997). Growth factors in angiogenesis: current interest and therapeutic potential. *Molecular Medicine Today*, **3**, 14-23.
- Cortellini, P., Pini Prato, G., Tonetti, M.S. (1993a). Periodontal regeneration of human infrabony defects. I. Clinical measures. *Journal of Periodontology*, **64**, 254-260.
- Cortellini, P., Pini Prato, G., Tonetti, M.S. (1993b). Periodontal regeneration of human infrabony defects. II. Re-entry procedures and bone measures. *Journal of Periodontology*, **64**, 261-268.
- Cortellini, P., Clauser, C., Prato, G.P. (1993c). Histologic assessment of new attachment following the treatment of a human buccal recession by means of a guided tissue regeneration procedure. *Journal of Periodontology*, **64**, 387-391
- Cortellini, P., Pini-Prato, G., Tonetti, M.S. (1994). Periodontal regeneration of human infrabony defects (V). Effect of oral hygiene on long-term stability. *Journal of Clinical Periodontology*, **21**, 606-610.

- Cortellini, P., Tonetti, M.S. (2000). Focus on intrabony defects: guided tissue regeneration. *Periodontology 2000*, **22**, 104-132.
- Cruz-Orive, L.M., Weibel, E.R. (1990). Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Lung. Cellular and Molecular Physiology*, **2**, 148-156.
- Currie, L.J., Sharpe, J.R., Martin, R. (2001). The use of fibrin glue in skin grafts and tissueengineered replacements: A Review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **108(6)**, 1713-1726,
- Daughaday, W.H., Rotwein, P. (1989). Insulin-like growth factors I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissue concentrations. *Endocrine Reviews*, **10(1)**, 68-91.
- Distler, O., Neidhart, M., Gay, R.E., Gay, S. (2002). The molecular control of angiogenesis. *International Reviews of Immunology*, **21**, 33-49.
- Dragoo, M.R., Sullivan, H.C. (1973). A clinical and histological evaluation of autogenous iliac bone grafts in humans. II. External root resorption. *Journal of Periodontology*, **44(10)**, 614-625.
- Dugrillon, A., Eichler, H., Kern, S., Klüter H. (2002). Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **31**, 615-619.
- Ellegaard, B., Loe, H. (1971). New attachment of periodontal tissues after treatment of intrabony lesions. *Journal of Periodontology*, **42(10)**, 648-652.
- Farrell B., Block, M.S., Boudrwaux, D. (2002). Effect of PRP with and without membranes on bone defect healing. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **60**, 38.
- Fennis, J.P., Stoelinga, P.J., Jansen, J.A. (2004). Mandibular reconstruction: a histological and histomorphometric study on the use of autogenous scaffolds, particulate cortico-cancellous bone grafts and platelet rich plasma in goats. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **33**, 48-55.
- Ferreira, C.F., Carriel, Gomes, M.C., Filho, J.S., Granjeiro, J.M., Oliveira, Simoes, C.M., Magini, R.S. (2005). Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth: *Clinical Oral Implants Research*, **16**, 456-460
- Frank, J., Carroll, C.M., Aaranson, K., Ogden, L., Kim, M., Anderson, G.L., Swietzer, L., Bond, S.J., Uhl, E., Barker, J.H. (1996). Ischemia increases the angiogenic potency of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Microsurgery*, **17(8)**, 452-456.

- Froum, S.J., Weinberg, M.A., Tarnow, D. (1998). Comparison of bioactive glass synthetic bone graft particles and open debridement in the treatment of human periodontal defects. A clinical study. *Journal of Periodontology*, **69**, 698-709.
- Furst, G., Gruber, R., Tangl, S., Zechner, W., Haas, R., Mailath, G., Sanroman, F., Watzek, G. (2003). Sinus grafting with autogenous platelet-rich plasma and bovine hydroxyapatite. A histomorphometric study in minipigs. *Clinical Oral Implants Research*, **14**(4), 500-508.
- Gao, J., Symons, A.L., Bartold, P.M. (1998). Expression of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in the developing periodontium of rats. *Journal of Dental Research*, **77**, 1708-1716.
- Giannobile, W.V. (1996). Periodontal tissue engineering by growth factors. *Bone*, **19**, 23-37.
- Giannobile, W.V., Hernandez, R.A., Finkelman, R.D., Ryan, S., Kiritsy, C.P., D'Andrea, M., Lynch, S.E. (1996). Comparative effects of platelet-derived growth factor-BB and insulin-like growth factor-I, individually and in combination, on periodontal regeneration in *Macaca fascicularis*. *Journal of Periodontal Research*, **31**(5), 301-312.
- Gonshor, A. (2002). Technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate: background and process. *International Journal of Periodontics Restorative Dentistry*, **22**(6)547-557.
- Grageda, E., Lozada, J.L., Boyne, P.J., Caplanis, N., Mcmillan, P.J. (2005). Bone Formation in the Maxillary Sinus by Using Platelet-Rich Plasma: An Experimental Study in Sheep. *Journal of Oral Implantology*, **31**(1), 2 -17.
- Graves, D.T., Valentin-Opran, A., Delgado, R., Valente, A.J., Mundy, G., Piche, J. (1989). The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connective Tissue Research*, **23**(2-3), 209-218.
- Grotendorst, G.R., Martin, G.R., Pencev, D., Sodek, J., Harvey, A.K. (1985). Stimulation of granulation tissue formation by Platelet-derived Growth Factor in normal and diabetic rats. *Journal of Clinical Investigations*, **76**, 2323-2329,
- Grzesik, W.J., Narayanan, A.S. (2002). Cementum and periodontal wound healing and regeneration. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, **13**, 474-84.
- Gundersen, H.J.G. (1986). Stereology of arbitrary particles. A review of Unbiased number and size estimators and the presentation of some new ones in memory of William R Thomson. *Journal of Microscopy*, **143**, 3-45.
- Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B. (1987). The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *Journal of Microscopy*, **147**, 229-263.

- Gundersen, H.J.G., Bendtsen, T.F., Korbo, L., Marcussen, N., Muller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J. (1988a). Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, **96**, 379-394.
- Gundersen, H.J.G., Bagger, P., Bendtsen, T.F., Evans, S.M., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J.R., Pakkenberg, B., Sorensen, F.B., Vesterby, A., West, M.J. (1988b). The new stereological tools: Disector, fractionator, nucleator, and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *Acta Pathologica, Microbiologica, Et Immunologica Scandinavica*, **96**, 857-81.
- Gundersen, H.J.G., Jensen, E.B.V., Kieu, K., Nielsen, J. (1999). The efficiency of systematic sampling in stereology-reconsidered. *Journal of Microscopy*, **193**: 199-211.
- Hauschka, P.V., Mavrakos, A.E., Iafrati, M.D., Doleman, S.E., Klagsbrun, M. (1986). Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. *The Journal of Biological Chemistry*, **261(27)**:12665-12674.
- Helder, M.N., Karg, H., Bervoets, T.J., Vukicevic, S., Burger, E.H., D'Souza, R.N., Woltgens, J.H., Karsenty, G., Bronckers, A.L. (1998). Bone morphogenetic protein-7 (osteogenic protein-1, OP-1) and tooth development. *Journal of Dental Research*, **77**, 545-554.
- Hiatt, W.H., Schallhorn, R.G. (1973). Intraoral transplants of cancellous bone and marrow in periodontal lesions. *Journal of Periodontology*, **44(4)**, 194-208.
- Hiatt, W.H., Schallhorn, R.G. (1971). Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects. I. Rationale and methodology. *Journal of Periodontology*, **42(10)**, 642-647.
- Howard, C.V., Reed, M.G. (1998). Unbiased Stereology: Three dimensional measurement in microscopy, Oxford. *Bios Scientific Publishers*.
- Howell, T.H., Fiorellini, J.P., Paquette, D.W., Offenbacher, S., Giannobile, W.V., Lynch, S.E. (1997). Phase I/II clinical trial to evaluate a combination of recombinant human platelet-derived growth factor-BB and recombinant human insulin-like growth factor-I in patients with periodontal disease. *Journal of Periodontology*, **68(12)**, 1186-1193.
- Ivanovski, S., Li, H., Haase, H.R., Bartold, P.M. (1997). Expression of bone associated macromolecules by gingival and periodontal ligament fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, **36**, 131-141.

- Jakse, N., Tangl, S., Gilli, R., Berghold, A., Lorenzoni, M., Eskici, A., Haas, R., Pertl, C. (2003). Influence of PRP on autogenous sinus grafts. An experimental study on sheep. *Clinical Oral Implants Research*, **14**, 578-583.
- Kano, T., Takahashi, T., Tsujisawa, T., Ariyoshi, W., Nishihara, T. (2005). Platelet Rich Plasma Enhances Human Osteoblast-Like Cell Proliferation and Differentiation; *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **63**, 362-369.
- Kaplan, S., Canan, S., Aslan, H., Unal, B., Sahin, B. (2001). A simple technique to measure the movements of the microscope stage along the x and y axes for stereological methods. *Journal of Microscopy*, **203**, 321-325.
- Kaplan, S., Gökyar, A., Ünal, B., Turkkani-Tunç, A., Bahadir, A., Aslan, H. (2005). A simple technique for localizing consecutive fields for disector pairs in light microscopy: application to neuron counting in rabbit spinal cord following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Methods*, **145**, 277-284.
- Karring, T., Nyman, S., Gottlow, J., Laurell, L. (1993). Development of the biological concept of guided tissue regeneration--animal and human studies. *Periodontology* 2000, **1**, 26-35.
- Kassolis, J.D., Rosen, P.S., Reynolds, M.A. (2000). Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *Journal of Periodontology*, **71(10)**, 1654-1661.
- Kawase, T., Okuda, K., Wolff, L.F., Yoshie, H. (2003), Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *Journal of Periodontology*, **74(6)**, 858-864.
- Khouri, R.K., Brown, D.M., Leal-Khouri, S.M., Tark, K.C., Shaw, W.W. (1991). The effect of basic Fibroblast Growth Factor on the neovascularization process: skin flap survival and staged flap transfers. *British Journal of Plastic Surgery*, **44**, 585-588.
- Kim, S.G., Chung, C.H., Kim, Y.K., Park, J.C., Lim, S.C. (2002). Use of particulate dentin-plaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, **17(1)**, 86-94.
- King, G.N., Cochran, D.L. (2002). Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *Journal of Periodontology*, **73**, 925-936.
- Klagsbrun, M., D'amore, P.A. (1991). Regulators of angiogenesis. *Annual Reviews of Physiology*, **53**, 217- 239,
- Klongnoi, B., Rupprecht, S., Kessler, P., Thorwarth, M., Wiltfang, J., Schlegel, K.A. (2006). Influence of platelet-rich plasma on a bioglass and autogenous bone in

- sinus augmentation. An explorative study. *Clinical Oral Implants Research*, **17**, 312-320.
- Kostopoulos, L., Karring, T. (2004). Susceptibility of GTR-regenerated periodontal attachment to ligature-induced periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, **31**, 336-340.
- Kovacs, K., Velich, N., Huszar, T., Fenyves, B., Suba, Z., Szabo, G. (2005). Histomorphometric and densitometric evaluation of the effects of platelet-rich plasma on the remodeling of beta-tricalcium phosphate in beagle dogs. *Journal of Craniofacial Surgery*, **16(1)**, 150-154.
- Ksander, G.A., Sawamura, S.J., Ogawa, Y., Sundsmo, J., McPherson, J.M. (1990). The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **22(5)**, 781-791.
- Landesberg, R., Roy, M., Glickman, R.S. (2000). Quantification of growth factor evels using a simplified method of platelet-rich plasma gel reparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **58**, 297-300.
- Lekovic, V., Camargo, P.M., Weinlaender, M., Vasilic, N., Aleksic, Z., Kenney, E.B. (2003). Effectiveness of a combination of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral and guided tissue regeneration in the treatment of mandibular grade II molar furcations in humans. *Journal of Clinical Periodontology*, **30**, 746-751.
- Lekovic, V., Camargo, P.M., Weinlaender, M., Vasilic, N., Kenney, E.B. (2002). Comparison of platelet-rich plasma, bovine porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects: a reentry study. *Journal of Periodontology*, **73**, 198-205.
- Liu, Y.M., Chen, G.F., Yan, J.L., Zhao, S.F., Zhang, W.M., Zhao, S., Chen, L. (2006). Functional reconstruction of maxilla with pedicled buccal fat pad flap, prefabricated titanium mesh and autologous bone grafts. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **35**, 1108-1113.
- Lovelace, T.B., Mellonig, J.T., Meffert, R.M., Jones, A.A., Nummikoski, P.V., Cochran, D.L. (1998). Clinical evaluation of bioactive glass in the treatment of periodontal osseous defects in humans. *Journal of Periodontology*, **69**, 1027-1035.
- Lynch, S.E., Ruiz de Castilla, G., Williams, R.C., Kiritsy, C.P., Howell, T.H., Reddy, M.S., Antoniades, H.N. (1991a). The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *Journal of Periodontology*, **62**, 458-467.
- Lynch, S.E., Buser, D., Hernandez, R.A., Weber, H.P., Stich, H., Fox, C.H., Williams, R.C. (1991b). Effects of the platelet-derived growth factor/insulin-like growth

- factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *Journal of Periodontology*, **62**, 710-716.
- Lynch S.E, Genco R.J, Marx R.E: Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: *Tissue Engineering, Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Ed: Carol Stream, Quintessence Publishing Co, Illinois, 1999:71-83.
- Machens, H.G., Salehi, J., Weich, H., Münch, S., Siemers, F., Krapohl, B.D., Herter, K.H., Krüger, S., Reichert, B., Berger, A., Vogt, P., Mailänder, P. (2003). Angiogenic effects of injected VEGF165 and sVEGF-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *The Journal of Surgical Research*, **111**, 136-142.
- MacNeil, R.L., Somerman, M.J. (1993). Molecular factors regulating development and regeneration of cementum. *Journal of Periodontal Research*, **28**, 550-559.
- Magnusson, I., Nyman, S., Karring, T., Egelberg, J. (1985). Connective tissue attachment formation following exclusion of gingival connectivetissue and epithelium during healing. *Journal of Periodontal Research*, **20**:201-208.
- Mancuso, J.D., Bennion, J.W., Hull, M.J. (2003). Platelet-rich Plasma: A preliminary report in routine impacted mandibular third molar surgery and the prevention of alveolar osteitis. *Journal of Oral andMaxillofacial Surgery*, **61**:40 (suppl).
- Marx, R.E. (1994). Clinical application of bone biology to mandibular and maxillary reconstruction. *Clinics in Plastic Surgery*, **21**(3), 377-392.
- Marx, R.E., Carlson, E.R., Eichstaedt, R.M., Schimmele, S.R., Strauss, J.E., Georgeff, K.R. (1998). Platelet-rich plasma: growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, **85**, 638-646.
- Marx, R.E. (2000). Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **58**, 300-301.
- Marx, R.E. (2004). Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **62**, 489-496.
- Matsuda, N., Lin, W.L., Kumar, N.M., Cho, M.I., Genco, R.J. (1992). Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *Journal of Periodontology*, **63**, 515–525.
- Matras, H. (1985). Fibrin seal: The state of the art. *Journal of Oral Maxillofacial Surgery*, **43**, 605-611.

- Mayhew, T.M., Gundersen, H.J.G. (1996). If you assume. you can make an ass out of you and me: A decade of the disector for stereological counting of particles in 3D space. *Journal of Anatomy*, **188**,1-15.
- Mayhew T.M. (1992). A review of recent advances in stereology for quantifying neural structure. *Journal of Neurocytology*, **21**, 313-328.
- McAllister, B.S., Haghghat, K. (2007). Bone augmentation techniques. *Journal of Periodontology*, **78**, 377-396.
- McCarthy, T.L., Centerlla, M. (1989). Regulatory effects of insulin-like growth factor-I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology*. **124**, 301-309.
- McCauley, L.K., Somerman, M.J. (1998). Biologic modifiers in periodontal regeneration. *Dental Clinics of North America*. **42**, 361-387.
- Melcher, A.H. (1976). On the repair potential of periodontal tissues. *Journal of Periodontology*, **47**, 256-260.
- Miki, Y., Narayanan, A.S., Page, R.C. (1987). Mitogenic activity of cementum components to gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research*, **66**, 1399-1403.
- Misch, C.M., Misch, C.E. (1999). Intraoral autogenous donor bone grafts for implant dentistry, 'Contemporary Implant Dentistry' (Ed. Penny Rudolph)'de, **2. baskı**, MosbyMissouri., s. 497-508.
- Misch C.E, Misch F.D, Misch C.M. (1999). Extraoral autogenous donor bone grafts for endosteal implants, 'Contemporary Implant Dentistry' (Ed. Penny Rudolph)'de, **2. baskı**, Mosby, Missouri., s. 521-538.
- Mohan, S., Baylink, D.J. (1991). Bone growth factors. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, **263**, 30-48.
- Nalbandian, J., Frank, R.M. (1980). Electron microscopic study of the regeneration of cementum and periodontal connective tissue attachment in the cat. *Journal of Periodontal Research*, **15**, 71-89.
- Nall, A.V., Brownlee, R.E., Colvin, C.P., Schultz, G., Fein, D., Cassisi, N.J., Nguyen, T., Karla, A. (1996). Transforming Growth Factor- β 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Archives of Otolaryngology, Head and Neck Surgery*, **122**, 171-177.
- Nasr, H.F, Aichelmann-Reidy, M.E., Yukna, R.A. (1999). Bone and bone substitutes. *Periodontology 2000*, **19**, 74-86.

- Nyman, S., Gottlow, J., Karring, T., Lindhe, J. (1982). The regenerative potential of the periodontal ligament. An experimental study in the monkey. *Journal of Clinical Periodontology*, **9**, 257-265.
- Okuda, K., Kawase, T., Momose, M., Murata, M., Saito, Y., Suzuki, H., Wolff, L.F., Yoshie, H. (2003). Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *Journal of Periodontology*, **74**: 849-57.
- Ong, M.M., Eber, R.M., Korsnes, M.I., MacNeil, R.L., Glickman, G.N., Shyr, Y., Wang, H.L. (1998). Evaluation of a bioactive glass alloplast in treating periodontal intrabony defects. *Journal of Periodontology*. **69**, 1346-1354.
- O'Toole, G., MacKenzie, D., Buckley, M.F., Lindeman, R., Poole, M. (2001). A review of therapeutic angiogenesis and consideration of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. *British Journal of Plastic Surgery*, **54**, 1-7.
- Page, R.C., Schroeder, H.E. (1982). Periodontitis in man and other animals. A comparative review. Basel, New York: Karger. Sy:127
- Parikh, S.N. (2002). Bone graft substitutes: past, present, future. *Journal of Postgraduate Medicine*, **48**, 142-148.
- Park, J.B., Matsuura, M., Han, K.Y., Norderyd, O., Lin, W.L., Genco, R.J., Cho, M.I. (1995). Periodontal regeneration in class III furcation defects of beagle dogs using guided tissue regenerative therapy with platelet-derived growth factor. *Journal of Periodontology*, **66**, 462-477.
- Petrungaro, PS. (2002) Treatment of the infected implant site using plateletrich plasma. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, **23**, 363-376.
- Pettersson, E.C., Aukhil, I. (1986). Citric acid conditioning of roots affects guided tissue regeneration in experimental periodontal wounds. *Journal of Periodontal Research*, **21**, 543-552.
- Pfeilschifter, J., Oechsner, M., Naumann, A., Gronwald, R.G., Mine, H.W., Ziegler, R. (1990). Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor beta. *Endocrinology*, **127**, 69-75.
- Piche, J.E., Graves, D.T. (1989). Study of the growth factor requirements of human bone-derived cells: a comparison with human fibroblasts. *Bone*, **10**, 131-138.
- Pierce, G.F., Tarpley, J.E., Yanagihara, D., Mustoe, T.A., Fox, G.M., Thomason, A. (1992). Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing.

Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *The American Journal of Pathology*, **140**, 1375-1388.

- Plemons, J.M., Dill, R.E., Rees, T.D., Dyer, B.J., Ng, M.C., Iacopino, A.M. (1996). PDGF-B producing cells and PDGF-B gene expression in normal gingival and cyclosporine A-induced gingival overgrowth. *Journal of Periodontology*, **67**, 264-270.
- Position Paper. (1996). The potential role of growth and differentiation factors in periodontal regeneration. *Journal of Periodontology*, **67**, 545-553.
- Prato, G.P., Clauser, C., Cortellini, P. (1993). Guided tissue regeneration and a free gingival graft for the management of buccal recession: a case report. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, **13**, 486-493.
- Pryor, M.E., Polimeni, G., Koo, K.T., Hartman, M.J., Gross, H., April, M., Safadi, F.F., Wikesjö, U.M. (2005). Analysis of rat calvaria defects implanted with a platelet-rich plasma preparation: histologic and histometric observations. *Journal of Clinical Periodontology*, **32**, 966-972.
- Raghoobar, G.M., Schortinghuis, J., Liem, R.S., Ruben, J.L., van der Wal, J.E., Vissink, A. (2005). Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clinical Oral Implants Research*, **16**, 349-356.
- Ranly, D.M., McMillan, J., Keller, T., Lohmann, C.H., Meunch, T., Cochran, D.L., Schwartz, Z., Boyan, B.D. (2005). Platelet-derived growth factor inhibits demineralized bone matrix-induced intramuscular cartilage and bone formation. A study of immunocompromised mice. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, **87**, 2052-2064.
- Rashid, M.A., Akita, S., Razzaque, M.S., Yoshimoto, H., Ishihara, H., Fujii, T., Tanaka, K., Taguchi, T. (1999). Coadministration of basic Fibroblast Growth Factor and Sucrose Octasulfate (Sucralfate) facilitates the rat dorsal flap survival and viability. *Plastic and Reconstructive Surgery*, **103**, 941-948.
- Renvert, S., Garrett, S., Shallhorn, R.G., Egelberg, J. (1985). Healing after treatment of periodontal intraosseous defects. III. Effect of osseous grafting and citric acid conditioning. *Journal of Clinical Periodontology*, **12**, 441-455.
- Ribatti, D., Vacca, A., Presta, M. (2002). The discovery of angiogenic factors: A historical review. *General Pharmacology*, **35**, 227-231.
- Rivault, A.F., Toto, P.D., Levy, S., Gargiulo, A.W. (1971). Autogenous bone grafts: osseous coagulum and osseous retrograde procedures in primates. *Journal of Periodontology*, **42**, 787-796.
- Robey, P.G., Young, M.F., Flanders, K.C., Roche, N.S., Kondaiah, P., Reddi, A.H., Temrine, J.D., Sporn, M.B., Roberts, A.B. (1987). Osteoblasts synthesize and

- respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro. *The Journal of Cell Biology*, **105**, 457-463.
- Robiony, M., Polini, F., Costa, F., Politi, M. (2002). Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **60**, 630-635.
- Rosenberg, E., Rose, LF. (1998). Biologic and clinical considerations for autografts and allografts in periodontal regeneration therapy. *Dental Clinics of North America*, **42**, 467-490.
- Royet, J.P. (1991). Stereology: A method for analysing images. *Progress in Neurobiology*, **37**, 433-474.
- Rutherford, R.B., Niekrash, C.E., Kennedy, J.E., Charette, M.F. (1992). Platelet-derived and insulin-like growth factors stimulate regeneration of periodontal attachment in monkeys. *Journal of Periodontal Research*, **27**, 285-290.
- Sahin, B., Aslan, H., Ünal, B., Canan, S., Bilgiç, S., Kaplan, S. (2001). Tümkaya L. Brain volumes of the lamb rat and bird do not show hemispheric asymmetry: A stereological study. *Image Anal Stereol.* **20**, 9-13.
- Salama, H., Rigotti, F., Gianserra, R., Seibert, J. (1994). The utilization of rubber dam as a barrier membrane for the simultaneous treatment of multiple periodontal defects by the biologic principle of guided tissue regeneration: case reports. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, **14**, 16-33.
- Sanchez, A.R., Sheridan, P.J., Kupp, L.I. (2003). Is Platelet Rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, **18**, 93- 103.
- Sandallı, P., Karabuda, C. (1995). Oral implantolojide kemik grefti materyalleri ve kullanımları *Oral İmplantoloji Dergisi*, **2**, 9-16.
- Sandor, G.K.B., Lindholm, T.C., Clokie, C.M.L. (2003). Bone regeneration of the craniomaxillofacial and dento-alveolar skeletons in the framework of tissue engineering. In: Ashammakhi N, Ferretti P (eds). *Topics in Tissue Engineering* 1-46.
- Schallhorn, R.G., Hiatt, W.H. (1972). Human allografts of iliac cancellous bone and marrow in periodontal osseous defects. II. Clinical observations. *Journal of Periodontology*, **43**, 67-81.
- Schliephake, H. (2002). Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *International Journal Oral and Maxillofacial Surgery*, **31**, 469-484.
- Schmitz, J.P., Hollinger, J.O. (2001). The Biology of Platelet Rich Plasma. (letter to the editor). *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **59**:1119.

- Schwartz, Z., Mellonig, J.T., Carnes, D.L., de la Fontaine, J., Cochran, D.L., Dean, D.D., Boyan, B.D. (1996). Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *Journal of Periodontology*, **67**, 918-926.
- Schlegel, K.A., Kloss, F.R., Kessler, P., Schultze-Mosgau, S., Nkenke, E., Wiltfang, J. (2003). Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. **18**, 505-511.
- Sculean, A., Donos, N., Brex, M., Karring, T., Reich, E. (2000) Healing of fenestration-type defects following treatment with guided tissue regeneration or enamel matrix proteins. An experimental study in monkeys. *Clinical Oral Investigations*, **4**, 50-6.
- Selvig, K.A., Bogle, G.C., Sigurdsson, T.J., Wikesjö, U.M. (1996). Does root surface conditioning with citric acid delay healing? *Journal of Clinical Periodontology*, **23**, 119-127.
- Selvig, K.A., Kertsen, B.G., Wikesjö, U.M. (1993). Surgical treatment of intrabony periodontal defects using expanded polytetrafluoroethylene barrier membranes: influence of defect configuration on healing response. *Journal of Periodontology*, **64**, 730-733.
- Selvig, K.A., Wikesjö, U.M., Bogle, G.C., Finkelman, R.D. (1994). Impaired early bone formation in periodontal fenestration defects in dogs following application of insulin-like growth factor (II). Basic fibroblast growth factor and transforming growth factor beta 1. *Journal of Clinical Periodontology*, **21**, 380-385.
- Selvig, K.A., Bogle, G.C., Sigurdsson, T.J., Wikesjö, U.M. (1996). Does root surface conditioning with citric acid delay healing? *Journal of Clinical Periodontology*, **23**:119-27.
- Sammartino, G., Tia, M., Marenzi, G., di Lauro, A.E., D'Agostino, E., Claudio, P.P. (2005). Use of autologous platelet-rich plasma (PRP) in periodontal defect treatment after extraction of impacted mandibular third molars. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **63**, 766-770.
- Shanaman, R., Filstein, M.R., Danesh-Meyer, M.J. (2001). Localized ridge augmentation using GBR and platelet-rich plasma: case reports. *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, **21**, 345-355 .
- Shroff, B., Kashner, J.E., Keyser, J.D., Hebert, C., Norris, K. (1996). Epidermal growth factor and epidermal growth factor-receptor expression in the mouse dental follicle during tooth eruption. *Archives of Oral Biology*, **41**, 613-617.

- Simion, M., Dahlin, C., Rocchietta, I., Stavropoulos, A., Sanchez, R., Karring, T. (2007). Vertical ridge augmentation with guided bone regeneration in association with dental implants: an experimental study in dogs. *Clinical Oral Implants Research*, **18**, 86-94.
- Somerman, M.J., Perez-Mera, M., Merkhofer, R.M., Foster, R.A. (1987). In vitro evaluation of extracts of mineralized tissues for their application in attachment of fibrous tissue. *Journal of Periodontology*, **58**, 349–351.
- Stephan, E.B., Renjen, R., Lynch, S.E., Dziak, R. (2000). Platelet-derived growth factor enhancement of a mineral-collagen bone substitute. *Journal of Periodontology*, **71**, 1887-1892.
- Su, C.Y., Chiang, C.C., Lai, W.F., Lin, K.W. (2004). Burnouf T. Platelet-derived growth factor-AB and transforming growth factor-beta 1 in platelet gels activated by single-donor human thrombin. *Transfusion*, **44**, 945.
- Tal, H., Pitaru, S., Moses, O., Kozlovsky, A. (1996). Collagen gel and membrane in guided tissue regeneration in periodontal fenestration defects in dogs. *Journal of Clinical Periodontology*, **23**, 1-6.
- Tayapongsak, P., O'Brien, D.A., Monteiro, C.B., Arceo-Diaz, L.Y. (1994). Autologous fibrin adhesive in mandibular reconstruction with particulate cancellous bone and marrow. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **52**, 161-165.
- Tonetti, M.S., Pini-Prato, G., Cortellini, P. (1993). Periodontal regeneration of human intrabony defects. IV. Determinants of healing response. *Journal of Periodontology*, **64**, 934-940.
- Tonetti, M.S., Pini Prato, G., Williams, R.C., Cortellini, P. (1993). Periodontal regeneration of human infrabony defects. III. Diagnostic strategies to detect bone gain. *Journal of Periodontology*, **64**, 269-277.
- Tozum, T.F., Demiralp, B. (2003). Platelet-Rich Plasma: A Promising Innovation in Dentistry. *Journal of Canadian Dental Association*, **69**, 664.
- Turgut K. (2000). *Veteriner Klinik Laboratuvar Teşhis*, Bahçıvanlar Basım Sanayi, Genişletilmiş 2. Baskı, sy.885 .
- Ünal, B., Aslan H., Canan, S., Şahin, B., Kaplan, S. (2002). Biyolojik ortamlardaki objelerin sayımı yapılırken kullanılan eski (tarafli) metodların önemli ata kaynakları ve çözüm önerileri. *Turkish Clinical Medical Science*, **22**,1-6.
- Wang, H.L., Pappert, T.D., Castelli, W.A., Chiego, D.J. Jr., Shyr, Y., Smith, B.A. (1994). The effect of platelet-derived growth factor on the cellular response of the periodontium: an autoradiographic study on dogs. *Journal of Periodontology*, **65**, 429-36.

- Wang, F.S., Kuo Y.R., Wang C.J., Yang K.D., Chang P.R., Huang Y.T., Huang H.C., Sun Y.C., Yang Y.J., Chen Y.C. (2004). Nitric oxide mediates ultrasound-induced hypoxia-inducible factor-1 α activation and vascular endothelial growth factor-A expression in human osteoblasts. *Bone*, **35**, 114-123.
- Weibel, E.R. (1969). Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *International Review of Cytology*, **26**, 235-302.
- Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, W., Buch, R., Hitzler, W.E. (2004). Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone*, **34**, 665-671.
- Weibrich, G., Kleis, W.K. (2002). Curasan PRP kit vs. PCCS PRP system. Collection efficiency and platelet counts of two different methods for the preparation of platelet-rich plasma. *Clinical Oral Implants Research*, **13**, 437-443.
- Whitman, D.H., Berry, R.L., Gren, D.M. (1997). Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, **55**, 1294-1299.
- Wikesjö, U.M., Selvig KA. (1999). Periodontal Wound Healing And Regeneration. *Periodontology 2000*, **19**, 59-68.
- Wiltfang, J., Kloss, F.R., Kessler, P., Nkenke, E., Schultze-Mosgau, S., Zimmerman, R., Schelegel, K.A. (2004). Effects of platelet-rich plasma on bone healing in combination with autogenous bone and bone substitutes in critical-size defects. An animal experiment. *Clinical Oral Implants Research*, **15**, 187-193 .
- Wirthlin, M.R. (1989). Growth substances: potential use in periodontics. *The Journal of the Western Society of Periodontology/Periodontal Abstracts*, **37**, 101-25.
- Zechner, W., Tangl, S., Teper, G., Fürst, G., Bernhart, T., Haas, R., Mailath, G., Watzek, G. (2003). Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*, **18**, 15-22.
- Zellin, G., Gritli-Linde, A., Linde, A. (1995). Healing of mandibular defects with different biodegradable and non-biodegradable membranes: an experimental study in rats. *Biomaterials*, **16**, 601-609.
- Zhang, L., Leeman, E., Carnes, D.C., Graves, D.T. (1991). Human osteoblasts synthesize and respond to platelet-derived growth factor. *The American Journal of Physiology*, **261**, 348-354.
- Zubery, Y., Kozlovsky, A., Tal, H. (1993). Histologic assessment of a contiguous autogenous transplant in a human intrabony defect. *A case report. Journal of Periodontology*, **64**, 66-71.

ÖZGEÇMİŞ

1977 yılında Vezirköprü’de doğdum. İlkokulu Vezirköprü’de bitirdim. Orta ve lise öğrenimimi Samsun Anadolu Lisesi’nde tamamladım. 1995 yılında Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi’nde yüksek öğrenimime başladım. 2000 yılında bu fakültenen mezun olup 2001 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalında araştırma görevlisi olarak göreve başladım. 2002 yılında aynı anabilim dalında doktora başlayıp 2004 yılında yeterliliğimi verdim. Halen aynı anabilim dalında görev yapmaktayım. 7’si uluslararası 12 yayınım ve 22 tebliğim bulunmaktadır. Yabancı dilim İngilizcedir.

Evli ve bir çocuk babasıyım.