

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK DEFİKTLERİNİN ONARIMINDA KOLLAJENİZE AT
KEMİK GREFTİNİN TEK BAŞINA VE TROMBOSİTTEN
ZENGİN PLAZMA (PRP) UYGULAMASI İLE BİRLİKTE
KULANIMININ HİSTOPATOLOJİK ve TOMOGRAFİK (Micro-
CT) DEĞERLENDİRİLMESİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

Veteriner Hekim Demet GÖKDERE
CERRAHİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nazmi ATASOY

VAN-2018

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK DEFECTLERİNİN ONARIMINDA KOLLAJENİZE AT
KEMİK GREFTİNİN TEK BAŞINA VE TROMBOSİTTEN
ZENGİN PLAZMA (PRP) UYGULAMASI İLE BİRLİKTE
KULANIMININ HİSTOPATOLOJİK ve TOMOGRAFİK (Micro-
CT) DEĞERLENDİRİLMESİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

Veteriner Hekim Demet GÖKDERE
CERRAHİ ANABİLİM DALI
(VETERİNER PROGRAMI)
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Nazmi ATASOY

Bu araştırma Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından TYL-2016-5120 nolu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2018

T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KEMİK DEFECTLERİNİN ONARIMINDA KOLLAJENİZE AT
KEMİK GREFTİNİN TEK BAŞINA VE TROMBOSİTTEN ZENGİN
PLAZMA (PRP) UYGULAMASI İLE BİRLİKTE KULANIMININ
HİSTOPATOLOJİK ve TOMOGRAFİK (Micro-CT)
DEĞERLENDİRİLMESİ: DENEYSEL ÇALIŞMA**

Veteriner Hekim Demet GÖKDERE

CERRAHİ ANABİLİM DALI

(VETERİNER PROGRAMI)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. İsmail ALKAN

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Nazmi ATASOY

Üye (Danışman)

Doç. Dr. Latif Enrah YANMAZ

Üye

TEZ KABUL TARİHİ

28/06/2018

TEŞEKKÜR

Tezimin, planlaması başta olmak üzere her bir aşamasında bilgi, birikim, tecrübe yardım ve desteklerini esirgemeyen, kendisine ne zaman danışsam sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olabilmek için elinden gelenin fazlasını sunan danışman hocam sayın Prof. Dr. Nazmi Atasoy'a, eğitimimde emekleri olan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalının sayın öğretim üyelerine, at kemik greftinin hazırlanmasında emeği geçen sayın Dr. Madalina Georgiana Albu hanımefendiye, histopatolojik incelemeleri değerlendiren Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi Patoloji AD öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Yavuz Selim Sağlam ve Yrd. Doç. Dr. Serkan Yıldırım beyefendilere, micro-CT bulgularını değerlendiren Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Radyoloji AD öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Mecit Kantarcı ve Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Oral Diagnoz ve Radyoloji AD öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Ahmet Berhan Yılmaz beylere, istatistiki değerlendirmeleri yapan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Hayvan Besleme ve Beslenme Hastalıkları AD öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Taylan Aksu beye, araştırmamın klinik çalışmalarındaki yardımlarından dolayı araştırma görevlileri sayın Caner Kayıkçı, Yağmur Kuşcu ve Tunahan Sancak'a, ayrıca çalışmaya maddi destek sağlayan Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığına ve tüm eğitim hayatım süresince benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen sevgili anneme ve babama teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay.....	II
Teşekkür.....	III
İçindekiler.....	IV
Simgeler ve Kısaltmalar	VI
Şekiller Listesi.....	IX
Tablolar Listesi.....	X
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Kemik Dokusu.....	5
2.1.1. Kemik dokusu hücreleri	5
2.1.1. Kemik matriksi.....	6
2.2. Kritik Boyut Kemik Defekti (KBKD=KBD).....	6
2.3. Graft Materyalleri.....	8
2.3.1. Kemik grefti ve greft materyali tipler.....	8
2.3.2. Kemik morfojenik proteinleri (BMP).....	9
2.3.3. Allograft ve Heterograftlar.....	11
2.3.3. Alloplastik greftler.....	13
2.4. Plateletten Zengin Plazma (PRP).....	14
2.5. Kemik Yapımı (Osteogenezis).....	18
2.6. Kemğin Şekillenme ve Yeniden Şekillenmesi (Modelling ve Remodelling).....	19
2.7. Kemik İyileşmesi.....	19
2.8. Graft Materyalinin Alıcı Kemik ile Kaynaşması ve Rejenerasyonu.....	23
2.9. Kemik Defekt İyileşmesi ve Graft-Kemik Birleşmesi Mekanizması...	25
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	29
3.1. Gereç.....	29
3.1.1. Deney hayvanları.....	29
3.1.2. Operasyon malzemeleri.....	29
3.1.3. Kimyasal malzemeler.....	29
3.2. Yöntem.....	29
3.2.1. At kemik greftinin hazırlanması.....	29

3.2.2. Trombositten Zengin Plazmanın hazırlanması.....	31
3.2.3. Cerrahi prosedür.....	31
3.2.4. Mikro-CT prosedürü.....	35
3.2.5. Histopatolojik inceleme.....	35
3.2.6. İstatistiki analizler.....	36
4. BULGULAR.....	37
4.1. Histopatolojik Bulgular.....	37
4.2. Mikro-CT Bulguları.....	41
4.3. Mikro-CT ve Histopatolojik Skorlar.....	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	44
ÖZET.....	57
SUMMARY.....	58
KAYNAKLAR.....	59
ÖZGEÇMİŞ.....	75
EKLER.....	76
Ek1. Tez Orjinallik Raporu	76
Ek2. Etik Kurul Raporu	77

SİMGELER VE KISALTMALAR

AKPE	: At kemik protein ekstraktı
bFGF	: Basic (Temel) fibroblast büyüme faktörü
BMP1	: Kemik morfojenik protein 1
BMPs	: Kemik morfojenik proteinler
CHBG	: Kollajenize heterolog kemik grefti
DBM	: Demineralize kemik matriksi
DDKKA	: Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
DFDB	: Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik
DFDBA	: Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
DKM	: Demineralize kemik matriksi
EGF	: Epidermal büyüme faktörü
FDB	: Dondurulmuş kurutulmuş kemik
FDBA	: Dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti
FGF	: Fibroblast büyüme faktörü
HA	: Hidroksiapatit
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü
IL-1β	: İnterlökin 1 beta
KBD	: Kritik boyut defekti
KBKD	: Kritik boyut kemik defekti
KMP	: Kemik morfojenik proteinleri
KPE	: Kemik protein ekstraktları

KS	: Kalsiyum sülfat
L-PRP	: Lökosit ve trombosit zengin plazma
PDAF	: Trombosit kaynaklı anjiyogenezis faktörü
PEEK	: Polietileneeterketon
PDEGF	: Trombosit kaynaklı epidermal büyüme faktörü
PDGF	: Trombosit kökenli büyüme faktörü
PDGF-AB	: Trombosit kökenli büyüme faktörü-Antibiyotik
PF 4	: Trombosit faktör 4
PRF	: Trombosit zengin fibrin
P-PRF	: Saf trombosit zengin fibrin
PRP	: Trombosit zengin plazma
P-PRP	: Saf trombosit zengin plazma
PTFE	: Politetrafloroetilen
SKPE	: Sığır kemik protein ekstraktı
TGF	: Dönüştürücü büyüme faktörü
TGF-α	: Dönüştürücü büyüme faktörü alfa
TNF-α	: Tümör nekroze edici faktör alfa
TGF-β	: Dönüştürücü büyüme faktörü beta
TSE	: Taşınabilen spongioform ensefalopati
TZF	: Trombosit zengin fibrin
TZP	: Trombosit zengin plazma
VEGF	: Vasküler endotelial büyüme faktörü

α -TCP : Alfa-trikalsiyum fosfat

β -TCP : Beta-trikalsiyum fosfat



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Kemik yapısı.....	7
Şekil 2.	Kemik iyileşmesinde citokin ve hücrel etkileşim.....	22
Şekil 3.	Kemik yıkım ve onarım döngüsü.....	22
Şekil 4.	At kemik parçaları.....	30
Şekil 5.	Kemik parçalarının dönüşümlü olarak asitle muamelesi ile demineralize edilmesi.....	30
Şekil 6.	Kulak venasından PRP için kan alımı ve elde edilen PRP.....	31
Şekil 7.	Operasyon sahasına medial yaklaşım.....	32
Şekil 8 (A, B).	Kritik boyut kemik defekti oluşturulması.....	33
Şekil 9 (A, B).	At kemik greft materyalinin implantasyonu.....	34
Şekil 10.	İmplantasyon alanına PRP uygulanması.....	35
Şekil 11 (A, B).	3. hafta PRP siz grup, histopatolojik görünüm H&E.....	37
Şekil 12 (A, B).	3. hafta PRP li grup, histopatolojik görünüm H&E.....	38
Şekil 13 (A, B).	6.hafta PRP siz grup, histopatolojik görünüm H&E.....	39
Şekil 14 (A, B).	6 hafta PRPlı grup, histopatolojik görünüm H&E.....	40
Şekil 15.	3. hafta PRP siz grup mikro-CT grafisi.....	41
Şekil 16.	3. hafta PRP li grup mikro-CT grafisi.....	41
Şekil 17.	6. hafta PRP siz grup mikro-CT grafisi.....	42
Şekil 18.	6. hafta PRP li grup mikro-CT grafisi.....	42

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Mikro-CT ve Histopatolojik Skorlar.....	43
---	----



1. GİRİŞ

Bilindiği üzere kemik dokusunun rejenerasyonu ve rekonstrüksiyonunu sağlamak için kemik greftleri, büyüme faktörleri, bariyer membranlar ve bazı proteinler kullanılmaktadır (Durmuş ve Can, 2016). Kritik boyut defektlerinin (KKBD:KBD) gereği şekilde onarılmadığı durumlarda, bölgedeki kemik oluşumunun istatistiksel olarak yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Görmez, 2008). Büyük kemik defektlerinin fibrotik doku ile kapandığı hem deneysel hemde klinik olarak gösterilmiştir (Little ve ark., 2011) Ortopedik problemlerde fibrotik iyileşme istenmeyen bir durum olup, kemik gelişimini uyarmak amacıyla uygulanan yöntemlerde her zaman istenilen sonuçları verememektedir (Dahlin ve ark., 1988; Dahlin ve ark., 1991; Alberius ve ark.,1992; Lundgren ve ark., 1992; Mundell ve ark., 1993; Sandberg ve ark.,1993). Kemik onarımında optimal yöntem ve greft materyali seçilmediğinde kemiğin doğal yapısı sağlanmaz ve iyileşmenin fibröz dokuyla olduğu görülür (Similer ve Soltan, 2006). Greftin zamanla rezorbe olarak, remodelling ile yerini kemik yapıya bırakması beklenir (Botticelli ve ark., 2004) Bu amaca yönelik olarak, kemiğin formasyonu, iyileşmesi ve olgunlaşmasını sağlamak amacıyla, uygulanan kemik grefti materyalinin yeni kemiğe dönüşmesi ve uygulama yapılan bölgedeki doku iyileşmesini ve olgunlaşmasını stimüle edecek maddelerin, greft materyaline eklenmesi daha başarılı sonuçlar ortaya çıkarabilir. Sentetik materyallerde ve saflaştırılmış büyüme faktörlerinde de diğer doğal greft materyallerinin osteointegrasyon, osteogenezis, osteokondüktif veya osteoindüktif gibi özellikleri bulunmaktadır (Nienhuijs ve ark., 2009). Mevcut maddelerin kombinasyonları ile kırık onarımı için yeni metodların geliştirilmesi yolu açılmıştır. Kemik kaybının onarımı ve yeni kemik oluşumunun gerekliliği durumlarında kemik greftleri ve greft yerini tutan maddeler sıklıkla kullanılmaktadır (Songür ve ark., 2015). Otojen kemik greftleri yüksek osteojenik kapasitesi ve kemik rejenerasyonunu artırıcı özelliklerinden dolayı halen en güvenilir greft materyalleridir. Ancak otojen greft elde edebilmek için ikinci bir operasyon gerekmesi, yeterli miktarda greft materyali elde edilememesi, küçük boyutlarda elde edilen greftlerin rezorpsiyona uğramaları, operasyon sonrası morbidite, kan kaybı, ağrı, enfeksiyon gözlenmesi allojen ve heterojen greftleri ve alloplastik materyalleri alternatif hale getirmiştir (Lynch ve ark., 1999; Mankin ve ark., 1999; Durmuş ve Ünsaldı, 2001). Kemik protein ekstraktları

(KPE) hem allojenik hem de heterojenik olarak elde edilmektedir. Kemik dokusu, büyük bir rejenerasyon yeteneğine sahip olmasına rağmen, bazı durumlarda kemik defektlerinde yeterli bir iyileşme olmamaktadır. Kemik greftlemesi osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon olarak adlandırılan üç farklı biyolojik süreç içermektedir. Farklı greft materyalleri kullanıldığında kemik greftleri bu süreçlerden birini, ikisini ya da üçünü birden gerçekleştirerek kemik oluşumunu sağlarlar (Lindhe ve ark., 2009; Bagheri ve ark., 2011). İmmünojenik özellik ve hastalık transmisyonu riski açısından allogreftlerden daha üstün olduğu belirtilen heterogreftlerin kullanıldığı deneysel ve klinik çalışmaların başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Artzi ve Merten, 1998; Bertagnoli, 2002; Schlegel ve ark., 2004). Osteoindüktif ve osteokondüktif özellik gösteren bu yapı, mekanik destekten yoksundur ve genellikle bir taşıyıcı gereksinimi oluşturmaktadır. At kemik protein ekstraktıda sığır kemik protein ekstraktı gibi, bünyesinde tip I kollajen ile diğer bazı çözülmeyen matriks proteinlerini barındırmaktadır. Bu içeriği nedeniyle hem osteoindüktif, hem de osteokondüktif bir özellik taşımaktadır (Nienhuijs ve ark., 2010; Songür ve ark., 2015). Ek olarak kollajenin, kemik formasyon sürecinde mezenşimal hücreler üzerinde kemotaktik etki gösterdiği, bu hücrelerin adezyonunu ve büyüme faktörleri ile kompleksler oluşturduğu düşünülmektedir (Mundy, 1995; Mizuno ve ark., 2000). Demineralize kemik matriksi, kollajen tip 1, osteoindüktif büyüme faktörleri ve diğer kollajen olmayan büyüme faktörlerini içermektedir. Kemik morfojenik protein (BMP), kemikteki tüm proteinin % 0,1'ini teşkil etmesine rağmen osteoindüksiyonun başlatılmasında ve regülasyonunda çok önemli role sahip olduğu bildirilmektedir (Urist ve Dawson, 1981; Vehof ve ark., 2002). Allogreftlerdeki sorunlar kaynak temini ve yüksek maliyet olarak bilinmektedir (Songür ve ark., 2015). Bunların dışında genel olarak trombosit zengin plazma (PRP=Plateletten zengin plazma=Platelet Rich Plasma) ve trombosit zengin fibrin (PRF) gibi otojen materyaller üzerinde de çalışmalar yapılmaktadır (Can, 2013; Taşkaldıran, 2013; Can ve Durmuş, 2015; Durmuş ve Can, 2016). PRP'da trombosit oranı yükseltilerek, büyüme faktörlerinin yoğun olarak bölgeye uygulanmasıyla yara iyileşmesi ve rejenerasyonu hızlandırılmaktadır (Carlson ve Roach, 2002). Bu nedenle PRP, kemik onarımında kemik greftleri ile birlikte ya da tek başına kullanılması ile kemik onarımını hızlı bir şekilde sağladığı için, kısa sürede popüler olmuştur (Tambini, 2001; Epple ve ark., 2004). Kan plazmasında bulunan trombositlerin içerisinde Platelet

Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF=Platelet Derived Growth Factor), Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β =Transforming Growth Factor- β), Trombosit Faktör 4 (PF4=Platelet Factor 4) ve İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF's=Insulin Like Growth Factor) gibi osteoindüktif büyüme faktörleri bulunmaktadır (Taşkaldıran, 2013). İyileşme sürecinde büyüme faktörlerinin hücre organizasyonunda, dönüşümünde, gelişmesinde, damarlaşmada ve ekstrasellüler matriksin sentezinde önemli etkileri vardır. PRP yüksek oranda bu büyüme faktörlerini ve plateletleri içeren otojen bir plazmadır. Otojen kemik greftleri alındığı yerde ikinci bir operasyon yapılmasını gerektirmesi, fonksiyonda kısıtlılık görülebilmesi ve iyileşme süresinin uzaması gibi dezavantajlarından dolayı, genellikle büyük kemik defektlerinin onarımında kullanılmaktadır. Bu nedenlerden dolayı, kemik grefti uygulamalarında allojenik heterojenik greftler, alloplastik greftlerin kullanımını yaygınlaştırmaktadır. Yapılan çalışmalarda PRP, çoğunlukla otojen kemik greftleri ile birlikte kombine olarak kullanılmıştır. Bunun aksine PRP'nin heterojenik materyaller ile kombine kullanımı ile yeterli çalışma yapılmamıştır. PRP hangi greft materyali kullanırsa kullanılsın sonuçlarının radyolojik, histopatolojik ve tomografik çalışmalar da sınırlı sayıdadır. Kemik protein ekstraktları (KPE) hem allojenik hem de heterojenik olarak elde edilmektedir. İmmünojenik özellik ve hastalık transmisyonu riski açısından allogreftlerden daha üstün olduğu belirtilen bu greftlerin kullanıldığı deneysel ve klinik çalışmaların başarılı sonuçlar verdiği bildirilmiştir (Artzi ve Merten, 1998; Bertagnoli, 2002; Schlegel ve ark., 2003). Osteoindüktif ve osteokondüktif özellik gösteren bu yapı, mekanik destekten yoksundur ve genellikle bir taşıyıcı gereksinimi oluşturmaktadır. At kemik protein ekstraktıda sığır kemik protein ekstraktı gibi, bünyesinde tip I kollajen ile diğer bazı çözülmeyen matriks proteinlerini barındırmaktadır. Bu içeriği nedeniyle hem osteoindüktif, hem de osteokondüktif bir özellik taşımaktadır (Songür ve ark., 2015). Ek olarak kollajenin, kemik formasyon sürecinde mezenşimal hücreler üzerinde kemotaktik etki gösterdiği, bu hücrelerin adezyonunu ve büyüme faktörleri ile kompleksler oluşturduğu düşünülmektedir (Mundy, 1995; Mizuno ve ark., 2000). Demineralize kemik matriksi, kollajen tip 1, osteoindüktif büyüme faktörleri ve diğer kollajen olmayan büyüme faktörlerini içermektedir. BMP, kemikteki tüm proteinin % 0,1'ini teşkil etmesine rağmen osteoindüksiyonun başlatılmasında ve regülasyonunda çok önemli role sahip olduğu bildirilmektedir (Urist ve Dawson, 1981; Vehof ve ark., 2002).

Sığır kemik protein ekstraktı (SKPE), osteoindüktif ve osteokondüktif özellikleri, düşük immünojenite, bulaşıcı hastalık riski taşıma olasılığının düşük olması gibi avantajları ile implantasyonlarda başarıyla kullanılmaktadır (Boden ve ark., 1995; Bertagnoli, 2002).

Her ne kadar sığır kemiği, diğer heterogreftlere nazaran çok daha bol ve sorunsuz elde edilebilse de, prionlar ile taşınabilen spongiform ensefalopati riski sığır kaynaklı ksenogreftlerde söz konusu olabilen bir sorun teşkil edebilmektedir. Taşınabilen spongiform ensefalopatinin (TSE), büyükbaş hayvanlarda, küçükbaş hayvanlarda, evcil bazı hayvanlarda görülebildiği bildirilmekle birlikte atlarda TSE vakası bildirilmemiştir (Lasmezas, 2003; Williams ve Miller, 2003). Bu avantajlarıyla at kemiği, sığır kemiğine alternatif olarak kullanılabilir. Ayrıca at kaynaklı kemik protein ekstraktında Tip I kollajen fazla miktarda bulunmaktadır ve çapraz bağlı fibriler yapısıyla osteoprojenitor hücrelerin ve diğer materyallerin uygulanmasında taşıyıcı olarak kullanılabilir. Bu çalışmada, kemik defektlerinin onarımında, heterogreft materyal olarak hazırlanan kollajenize at kemik greftinin tek başına ve PRP ile birlikte kullanılmasının etkilerinin histopatolojik ve tomografik (micro-CT) olarak ortaya konulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kemik Dokusu

Kemik dokusunun %67'sini kalsiyum hidroksiapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), %28'ini kollajen tip I, % 5'ini de bazı büyüme faktörleri ve serum proteinleri oluşturur (Lindhe ve ark., 2009; Nanci, 2008). Mineralize yapısı ve matriksi, kemiğe sertlik, esneklik ve gerilme direnci sağlamaktadır (Lindhe ve ark., 2009; Mills, 2012). Kemik doku kalsiyum, fosfat yanında diğer birçok iyonlar içinde depo görevi üstlenerek metabolik fonksiyon, önemli organları koruması ve kas aktivitesi için dayanak oluşturması ile mekanik fonksiyon, bulundurduğu kemik iliği ile de kan yapma görevini üstlenerek hemopoietik fonksiyon göstermektedir (Garant, 2003; Lindhe ve ark., 2009; Mills, 2012).

2.1.1. Kemik dokusu hücreleri

Osteojenik hücreler

Osteoblastlar, kemik oluşumundan sorumlu asıl hücrelerdir. Organik ekstrasellüler matriks bileşenlerini sentezler ve matriks mineralizasyonunu kontrol ederler (Lindhe ve ark., 2009; Mills, 2012). Osteoblastların göç edebilme ya da çoğalma özellikleri olmayışından, belirli bir bölgede kemik oluşumunun sağlanabilmesi için farklılaşmamış mezenşimal hücrelerin (osteoprogenitör hücreler) göç edip osteoblast oluşturmak için çoğalmaları gerekmektedir (Lindhe ve ark., 2009).

Osteoblastların gelişimi ve farklılaşması, BMP, IGF, PDGF, fibroblast büyüme faktörü (FGF = fibroblast growth factor) gibi büyüme faktörlerinin salınımına bağlıdır (Nanci, 2008; Mills, 2012).

Kemik yüzey hücreleri (Bone lining cells)

Kemik yüzey hücreleri, yeniden şekillenme göstermeyen kemik yüzeyinde ince bir tabaka halinde uzanan ve daha çok yetişkin kemik dokusunda görülen hücrelerdir. Bu hücreler çoğalıp osteojenik hücrelere farklılaşabilir, kemik rezorpsiyonunun ve

yeniden şekillenmesini başlatan sinyal mekanizmasının yayılmasını sağlar (Miller ve ark., 1989).

Osteoklastlar

Osteoklastlar, hematopoetik prekürsör hücrelerden oluşan çok çekirdekli hücrelerdir ve tipik olarak “Howship lakünaı” adı verilen kemik yüzeyinde oluşturdukları rezorpsiyon bölgelerinde bulunurlar. Kemik oluşumu, osteoklastlar tarafından başlatılıp sürdürülen kemik rezorpsiyonuna bağlı bir aktivitedir (Lindhe ve ark., 2009; Nanci, 2008; Mills, 2012).

2.1.2. Kemik matriksi

Kalsifiye kemiğin %25’ini organik matriks, %5’ini su ve %70’ini inorganik matriks oluşturmaktadır (Sommerfeldt ve Rubin, 2001).

Organik matriks

Organik kemik matriksinin %90’ını kollajen tip I, %10’unu ise diğer proteinler ve küçük proteoglikanlar oluşturmaktadır (Little ve ark., 2011). Kollajen olmayan proteinler kemik yapım ve yıkım olaylarında, hücre adezyonunda ve kemik hücre aktivitelerinin düzenlenmesinde rol oynamaktadır (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Garant, 2003; Little ve ark., 2011).

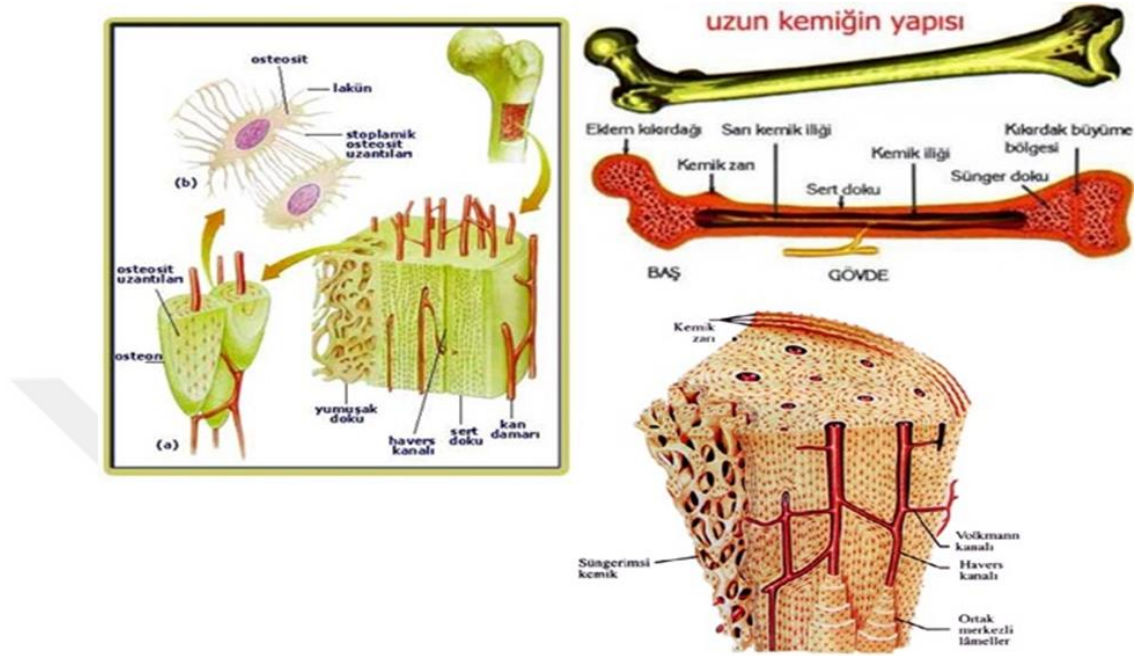
İnorganik matriks

Ağırlıklı olarak kalsiyum hidroksiapatit kristallerinden oluşur. Aynı zamanda kalsiyum fosfat içerir ve kemik kalsiyum miktarının %99’unu oluşturur (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Little ve ark., 2011).

2.2. Kritik Boyut Kemik Defekti (KBKD=KBD)

Kemiğin kendini onarma kapasitesi canlının evrimsel gelişmişliği ile ters orantılı olduğundan; hayvanlarda yapılan deneysel çalışmaların sonuçlarını karşılaştırmak son derece güçtür (Hollinger ve Kleinschmidt, 1990; Kleinschmidt ve Hollinger, 1992). Kemik greft materyallerinin araştırılmasında kullanılan hayvan modelleri immatür,

osteogenez kapasitesi yüksek ve evrimsel gelişimi az olan türlerden oluşturulmaktadır. Bu yüzden kendi haline bırakılan ve greft uygulanmayan yaralar genellikle spontan olarak iyileşmektedir (Schmitz ve Holinger, 1986; Bosch ve ark., 1998).



Şekil 1. Kemik yapısı

Kemik defektlerinde oluşabilecek iyileşme miktarı, defektin genişliği ve derinliğine bağlıdır. Bu nedenle kemik onarımının değerlendirilebilmesi için oluşturulacak kemik defekti, kendiliğinden iyileşemeyecek kadar büyük olmalıdır. Bu özellikteki deneysel kemik yarası KBD olarak adlandırılmaktadır ve osteojenik materyallerin değerlendirilmesinde standart olarak belirlenmiştir (Hollinger ve Kleinschmidt, 1990). Kritik boyut defektler, türlere ve bölgeye göre farklılık göstermek üzere hayat boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük kemik defekti olarak tanımlanabilir (Schmitz ve Holinger, 1986; Bosch ve ark., 1998; Clarck, 1998; Lemperle ve ark., 1998; Goasin ve ark., 2000). Bir implant veya greftin osteojenik potansiyeli ancak bu hacimdeki bir defekte tam olarak değerlendirilebilir (Schmitz ve Holinger, 1986).

Bununla birlikte KBD birçok çalışmanın, hayvanın tüm hayatı boyunca sürdürülememesinden dolayı, süre sınırlı olması veya planlanması nedeniyle çalışma

süresi boyunca kendiliğinden iyileşemeyen defektler şeklinde de tanımlanabilmektedir (Schmitz ve Holinger, 1986).

2.3. Greft materyalleri

Kemik grefti uygulamalarında, alıcı dokunun greft ile birleşmesi bir dizi olay sonucunda gerçekleşir. Bu olay inkorporasyon olarak tanımlanır. Inkorporasyon, transplantın alıcı tarafından kabulünün göstergesidir. Yeterli inkorporasyonda, greft alıcı birleşim yerinde kallus ve grefte internal onarım gözlenir (Hollinger Klenschmidt, 1990; Durmuş ve Ünsaldı, 2001).

İdeal bir greft, dokularla tamamen uyumlu ve biyolojik olarak inert olmalı, kolay bulunmalı, güçlü olmalı, kolayca şekillendirilebilmeli ve çeşitli defektlerle adapte edilebilmelidir. Hastanın dokusu tarafından kabul edilip birleşebilmeli ve enfeksiyon oluşumuna yol açmamalıdır. Yüksek oranda permeabilitesi ve poröz yapısı olmalı, por yapısı birbirleriyle ilişkili olmalıdır (Guileminve ark., 1989; Waite ve ark., 1989).

2.3.1. Kemik grefti ve greft materyali tipleri

Otojen kemik greftleri: Aynı bireyde bir yerden başka bir bölgeye transfer edilen greft türüdür. Canlı hücre içermesi dolayısıyla osteojenik potansiyele, osteoindüktif, osteokondüktif kapasiteye ve yabancı cisim reaksiyonuna sebep olmamaları bu grup greftleri en uygun greft materyali kılmaktadır. Otojen kemik greftlerinin inorganik kısmı (hidroksiapatit) grefte sertlik, organik kısmı (kollajen) ise devamlılık ve sağlamlık sağlamaktadır. (Lindhe ve ark., 2009; Bagheri ve ark., 2011; Torabinejat ve ark., 2013).

Kortikal kemik greftleri: Çoğunlukla osteokondüktif özelliklere sahiptirler. Kortikal kemiğin poröz yapıda olmaması nedeniyle vasküler yapının grefte invazyonu güçtür ve uzun sürede gelişir. Yeni kemik oluşum alanları nekrotik kemik alanları etrafında meydana gelebilir (Milorio ve ark., 2004; Torabinejat ve ark., 2013).

Kansellöz kemik greftleri: Büyük çoğunluğu trabeküler kemik dokusundan oluşur. Çok sayıda canlı hücre içeren, kolayca ve hızla yeniden damarlanan ve implant yerinde hızlı kemik üretimi sağlayan greftlerdir. Yeterli sertliğe sahip olmamaları

nedeniyle kemik duvarları gibi sert bir iskelet gerektirmeleri dezavantajlarıdır (Milorio ve ark., 2004; Torabinejat ve ark., 2013).

Kortikokansellöz kemik greftleri: Kortikal ve trabeküler kemik dokusundan oluşmaktadır, osteoblast ve osteoprojenitör hücre bulundurmaları nedeniyle ideal özelliklere sahip greft türüdür (Milorio ve ark., 2004; Torabinejat ve ark., 2013). Otojen greftlerin; heterogreft ve allogreftlere göre, iki ayrı operasyon sahası gerekliliği, enfeksiyon riski ve operasyon sonrası daha uzun iyileşme süresi dezavantajları mevcuttur (Torabinejat ve ark., 2013).

2.3.2. Kemik Morfojenik Proteinleri (BMP)

Kemik morfojenik proteinler kemik hücrelerinden olduğu gibi yumuşak dokulardan da fazla miktarda salgınmaktadır. Bu proteinler, kondrojenik ve osteojenik hücrelerin çoğalmasını ve farklılaşmasının artışı sağlamaktadır. Osteoblastik hücreler, kemik morfojenik proteinlerine kollajen, osteokalsin ve kollajen yapıda olmayan diğer proteinlerin sentezinin artışı ile cevap vermektedir (Kim ve ark., 2012). Aseptik kemik nekrozu ve kritik kemik defektleri gibi olgularda, kemik morfojenik proteinleri çevre dokuların doğal iyileşme yeteneğinin arttırmada kilit rol oynamaktadır. Bu moleküller, mezenşimal kök hücrelerin ortamda yeteri miktarda olduğu durumlarda, kemik oluşum sürecinde projenitör hücreleri hasarlı doku onarımına yönlendirmektedir (Calori ve ark., 2009). Kemik morfojenik proteinlerinin bugüne kadar, farklı fonksiyonlara sahip 20 adet üyesi tanımlanmıştır. BMP-2, 3, 4, 6 ve 7, kemik oluşumunu arttırıcı etkiye sahipken, BMP-1'in TGF- β 'ya benzememesi nedeniyle diğer BMP'lerden farklıdır ve prokollajenin kollajen liflere dönüşümünü sağlayan prokollajen C-proteinazı ile özdeş olduğu gösterilmiştir (Bragton ve ark., 2011). BMP-1 diğer astasin metalloproteinaz ailesi üyeleri gibi hücrelerarası matriks olgunlaşması için öncü maddeleri, TGF- β , BMP-2 ve BMP-4 gibi büyüme faktörlerini yönlendirerek morfogenezi düzenler (Grgurevic ve ark., 2011). BMP-1'in temel etkisinin hücrelerarası matriks yapısında bulunan tip I ve tip III kollajen fibrillerin üretiminde olduğu öne sürülmüştür (Li ve ark., 1996). Bunların dışında TGF- β , BMP-2 ve BMP-4'ün inhibitörü olan "chordin"i inaktive ederek de kemikleşme sürecini potansiyel olarak etkilemektedir (Asharini ve ark., 2012). Bazı çalışmalarda (Smiler ve ark., 1992; Zhang ve ark., 1997) piyasada satılan greftlerin BMP konsantrasyonundaki değişikliğine dikkat çekilerek DBM'nin

osteoindüktif potansiyelinin bir kadavradan diğerine değişebileceğini bildirerek, ürünün fabrikasyonu sırasında demineralizasyon sürecinin de osteoindüktiflik üzerinde etkisi olabileceği sonucuna varmışlardır. Buna ilaveten, sterilizasyon amacıyla etilen oksit kullanımının BMP'lere yıkıcı bir etkisi olabileceği de düşünülmektedir (Zhang ve ark., 1997) DBM; osteoindüktif etkisi üzerinde devam eden tartışmalara rağmen ortopedide tek başına ya da diğer kemik greft materyalleri ile birlikte sık olarak kullanılmaktadır (Khan ve ark., 2000; Sassard ve ark., 2000; Sohn ve ark., 2009). BMP'lerin yumuşak dokularda endokondral olarak kemik formasyonu yaptığı birçok hayvan çalışmasında gösterilmiştir (Alpaslan ve ark., 1996; Omura ve ark., 1998; Fujimoro ve ark., 2001). BMP'lerin bir taşıyıcı ile birlikte kullanılmalarıyla; mezenşimal hücrelerin, aktive edilerek migrasyonlarına ve osteoblastlara dönüşmelerine, kemik matriksinin şekillenmesine ve bu matriksin mineralizasyonuna ayrıca kemik iliği oluşumuna neden oldukları gösterilmiştir (Ripamonti ve Duneas, 1998; Reddi, 2000).

Kemik morfojenik proteinler, osteoindüksiyon özelliklerinin anlaşılabilmesi için ektopik bölgelere implante edilmişlerdir (Alpasan ve ark., 1996; Omura ve ark., 1998; Ripamonti ve Duneas, 1998). Ma ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada rhBMP-2, Mercan ve kollagen tip 1den istenilen şekilde ektopik otojen kemik içeren, vaskülarize flepler elde edilmiştir. BMP'ler fizyolojik ortamda çözülebildiğinden dolayı implantasyondan çok kısa bir süre sonra ortamdan uzaklaşmaktadır (Yokoa ve ark., 2001). Taşıyıcı olmadan BMP'lerin yüksek oranlarda kemik oluşumunu provoke etmesi bu nedenden dolayı mümkün olmamaktadır (Omura ve ark., 1998).

Taşıyıcının implantasyondan sonra BMP'leri salgılanması ve greftin tamamen yeni oluşan kemikle yer değiştirmesi için rezorbe olması arzulanan özelliğidir. Taşıyıcı kemik oluşmu ile orantılı olarak rezorbe olmalıdır. Taşıyıcı çok hızlı olarak rezorbe olursa BMP'ler ortamdan kısa sürede uzaklaşabilmekte sonuçta implante edildiği yerde yeterli indüksiyonunun yapılamamasına ve ektopik kemik oluşmasına, aksi durumda yani taşıyıcının rezorbsiyonu gecikirse bu defa implant genişlemekte ve eksoztoz oluşabilmektedir (Groeneveld ve ark., 2000).

2.3.3. Allogreft ve Heterogreftler

Allogreftler, genetik olarak farklı fakat aynı türden; heterogreftler ise hem genetik hemde farklı tür canlılardan elde edilen greft türüdür. Allogreftler ve heterogreft materyalleri genellikle, dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (freeze dried bone allograft; FDBA/FDB/DKKA) ve demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (demineralized freeze dried bone allograft; DFDBA/DFDB/DDKKA) olmak üzere iki türü kullanılmaktadır ve değişik fiziki formlarda üretilmektedirler. Allogreftler ve heterogreftler elde edilirken, değişik kimyasal ve fiziksel işlemlere tâbi tutulmaktadır (Grover ve ark., 2011). Bu işlemlerle, greftin biyolojik özellikleri korunurken, antijenik bileşeni azaltılarak veya ortadan kaldırılarak allerjik özellikleri azaltılabilmektedir (Bagheri ve ark., 2011). Allogreftlerin, nakil yapılacağı doku ile olan fiziksel ve biyolojik benzerliği gibi avantajlarının yanı sıra, enfeksiyon geçişi, doku reaksiyonu oluşturma, büyük defektlerdeki başarısının sınırlı olması ve osteogenez için canlı hücre içermemesi gibi dezavantajları da mevcuttur (Torabinejat ve ark., 2013).

Allogreftler, üretim yöntemine bağlı olarak bir miktar osteoindüktif kapasiteye sahip olsa da, genelde osteokondüktiftir. DFDBA'ler, kortikal kemiğin dekalsifikasyonu ile elde edilir. Kalsiyum ile fosfat tuzları asitte çözünürken organik kemik matriksinde bulunan BMP'ler korunurlar (Bagheri ve ark., 2011). Bu yüzden DFDBA'nin osteokondüktif ve osteoindüktif etkisinin olduğu bildirilmektedir (Wikesjo ve ark., 2002). "Demineralize dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti veya heterogrefti (DFDBA, DFDBH)" ile "Demineralize Kemik Matriksi (DBM)" terimleri, aynı materyalin farklı meslek grupları tarafından tercih edilen ifade şekilleridir (Zhang ve ark., 1997; Stevens ve ark., 2011). Standart olmayan üretimler nedeniyle DBM ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar farklıdır ve kemik oluşumunu indükleyen etkisi halen araştırılmaktadır (Zhang ve ark., 1997; Truumees ve Herkowitz, 1999; Khan ve ark., 2000).

Allogreftlerle ilgili çalışmalarda, demineralizasyon, dondurma ve kurutma işlemlerinin, kortikal kemiğin osteojenik potansiyelini arttırdığı, kemik uyarma potansiyeline sahip kemik morfojenetik proteinlerinin (KMP) açığa çıkmasına neden olduğu ve bu şekilde kemik oluşumunu arttırdığı görülmüştür (Urist ve ark., 1970; Urist ve ark., 1983). Araştırmacılar (Bowers ve ark., 1985; Francis ve ark., 1995; Bender ve

ark., 2005; Mellonig, 2006) tarafından başlatılan ve günümüze kadar gerçekleştirilen histolojik ve klinik araştırmalarda DDKKA/DKM kullanımının etkili bir tedavi yaklaşımı olduğu ortaya konmuştur. Demineralize kemiğin osteoindüktif yeteneği BMP'lerden kaynaklanmaktadır. Demineralize kemik BMP'lerin bütününe değişik oranlarda bulundurmaktadır (Wolfe ve ark., 1999; Groeneveld ve Burger, 2000; Reddi, 2000). Demineralize kemik matriksinin (DBM) kemik greft materyali olarak yaygın kullanım alanı bulmasına karşın osteoindüktif kapasitesi tartışmalıdır (Niederwanger ve Urist, 1996; Groeneveld ve Burger, 2000). Schwartz ve ark. (1998) tarafından DBM'nin osteoindüktif özelliklerinin az olması yeterli miktarda BMP içermemelerine bağlanmıştır. DDKKA/DKM ile yapılan araştırmalarda farklı sonuçların elde edilmesine neden olarak partikül büyüklüğü, donör farklılıkları ve greft materyalinin içerisinde osteoindüksiyonu başlatacak miktarda KMP'lerinin olmaması ya da inaktif halde olması gibi sebepler gösterilmiştir (Schwarz ve ark., 1996; Boyan ve ark., 2006).

Heterogreftler farklı türler arasında yapılan transplantasyonlarda kullanılan materyallerdir ve bu yüzden, alıcıda allogreftlerden de ciddi immün yanıt oluşmasına neden olur. Son yıllarda, doğal greft materyallerinin en önemli handikapları olan immünojenik yapıları ve bazı hastalıkların transferi gibi problemleri ortadan kaldırmak için semisentetik greft materyallerinin elde edilmesi üzerinde yoğunlaşmıştır (Constantino ve Friedman, 1994; Çılbır, 1999). Tüm protein yapıların uzaklaştırılmış olmasıyla antijenik özellikleri ortadan kaldırılarak uygulandığı doku ile uyumlu hale getirilen deproteinize kemik greftleri önem kazanmış ve osteokondüktif etkileri ile birçok çalışmaya da konu olmuştur (Stassen ve ark., 1994; Hurzeler ve ark., 1998; Artzi ve ark., 2000; Artzi ve ark., 2001; Kasabah ve ark., 2002; Tadjoedin ve ark., 2003). Kullanıma hazırlanırken de antijenitelerinin elimine edilmesi amacıyla oksidizasyon, delipidizasyon, kurutma ve sterilizasyon işlemleri uygulanmaktadır. Elde edilen ürün antijenik olarak zayıftır ancak deproteinize edici bu işlemler, kemik doku içerisindeki büyüme faktörlerini yok ettiği için materyalin sadece osteokondüktif etki göstermesine neden olur (Kao ve Scott, 2007; Jang ve ark., 2010; Hupp, 2013). En sık kullanılan heterogreftlerden biri sığır kemiğidir. Bunun dışında domuz, buzağı, at, koyun gibi hayvanlardan da elde edilebilmektedir (Kökden ve Türker, 1999; Songür ve ark., 2015). Bir diğer alternatif popüler greft ise, mercanlardan elde edilen doğal hidroksiapatittir (Bagheri ve ark., 2011; Torabinejad ve ark., 2013).

Heterogreftlerin deproteinize edilmesi sonucunda organik bileşenleri tümüyle elimine edildiğinden geriye magnezyum, sodyum ve karbonat gibi bazı elementleri içeren poröz hidroksiapatit partikülleri kalır. Heterogreftlerin, otojen greftlere kıyasla büyük miktarlarda kemik elde edilebilmesi ve ikinci bir cerrahi işleme gerek duyulmaması gibi avantajlara sahiptir. Ancak allogreftler gibi osteogenez için canlı hücre içermemesi ve immün cevap oluşturma riski gibi dezavantajları da mevcuttur (Torabinejad ve ark., 2013). Ksenojen greftler tek başlarına osteogenezise katılmazlar ve kemik formasyonunun uyarılmasında zayıf etkiye sahiptirler (Alexander, 1987). Ksenojen greftler farklı türdeki memeli hayvanların kemiklerinden veya deniz mercanlarından (coral=korall) elde edilirler (Guillemin ve ark., 1989; Durmuş ve Ünsaldı, 2001; Durmuş, 2015).

Kollajenize heterolog kemik greftleri (Collagenated Heterologous Bone Graft; CHBG) son yıllarda popüler olan heterogreft türüdür. Yapılan çalışmalarda bu greftin deproteinize sığır kemiğinin aksine, yüksek remodelizasyon hızı ile kemiğe iyi derecede entegre olduğu bildirilmiştir (Nanmark ve Sennerby, 2008; Nanmark ve Azarmehr, 2010; Songür ve ark., 2015).

2.3.4. Alloplastik greftler

Sentetik olarak üretilmiş greft materyalleridir (Jensen ve ark., 2006; Misch, 2008; Torabinejad ve ark., 2013).

Büyüme faktörleri (Growth factor=BF=GF), spesifik hücre yüzey reseptörlerini bağlayarak doku onarımında önemli hücresel olayları regüle eden doğal biyolojik mediatörlerdir. Her bir büyüme faktörünün etkisi, diğer büyüme faktörleri, enzimler ve diğer proteinleri içeren kompleks bir sistem aracılığıyla düzenlenir. Kemik matriksi bu BF'leri ve KMP'ler rezervuarıdır. Matriks metalloproteinazlar tarafından matriks rezorpsiyonu oluşturulduğunda, BF'leri ve KMP'ler aktive olurlar. Buna ek olarak, inflamatuvar süreçte şekillenen asidik ortam mezenşimal hücrelerin çoğalma ve osteoblastlara farklılaşmasını sağlayan BF'lerinin aktivasyonuna neden olmaktadır. Son yıllarda yara iyileşmesinin değişik dönemlerinde farklı BF'leri ve diğer sitokinlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (Bostrom ve ark., 2000; Lindhe ve ark., 2009).

Platelet kaynaklı büyüme faktörün, tavşan tibialarında kırık iyileşmesini uyardığı gösterilmiştir (Nash ve ark., 1994). Kırık iyileşmesine etkili diğer bir faktörde temel fibroblast büyüme faktörü (bFGF) dır (Parikh, 2002).

2.4. Plateletten Zengin Plazma

Plateletten zengin plazmada trombosit oranı yükseltilerek, büyüme faktörlerinin yoğun olarak bölgeye uygulanmasıyla yara iyileşmesi ve rejenerasyonu hızlandırılmaktadır (Carlson ve Roach, 2002). Yani PRP uygulamasıyla bölgedeki trombosit sayısı %300'ün üzerinde arttırılmaktadır (Tözüm ve Demiralp, 2003). PRP yumuşak ve sert dokularda hızlı bir iyileşme sağlaması nedeniyle kısa sürede yaygın olarak kullanıma girmiştir (Tambini, 2001; Epple ve ark., 2004).

PRP hazırlanması

Kaynaklarda değişik yöntemlerden bahsedilmesine rağmen PRP elde etmek için izlenmesi gereken yol aynıdır. Venöz kan alınarak antikoagülan bir madde ile karıştırılır. Elde edilen antikoagülanlı kan santrifüj edilerek kanda bulunan şekilli elemanların ağırlıklarına göre çökmesini sağlar. Ağırlıklarından dolayı eritrositler tüpün alt kısmında birikirken, sırasıyla üst kısımda lökosit, trombosit içeren sarı renkli plazma görülür. Trombositler plazmanın eritrositlere yakın kısmında yoğunlaşır (buffy coat). Bu nedenle özellikle plazmanın eritrositlere yakın kısmının alınması önerilmektedir (Tözüm ve Demiralp, 2003).

PRP'nin kullanım süresi

Platelet kaynaklı büyüme faktörü ve TGF- β 'nin etkilerinin, kan alımını takiben, 4 saat ile 3 gün arasında giderek azaldığı bildirilmiştir (Ferreira ve ark., 2005). Ayrıca trombositlerin agregasyon özelliklerinde de belirgin azalma bildirilmiştir (Kocazeybek ve ark., 2002). PRP'nin kontamine olmasını engellemek için hazırlandıktan sonra hemen veya en geç ilk 6 saat içerisinde kullanımı önerilmektedir (Kassolis, 2000; Kocazeybek ve ark., 2002). Trombositlerden büyüme faktörleri salınımının ilk 3- 5 günde içerisinde olduğu, bu nedenle PRP etkisinin 8-10 gün içerisinde sonlanacağı ileri sürülmüştür (Raghoobar ve ark., 2005). Trombositlerin ve PDGF'lerin etkinliklerinin ilk 5-6 günden sonra kaybolacağı, ancak bunların aktive ettiği

osteoblastların ömrünün yaklaşık 3 ay (Manolagas, 2000) olduğu göz önünde bulundurularak, kemik onarımının hızlı bir şekilde devam edeceğide vurgulanmıştır (Marx ve ark., 1998; Jakse ve ark., 2003).

PRP içindeki başlıca büyüme faktörleri

Son zamanlarda trombosit konsantreleri için global bir sınıflandırma yayımlanmış ve bu ürünler lökosit ve fibrin içeriklerine göre 4 ayrı gruba ayrılmıştır (Dohan ve ark., 2009). Bunlar;

Saf plateletten zengin plazma (pure platelet rich plasma/P-PRP)

Lökosit ve plateletten zengin plazma (leucocyte and platelet rich plasma/L-PRP)

Saf plateletten zengin fibrin (pure platelet rich fibrin/P-PRF)

Lökosit ve plateletten zengin fibrin (leucocyte and platelet rich fibrin/L-PRF)

En önemlileri aşağıda tanıtılmıştır.

Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF/Platelet Derived Growth Factor)

Platelet kaynaklı büyüme faktörü, trombositlerin α granüllerinde depolanır ve pıhtılaşma sırasında salınır. PDGF hemen hemen tüm yara iyileşmelerinde rol alan bir büyüme faktörüdür. PDGF plateleter içindeki birincil büyüme faktörü olmasına rağmen, bu büyüme faktörü monositler, makrofajlar, düz kas hücreleri ve diğer endotelial hücreler tarafından da sentezlenip salınabilir. Kan pıhtısında plateletlerin bulunması sebebiyle, yara iyileşmesinde de birincil büyüme faktörü olarak PDGF salınmakta olup, PDGF revaskülarizasyon, kollajen sentezi ve kemik rejenerasyonunu sağlayan bir büyüme faktörüdür. Plateletler degranülasyona uğrarken, PDGF de yara yerine dağılmaktadır. PDGF'nün etkinliği diğer bazı büyüme faktörlerinin varlığına bağlıdır ve PDGF düz kas hücreleri, fibroblastlar, makrofajlar ve lökositler için kuvvetli bir kemo-atraktif özellik taşımaktadır. PDGF'nün kemikte DNA ve protein sentezini stimule ettiği gibi kemik rezorbsiyonunu da başlattığı bilinmektedir. PDGF hedef hücrelerdeki hücre membran reseptörlerine bağlandığında PDGF'nün etkileri görülmeye başlar. Bu bağlanma ile aktive olan yüksek enerjili fosfat bağının oluşması ve sitoplazmik sinyal proteininin uyarıları ile mitozis, anjiyogenezis ve makrofaj aktivasyonu gibi spesifik

olaylar şekillenir. Böylece iyileşme hücrelerinde mitoz, anjiyogenezis, makrofaj aktivasyonu ile diğer büyüme faktörlerinin salınımı ve hücrelerin organizasyonu gibi spesifik aktiviteler oluşur (Marx ve ark., 1998; Lucarelli ve ark., 2003; Sanchez ve ark., 2003).

Transforme Edici Büyüme Faktörü-Beta (TGF- β /Transforming Growth Factor- β)

Molekül ağırlığı 25000 dalton olan TGF- β birbirine disülfid bağlarıyla bağlı 2 zincirli bir polipeptittir. TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 şeklinde 3 farklı gen ürünü olarak ortaya çıkar. TGF- β 1 kemikte ve plateletlerde yüksek konsantrasyonda bulunurlar ve salgılanır (Marx ve ark., 1998). Ayrıca makrofajlar, osteoblastlar ve diğer bazı hücreler tarafından da salgılanır ve bu hücrelerde de bulunurlar. TGF- β otokrin ve parakrin mekanizmaların her ikisinde de görev alan ana düzenleyici bir moleküldür. Plateletler veya makrofajlar tarafından salındığında, TGF- β 'nin etkilerini; fibroblastlar, kemik iliği kök hücreleri, endotelial hücreler ve preosteoblastları içeren komşu hücreler üzerinde gösterir. TGF- β anjiyogenezis, fibronektin, glikozaminoglikanlar ve konnektif dokudaki kollajen üretimini stimüle eder. TGF- β 'nin en önemli görevlerinden biri osteoblast öncü hücrelerinin kemotaksisi ve mitogenezisini sağlamasıdır. TGF- β bir büyüme faktörü olarak, sadece kemik rejenerasyonunu uyarmaz, aynı zamanda uzun dönem iyileşme ve kemik rejenerasyonunun devamını sağlayarak, kemik greftinin olgunlaşmasına kadar da etki gösterir (Marx ve ark., 1998; Efeoğlu ve ark., 2004).

Trombosit Kaynaklı Epidermal Büyüme Faktörü (PDEGF/Platelet Derived Epidermal Growth Factor)

Platelet kaynaklı epidermal büyüme faktörü ilk tanımlanan büyüme faktörüdür. Epidermal rejenerasyonu ve anjiyogenezisi uyarır. Dermal fibroblast ve keratinosit proliferasyonunu uyarak yara rejenerasyonunu düzenler ve hızlandırır. Diğer BF'lerinin üretimini ve etkilerini destekler (Marx ve ark., 1998; Sanchez ve ark., 2003).

Trombosit Kaynaklı Anjiyogenezis Faktörü (PDAF/Platelet Derived Angiogenesis Factor)

Platelet kaynaklı anjiyogenezis faktörü in-vivo olarak vaskülarizasyonu indüklemeye kapasitesine sahip olan bir faktördür. Direkt ve indirekt yollarla vasküler endotelial hücreleri stimüle eder ve yeni kan damarlarının devaskülarize doku içine invazyonunda rol alır. IGF-I, TGF- β , TGF- α (Transforming Growth Factor- Alfa), PDGF, bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), PDEGF ve IL-1 β (İnterlökin-1 Beta) gibi çeşitli sitokin ve büyüme faktörlerini regüle eder. Bu faktör hipoksi durumunda ile bol miktarda salgılanır (Marx ve ark., 1998; Sanchez ve ark., 2003).

İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü 1 (IGF-1/Insulin Like Growth Factor 1)

İnsülin benzeri büyüme faktörü 1, insülinle % 47 benzerlik gösterir. Kemik formasyonunda osteoblastlar tarafından salgılandığı ve bu yolla osteoblastları sayısını ve dolayısıyla yeni kemik depozisyonunu artırdığı düşünülmektedir. Kıkırdak büyümesi, kemik matriksi formasyonu, osteoblastlar ve osteoklastların replikasyonunu stimüle eder. IGF-1 hücreleri direkt stimüle edebilir. Osteoblastik hücrelerde alkalen fosfatazi aktive eder ve artırır. IGF-1, PDGF ile kombine olarak çalıştıklarında yara iyileşmesinin kalitesini ve hızını arttırabilir (Marx ve ark., 1998; Sanchez ve ark., 2003).

Trombosit Faktör 4 (PF-4/Platelet Factor 4)

Platelet faktör 4 nötrofiller için bir kemoatraktandır ve α granüllerinden salınarak nötrofillerin yara bölgesine ilk ulaşmasından kısmi olarak sorumlu olabilir. Ayrıca fibroblastlar için de bir kemoatraktan olarak hareket eder ve kuvvetli bir antiheparin ajanıdır (Marx ve ark., 1998; Sanchez ve ark., 2003).

Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF/Fibroblast Growth Factor)

Fibroblast büyüme faktörü anjiyogenezis, endotelial hücre proliferasyonu, kollojen sentezi, yara kontraksiyonu, matrix sentezi ve epitelizasyonunu uyarıcı etki göstermektedir (He ve ark., 2009).

Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF/Vascular Endothelial Growth Factor)

Anjiogenezi stimule eder. Ayrıca damarsal hiperpermeabilite sağlayarak endotelyal hücrelerin kemotaksisi ve proliferasyonu üzerinde etkili bir faktördür. VEGF'ün dört izoformu bulunmaktadır (He ve ark., 2009).

Epitelyal Büyüme Faktörü (EGF/Epithelial Growth Factor)

Epitelyal büyüme faktörü, endotelyal hücreler, fibroblastlar, renal hücreler, mezenşimal hücrelerden kaynaklanan glial hücreler üzerinde mitojenik, proapoptik ve migrasyonu ile farklılaşma aktivitesini destekleyici potansiyele sahiptirler, epitelizeasyonu da desteklerler (Ott, 2010).

Platelet kaynaklı büyüme faktöründeki büyüme faktörlerinin miktar ve salınımını değerlendiren literatürde bazı çalışmalar mevcuttur. Eppley ve ark.(2004) yaptığı bir çalışmada, büyüme faktörlerinin konsantrasyonlarının trombosit miktarındaki artışa bağlı olarak yükseldiği ve elde edilen PRP deki birçok büyüme faktörünün konsantrasyonunun, tam kandakinden daha yüksek olduğu belirtilmiştir. He ve ark. (2009) yapmış olduğu in vitro çalışmada, fare osteoblastlarının farklılaşması ve proliferasyonu üzerinde PRP'nin etkilerini Plateletten zengin fibrin (PRF) ile karşılaştırmalı olarak incelemişler ve PRP'den salınan TGF- β 1 ve PDGF-AB seviyelerinin ilk gün en yüksek seviyede olduğunu ve gittikçe salınımın azaldığını rapor etmişlerdir. Marukawa ve ark. (2011) yaptıkları bir çalışmada, PRP'deki büyüme faktörlerinin konsantrasyonunun serumdakinden 2-3 kat fazla olduğunu belirtmişlerdir.

Tavşanlarda kemik metabolizmasının göz önüne alındığında greft çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi için 8 haftalık bir sürenin yeterli olacağı belirtilmiştir (Misch, 2008; Stübinger ve Dard, 2013). Canlının yaşam süresince kendiliğinden iyileşmeyen KBD'nin onarımında hayvanın türü, yaşı, defektin anatomik bölgesi, unikortikal veya bikortikal olması, stabilitesi ve periostun varlığı veya yokluğu kemik onarımının kalitesini ve miktarını etkilemektedir (Aaboe ve ark., 1995).

2.5. Kemik Yapımı (Osteogenesis)

Kemik dokusu mikroskopik olarak iki ayrı fenotipten oluşmaktadır: primer (olgunlaşmamış ya da woven) ve sekonder (olgunlaşmış ya da lamellar) kemik (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Little ve ark., 2011). Kemik dokunun gelişimi sırasında iki farklı kemik oluşum mekanizması görülmektedir (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Little ve ark., 2011).

Mezenşimal hücrelerin direkt olarak osteoblastlara farklılaşması ve kemik oluşturması ile meydana gelen membranöz ya da intramembranöz kemikleşme, kafa iskeleti gelişiminde, aynı zamanda maksilla ile mandibula morfogenezinde ve kırık iyileşmesinde görülmektedir (Sommerfeldt ve Rubin, 2001). Mezenşimal hücrelerin kırıkta benzeri matriks sentezlemesi sonucu kondrositlere farklılaşması durumuyla, şekillenen oluşum sürecine endokondral kemikleşme denir. Uzun kemiklerin oluşumunda ve kırık iyileşmesinde bu tür kemikleşme görülmektedir (Little ve ark., 2011).

2.6. Kemik Şekillenme ve Yeniden Şekillenmesi (Modelling ve Remodelling safhaları)

Şekillenme safhası, rezorpsiyon olmaksızın başlangıç kemik yapısındaki değişim sürecidir ve mekanik yükleme gibi dış faktörler bu safhayı başlatabilmektedir. Bunun tipik örneği, uzun kemiklerin uzunlamasına büyüme evresinde görülmektedir (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Lindhe ve ark., 2009). Diğer taraftan yeniden şekillenme safhası, kemik dokunun yapısı bozulmadan osteoklastik rezorpsiyonu takiben osteoblastik aktivite ile dokuda meydana gelen değişimdir (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Lindhe ve ark., 2009).

Kemik oluşumu ve eski kemik dokusunun yeni kemik dokusuyla değişimi esnasında yeniden şekillenme safhası önemlidir (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Little ve ark., 2011). Kemik oluşumunda bu safha, sadece ölü ya da hasarlı dokunun tamirini değil, düşük yükleme dayanıklılığı kapasitesine sahip primer kemiğin yerini, yükleme dayanıklılığı fazla olan sekonder kemiğin almasını ve metabolik ya da beslenme ile ilgili

değişimlere cevabı da sağlamaktadır (Sommerfeldt ve Rubin, 2001; Lindhe ve ark., 2009).

2.7. Kemik İyileşmesi

Kemik rejenerasyonunda, kemik oluşturan hücre kaynağı ya da kemik oluşturan hücrelere farklılaşabilen hücrelerin varlığı, mezenşimal hücrelerin osteoblastlara farklılaşmasını başlatan osteoindüktif uyarının varlığı, osteoprogenitör hücrelerin osteoblastlara farklılaşıp üzerinde kemik oluşturduğu osteokondüktif çevrenin varlığı, üç temel esastır (Lindhe ve ark., 2009).

Kemik iyileşmesinin regülasyonu

Kemik iyileşmesi regülasyonunda BF'leri ve sitokinler rol oynamaktadır. BMP'ler, TGF- β , PDGF, IGF'leri, FGF'leri, ve VEGF en önemli büyüme faktörlerindendir. İntramembranöz kemikleşmeyi sağlayan ve kırıkta şekillenmesini etkileyen bu faktörler iyileşme süreci boyunca osteoblastlar ve kondrositlerde de bulunmaktadır (Bostrom ve ark., 2000).

Kemik rejenerasyonu, fibrin ağı şekillendikten sonra, trombositlerden PDGF ve TGF- β salınımı ile başlar (Yu ve ark., 1997). PDGF kemik iliğindeki mezenşimal hücrelerde mitogenezi ve osteoblastlarında sayılarını artırarak greft alanına göçünü sağlar. Aynı zamanda endotelial hücre bölünmesi uyararak, greft alanında da anjiyogenezisi başlatır. TGF- β ise fibroblast ve preosteoblastların mitogenezisini provoke ederek sayıca çoğalmalarını ve farklılaşarak olgun osteoblastlara dönüşmelerini sağlar. TGF- β 'nın ortamdaki varlığının devam etmesi fibroblastları etkileyerek kollajen matriks oluşumuyla kemik matriksinin olgunlaşmasını sağlar. Takiben üçüncü günde kapiller damarlar greft içine invaze olmaya başlar ve 2 ila 3'üncü hafta başında greftin kapiller ağı oluşmuş olur. Böylece bölgedeki hücrelere gereken enerji ve besin sağlanır. BF'ler bu hücrelerin hızla çoğalmalarını ve aktive olmalarını sağlar (Marx ve ark., 1998). Trombositlerin ömrü kısa olduğu için BF'lerin işlevsellik süresinde doğrudan etkilemektedir. Kemik rejenerasyonu iki mekanizma ile devam eder. Birincisi kemik iliği mezenşimal hücrelerinin uyarılması ile osteoblastların oluşumu ve osteoblastlardan da TGF- β salınımıdır. İkincisi ise; makrofajların bölgeye göç edip trombositlerle yer

değiştirmesi ve 3'üncü günden itibaren onların görevini devralarak BF'lerin yeni kaynağı olmasıdır (Mustoe ve ark., 1989; Pierce ve ark., 1992).

Bu aşamadan sonra PDGF ile aynı etkilere sahip makrofaj kaynaklı büyüme faktörleri ve anjiyogenik faktörler devreye girer aradaki yegane fark bu faktörlerin trombositlerden değıl de makrofajlardan salınmalarıdır. Kemik iliğı mezenşimal hücreleri, otokrin etki ile, TGF- β salgılamaya devam ederler (Marx ve ark., 1998). Makrofajlar ortamdan ayrılırken bu arada immatür osteoid doku şekillenir. Kemik greftinin havers sistemini içeren olgun lameller kemiğe dönüşmesinde ise osteoid dokudan salınan BMP'ler rol oynar. Yeni oluşan matriksten salınan BMP'ler komşu kemik mezenşimal hücrelerinin çoğalarak osteoblastlara dönüşmesini, kemik matriksin sentezini ve mineralizasyonunu sağlarlar (Marx ve ark., 1998).

Primer kemik iyileşmesi

Primer kemik iyileşmesi, tamamen stabilize bir kırık (yaş ağaç kırığı) örneğindeki gibi kortikal teması olan kırıklarda veya fragmanların direkt kortikal temas olacak şekilde anatomik redüksiyonu sağlandığında gerçekleşen iyileşmedir (Sommerfeldt ve Rubin 2001; Lindhe ve ark., 2009). Bu tür iyileşmede fragmanlar arasında kesin stabilite sağlandıktan sonra kallus formasyonu olmaksızın kemik doku yeniden şekillenerek iyileşmektedir (Little ve ark., 2011).

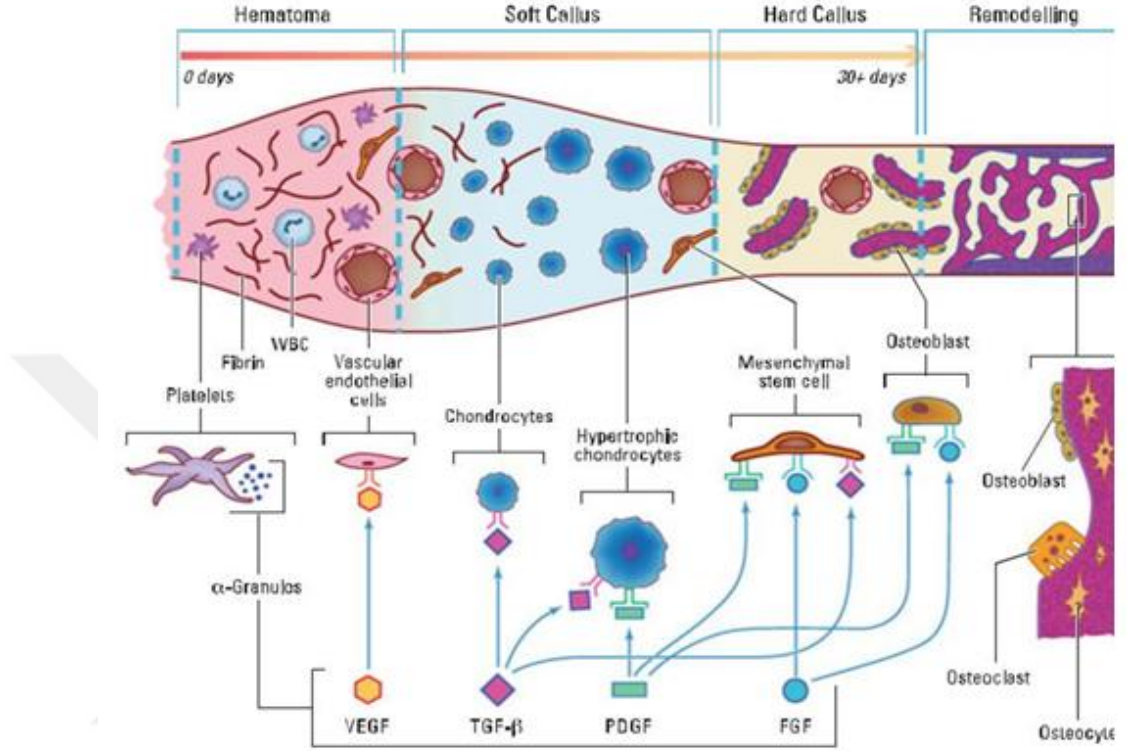
Sekonder kemik iyileşmesi

Sekonder kemik iyileşmesi, fragmanlar arasında stabilite sağlanamadığında ya da segmental bir kırık olduğunda kemik dokusunun kallus formasyonu ve tamir mekanizması ile iyileşmesidir. Bu iyileşme; inflamasyon evresi, proliferatif evre, olgunlaşma ve yeniden şekillenme evresi olarak 4 evrede gerçekleşir.

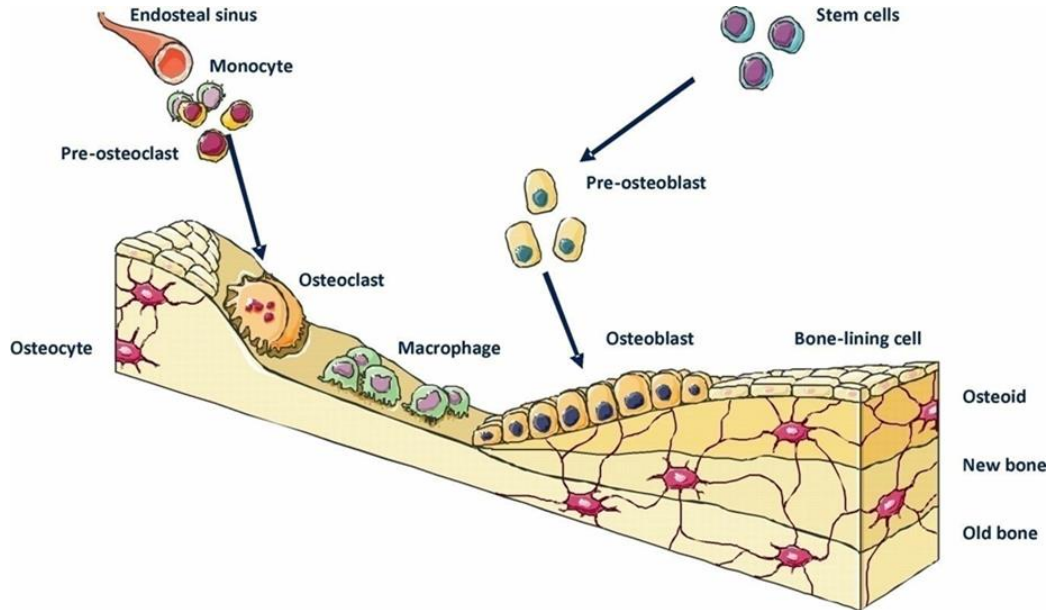
İnflamasyon ya da granülasyon dönemi

Travmanın hemen sonrasında kemikten ve yumuşak dokudan gelen kanama, hematoma ve fibröz bir kan pıhtısının oluşumuna neden olarak, aktive olmuş trombositlerin, fibronektin, PDGF ve TGF gibi birçok büyüme faktörünün salınmasına yol açar.

İnflamatuar hücrelerin salınımı ve ardından sitokinlerin katkısıyla devam eden bu evre kırık bölgesine fibroblastlar, endotelial hücreler ve osteoblastlar gibi tamir hücrelerinin gelmesi ile sonlanır (Bostrom ve ark., 2000).



Şekil 2. Kemik iyileşmesinde büyüme faktörleri ve hücresel etkileşim



Şekil 3. Kemik yıkım ve onarım döngüsü

Proliferatif dönem (Fibrokartilaginöz kallus oluşumu)

İyileşmenin birinci gününden 7-10. gününe kadar olan bu evre, kıkırdak dokuyu da içeren bağ dokusu ve yeni kapiller oluşumu (anjyogenez) ile karakterizedir (Bostrom ve ark., 2000).

Olgunlaşma ya da şekillenme dönemi (Osseus kallus oluşumu)

Bu dönemde, iyileşmenin 2. haftasının ortalarında direkt olarak mezenşimal dokudan (intramembranöz yolla) ya da kıkırdak dokudan (endokondral yolla) primer kemik oluşumu gerçekleşmektedir. (Bostrom ve ark., 2000).

Yeniden şekillenme dönemi (Remodelling devresi)

Bu dönemde primer kemik, sırasıyla osteoklastik kemik rezorpsiyonu ve osteoblastik kemik formasyonu ile daha sert olan sekonder kemiğe dönüşmektedir (Bostrom ve ark., 2000).

2.8. Graft Materyalinin Alıcı Kemik ile Kaynaşması ve Rejenerasyonu

Kemik grefti ile bağımsız bir vasküler kaynağın varlığı, revaskülarizasyonun hızını ve kalitesini optimize ederek, kemik greftinin uygun bir şekilde iyileşmesi ve daha hızlı bir şekilde birleşmesi ve kaynaşması ile sonuçlanabilir (Stevenson, 1999). Nonvaskülarize kemik greftlerinde revaskülarizasyon temel olarak alıcı bölgedeki kemik yapıda bulunan kan damarlarının greftin içine doğru gelişmesiyle olmaktadır. Kan damarlarının bu şekilde büyümesi düşük bir hızda oluşmaktadır ve bu yüzden de vaskülerize bir greft materyaline nazaran nonvaskülarize greftin iyileşmesi uzamaktadır.

Bununla birlikte flep gibi vaskülerize kemik grefti kullanımının teknik hassasiyet gerektirmesi ve doku hasarı oluşturabilmesi sebebiyle dental implant yerleştirilmesi için gerekli olan küçük veya orta değerdeki alveoler augmentasyonlarda kullanımı önerilmemektedir. Bu sebepten dolayı alıcı-greft kaynaşması kemik greftinin alıcı bölge kemiğine fikzasyonu ve stabilizasyonu yoluyla sağlanabilir. Bu uygulama şekli greft materyali-alıcı kemik ilişkisinin maksimum olması ve damarların greft içerisine doğru başarılı bir şekilde büyümesinden emin olma açısından oldukça önemlidir.

Kemik dokusu büyük bir rejenerasyon yeteneğine sahip olmasına rağmen bazı durumlarda kemik defektlerinde yeterli bir iyileşme olmamaktadır. KBD'nin gereği şekilde onarılmadığı durumlarda bölgedeki kemik oluşumunun istatistiksel olarak yetersiz kaldığı bildirilmiştir (Görmez, 2008). Kemik greftlemesi osteogenez, osteoindüksiyon ve osteokondüksiyon olarak adlandırılan üç farklı biyolojik süreç içermektedir. Farklı greft materyalleri kullanıldığında kemik greftleri bu süreçlerden birini, ikisini ya da üçünü birden gerçekleştirerek kemik oluşumunu sağlarlar (Soost ve ark., 2001; Lindhe ve ark., 2009; Bagheri ve ark., 2011).

Osteogenezis; osteogenezis greftin uygulandığı bölgedeki lokal kemikte bulunan yada greft kemiğinden kaynaklanan osteoprogenitor hücrelerin yeni kemik oluşturması olarak tarif edilebilir. Osteogenetik yani kemik oluşturabilen greftler çok etkili ve elde edilecek sonuçları yüksek oranda tatmin edilebilir greft materyalleri olup aynı zamanda osteokondüktif ve osteoindüktif olma avantajlarını da taşımaktadırlar. Gerçekte otojen kemik greftleri osteogenetik özelliğe sahip en iyi greft materyali olarak bilinmektedir (Albrektsson ve Johansson, 2001).

Osteoindüksiyon; differansiye olmamış pluripotent kök hücrelerin kemik yapıcı hücrelere farklılaşmasının stimülasyonu sürecini içermektedir (Albrektsson ve Johansson, 2001). Kemik morfogenetik proteinler en çok bilinen osteoindüktif ajanlardır. BMP'leri, TGF- β üst ailesine ait glikoproteinlerdir (Albrektsson ve Johansson, 2001). Osteoindüktif kapasiteye sahip çok sayıda BMP bulunmaktadır ve bunlardan BMP-2, 6, 7 ve 9 en etkili olanlarıdır. Bu proteinlerin varlığında kemik formasyonunun endokondral ossifikasyon yoluyla oluştuğu kabul edilmektedir (Keating ve McQueen, 2001).

Osteokondüksiyon; greft materyalinin bir özelliği olup, hücrelerin migrasyonuna izin vermesi ve kan damarlarının greft materyalinin içine ve yüzeyine büyümesi gibi özelliklerdir. Greft materyali biyoinert bir özelliktedir ve greft materyali vasküler büyüme ve kemik formasyonu için sadece yapısal bir platform (scaffold) oluşturmaktadır. Sadece osteokondüktif özelliğe sahip olan bir greft kemik formasyonunu başlatamaz ve dolayısıyla kemik formasyonu oluşturmaz (Albrektsson ve Johansson, 2001).

2.9. Kemik Defektinin İyileşmesi ve Graft-Kemik Birleşmesi Mekanizması

Kemiğe uygulanan greft materyalinin uygulanan kemik dokusu ile kaynaşması, kemik kırığının iyileşmesi ile benzerlikler göstermektedir. Kırık iyileşmesi, kırılan kemik dokusunun önceki fiziksel ve mekanik özelliklerini geri kazanmasını sağlayan bir süreç olup, birçok faktörden etkilenebilmektedir. Temel olarak bakıldığında, iyileşme birbiriyle sıkı ilişki içinde olan ve birbirini sıkı takip eden ancak birbirinden farklı olarak yangı, onarım ve remodelling olmak üzere üç aşamada meydana gelmektedir (Buckwalter ve ark., 1996; Stevenson, 1999; Vaananen ve Zhao, 2002; Garg, 2004).

Hem kırıklar hem de kemik greftinin transplantasyonu, bölgesel damarlarda yaralanma ve dolayısıyla kanama ve hematoma oluşumu ile sonuçlanır. Bu kanama, pıhtılaşma aşamasını aktive eder ve daha sonra fibrin-pıhtı aşamasını başlatır. Bu aşamadan sonraki devam eden bir hafta içerisinde, enflamasyon cevabı oluşur ve inflamatuvar hücreler olan makrofajlar, monositler, lenfositler ve çok çekirdekli hücreler ile fibroblastlar prostoglandin salgılanması eşliğinde kemiğe invaze olurlar. Bu durum granülasyon dokusunun formasyonuna, vasküler dokunun gelişmesine ve mezenşimal hücrelerin migrasyonuna yol açar. Primer beslenme ve oksijen kaynağı açık kansellöz kemik ve kas tarafından sağlanır. Onarım aşamasında, fibroblastlar bir stroma oluşturarak vasküler gelişime destek olur, periosteum ve endosteumdaki kemik dokusundan hematoma içine kapillerler ve mezenşimal hücreler girer, böylece granülasyon dokusu gelişimi başlar. Vasküler gelişim ilerledikçe, kollajen matriks salgılanırken osteoid doku da salgılanır ve daha sonra mineralize olur ki bu olaylar onarım yerinin çevresinde kollajen ve glikoproteinlerden oluşan matriks içinde fibroblast, osteoblast, kondroblastlar ve gelişen kapiller damarları kapsayan yumuşak kallus formasyonuna yol açar. İyileşme aşamasının ilk 4-6 haftasında bu kallus oldukça kuvvetsizdir. Nihayetinde, kallus ossifiye olarak kırık parçaları arasında woven kemiğinden bir köprü oluşturur. (Kalfas, 2001; Roden, 2010).

İyileşme başlangıcından 4-6 hafta sonra sert kallus oluşumu yani rejenerasyon başlar. Kırık yada defekt iyileşmesi yeniden şekillenme aşamasında tamamlanır. Rejenerasyon olayında kallus kademe kademe woven kemiğine dönüşür ve artık düzensiz kemik yapımı başlar. Dönem ilerledikçe hücre sayısındaki artış ve damarlanma devam ederek revaskülarizasyon gelişir. Düzensiz olan bu kemik yapının, eksternal

kallusun süreç içerisinde, osteoklastlar tarafından ortamdan uzaklaştırılmasıyla düzenli kemik yapımı başlar. İntermedial kallus ise hawers sistemi içeren lameller kemiğe dönüştür böylece kansellöz kemik oluşur. Yeniden şekillenme sahasında vaskülarizasyonun normale dönmesi ile birlikte dokudaki oksijenlenme de normalleşir ve bu safha birkaç yıl sürer. Remodelling aşamasında tamir edilen yada iyileşen kemik, kendisinin ilk orjinal şeklindeki yapı ve mekanik dayanıklılık özelliklerini geri kazanır. Remodelling aşaması oldukça yavaş bir hızda devam eder ve bu dönem aylar (3-6 ay) hatta yıllar alabilir (Kalfas, 2001; Roden, 2010).

Kemik grefti uygulamasından sonraki ilk 2 haftada, kortikal ve kansellöz greftlere karşı oluşan cevaplarda çok küçük farklılıklar oluşmaktadır. Temel farklılık vaskülarizasyondur. Kansellöz kemik tamamen olacak şekilde ya da en azından kemik bölümü transplantasyondan saatler sonra genel olarak yaralı alıcı kemik damarları ile greft damarları arasındaki anastomozlar sebebiyle revaskülarize hale gelir. Aynı zamanda kansellöz kemikte mevcut olan açık durumdaki kemik iliği boşlukları sebebiyle de revaskülarizasyon olmaktadır. Kansellöz greftlerin tam olarak vaskülarizasyonu iki hafta içinde tamamlanabilir. Ancak kortikal kemikteki revaskülarizasyon oldukça düşük bir hızda devam eder. İki hafta içinde osteoklastlar, yeni vasküler kaynağın oluşumunu sağlarken oluşturduğu kanallarlada kortikal greft delikli hale gelir ve bu süreç altı hafta içinde tamamlanır (Kahnberg, 2005).

Allogreftler, kemik rejenerasyonunu esas olarak osteokondüksiyon kısmen de osteoindüksiyon yoluyla sağlayan greftlerdir (Urist ve Strates, 1970; Boyan ve ark., 2006).

Günümüzde kullanılan allogreftler ve heterogreftler dondurulmuş kurutulmuş kemik allogrefti (DKKA), DDKKA ve dondurulmuş kansellöz kemik allogreftidir. Minamide ve ark. (1999) tavşan posterolateral lomber intertransvers füzyon modelinde, tip I kollajen ve rekombinant KMP'ni sığır kemiği ile taşıdıkları bir model ile otojen kemik greftini karşılaştırdıkları bir çalışmada tarif ettikleri model ile otogreftten daha başarılı füzyon elde ettiklerini bildirmişlerdir. Li ve ark. (2005) domuz anterior interbody füzyon modelinde sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss) ile otojen greftten daha başarılı füzyon elde ettiklerini hem histolojik hem de radyografik (mikro-CT) olarak göstermişlerdir.

Köpeklerde deneysel tibia kırıklarında DBM allogrefti uygulanan bir çalışmada (Tiedemen ve ark., 1991). Onikinci haftada histolojik değerlendirmelerde greftlenen grupta bol miktarda yeni kemik şekillenmesi, boş bırakılan kontrol grubunda ise minimal kemik oluşumu ve fibröz doku oluşumu gözlenmiştir.

Ratlarda kemik defektlerine sığır kaynaklı kemik grefti (SKKG), SKKG ile rezorbe olabilen membran, dekalsifiye dondurulmuş kurutulmuş allogreft, sığır kaynaklı kompozit kemik grefti ve otojen kemik grefti uygulanmıştır. İki ay sonra kemik oluşumunun en çok otojen kemik grefti kullanılan ratlarda olduğu bildirilmiştir (Mokbel ve ark., 2008).

Nolff ve ark. (2009) Holstein ırkı ineklerde segmental mandibula rezeksiyonlarında bir grupta β -trikalsiyum fosfat (β -TCP) greft, diğer grupta ise β -TCP greft + kansellöz kemik + kemik iliği kullanmışlardır. Sonuç olarak kansellöz kemik ve kemik iliği kullanılan grupta normal çene kemiği formuna çok yakın bir iyileşme ve greftlerin tamamına yakınında rezorbsiyon gözlemlendiğini bildirmişlerdir.

Tavşanlarda kalvaryal defektlere otojen kemik grefti, deproteinize sığır kaynaklı kemik grefti ve iki grefti farklı oranlarda karıştırarak uygulanan bir çalışmada (Pripatnanont ve ark., 2009) 2 ay sonra en yüksek kemik oluşumunun otojen kemik grefti uygulanan alanda olduğunu bildirilmiştir.

Athanasiou ve ark. (2010) tavşanlarda oluşturdukları KBKD'lerinde otojen greft, insan kaynaklı greft, sığır kaynaklı kansellöz greft, kalsiyum fosfat hidroksiapatit ve kalsiyum sülfat greftleri uygulamışlardır. İmplantasyon sonrası birinci, 3. ve 6. aylarda yapılan histolojik incelemelerde en başarılı sonuçların sırasıyla otojen kemik grefti ve sığır kaynaklı kemik greftinden alındığını belirtmişlerdir.

Kluppel ve ark. (2013) tavşanlarda yaptıkları bir çalışmada kontrol grubuna otojen kemik grefti, deney gruplarına ise sırası ile geniş, orta ve küçük partikül boyutlu anorganik sığır kaynaklı kemik greftleri uygulamışlar ve 60. günde en iyi kemik iyileşmesinin otojen kemik grefti kullanılan grupta olduğunu bildirmişlerdir.

Tavşan kalvaryalarında oluşturulan KBD'lerine farklı özelliklere sahip sığır kaynaklı kemik greftleri uygulanan bir çalışmada (Tovar ve ark., 2014) 8. haftanın

sonunda greft konulan defektlerin oldukça iyi kemikleşme gösterdiği, boş bırakılan kontrol grubu defektlerinin ise yumuşak doku ile iyileştiği ve kemikleşmenin deney grubuna göre oldukça az olduğu rapor edilmiştir.

Deproteinize sığır kemiği ile yapılan çalışmalarda, kullanılan greftin alıcı doku tarafından iyi tolere edildiği ve iyileşmeye osteokondüktif katkı sağladığı bildirilmiştir (Nanmark ve Sennerby, 2008; Pikdöken ve ark., 2011). Ancak bazı çalışmalarda (Skoglund ve ark., 1996; Berlundh ve Lindhe, 1997) deproteinize sığır kemiğinin tamamen rezorbe olmadığı, reabsorpsiyon hızının ve mekanizmasının halen belirsiz olduğu belirtilmiştir.

Kırık iyileşmesinin ilk aşamalarında tip II kollajen ağırlıkla gözlenirken ikinci haftadan sonra tip I kollajen üretimi söz konusu olur (Hiltunen ve ark., 1993; Seeherman ve ark., 2003). DKM hem osteokondüktif, hem de osteoindüktif özellik göstermektedir. DKM canlı kemik hücresi veya diğer yapı taşı hücrelerini içermemektedir. Bu nedenle, DKM'nin iyi kanlanan ve yoğun osteoprogenitör desteği olan bölgelerde kullanılması yada otojen kemik grefti ile desteklenmesi gerekmektedir (Aspeberg ve ark., 1990; McLean, 1993; Munting ve ark., 1998).

Farklı implant uygulamalarının araştırılmasında kullanılacak hayvan modellerinin türü değişmekte ve klinik uygulanabilirlik için önem taşımaktadır (Stübinger ve Dard 2013). Deneysel hayvan modeli olarak tavşanlar, kemik iyileşmesinin hızlı olması dolayısıyla çalışma süresinin kısalığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2003; Stübinger ve Dard, 2013). Tavşanlarda kemik metabolizması göz önüne alındığında greft çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi için 8 haftalık bir sürenin yeterli olacağı belirtilmiştir (Misch, 2008; Stübinger ve Dard, 2013).

Damien ve ark. (2002), primatlarda prelinik güvenlik çalışması ile sığır kaynaklı kemik protein ekstraktının (NeOsteo) etkinliğinin otojen kemik greftinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Nienhuijs ve ark. (2006) at kemik protein ekstraktı (AKPE/Colloss E) ile rat subkutan ektopik kemik oluşumu modelinde titanyum bir kafes içerisinde derialtı dokuda kemik oluşumu elde etmişlerdir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Deney hayvanları

Çalışma, Çukurova Üniversitesi Deney Hayvanları Merkezinden temin edilen New Zealand ırkı 2,5-3 kg ağırlığında 16 erkek tavşan üzerinde yürütüldü.

3.1.2. Operasyon malzemeleri

Rutin cerrahi set

Boyu ayarlanabilen 6 mm çapında özel olarak imal ettirilen trefin

Elektrikli drill (Makita 6271D)

Micro-CT cihazı (Skyscan 1172)

3.1.2. Kimyasal maddeler

Xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer)

Ketamine hydrochloride (Ketasol, İnterhas)

Ticari olmayan özel hazırlanan kollajenize at kemik grefti

Plateletten/Trombositten zengin plazma (PRP)

3.2. Yöntem

3.2.1. At kemik greftinin hazırlanması

Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Anatomi anabilim dalında kadavra olarak kullanılmak üzere yüksek doz anestezi uygulaması sonrası ötenazi edilen yerli ırk 250-300 kg ağırlığında atın femur ve tibiaları alınarak 2 cm boyunda kesilerek -20 C° derin dondurucuda 48 saat bekletildikten sonra su içerisinde çözülde (Şekil 4). Ardından kemik parçaları 24 saat % 10'luk HCl (37%) içerisinde takip eden 24 saat süreyle su içerisinde dönüşümlü olarak tamamen demineralize oluncaya kadar tutuldu (Şekil 5). Elde edilen elastik kemik 80 C° de 2 saat süreyle otoklavda tutularak jelatin formuna getirildi. Bu işlem sonrası elde edilen jelatin %0,5 guluteralehit ile çapraz bağ oluşturulduktan sonra 24 saat süreyle -20 C° derin dondurucuda tutuldu. Takiben defrost

edilerek hidrojel elde edildi ve 6mm çapında ve 10 mm derinliğindeki özel kaplara dökülerek Őekillendirildi. Őekillendirilen at kemik grefti kulanıncaya kadar %70 lik alkol içerisinde muhafaza edildi.



Şekil 4. At kemik parçaları



Şekil 5. Kemik parçalarının dönüşümlü olarak asitle muamelesi ile demineralize edilmesi

3.3.2. Trombositten Zengin Plazmanın (PRP) hazırlanması

Uygulama yapılacak olan herbir tavşanın kulak venasından (vena aurikularis caudalis/marginalis) anjioket aracılığı ile sitratlı tüplere 10 ml kan alındı. Alınan kan bekletilmeden santrifüjde (Hetich EBA 20) 15 dakika süre ile 3200 devirde (1600 G) santrafütü edildikten sonra orta kısımda biriken trombositten zengin plazma insülin enjektörüne (1 ml) alınarak 0,5 ml uygulandı (Şekil 6).



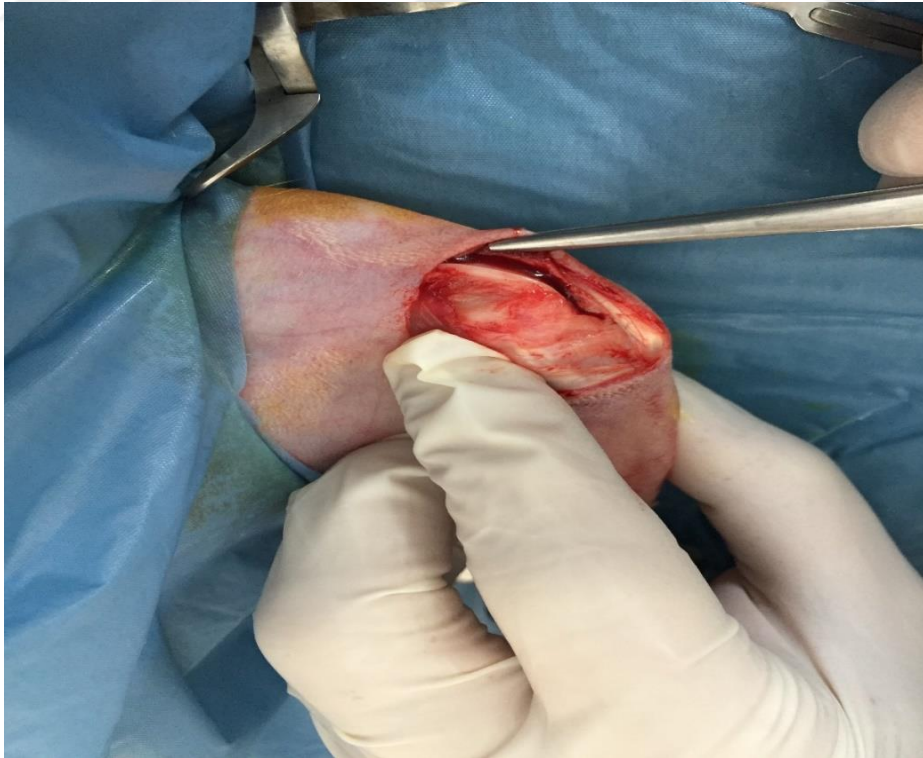
Şekil 6. Kulak venasından PRP için kan alımı ve elde edilen PRP

3.3.3. Cerrahi prosedür

Bu çalışma Yüzüncü Yıl Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu kararı ve denetimi ile Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı küçük hayvan kliniğinde yürütüldü. İntramusküler xylazine 5 mg/kg ve ketamin 35 mg/kg ile genel anestezi sağlandı. Şirurjikal anestezi sağlandıktan sonra deneklerin her iki dizlerinin traş bıçağı ile traş edilmesinin ardından antiseptik solüsyon (Povidon iode % 10 ve alkol % 70) kullanılarak antisepsi sağlandı. Ardından bölge steril yara örtüleri ile örtüldükten sonra diz ekleminin medialinde yaklaşık 1,5 cm'lik ensizyon yapıldı (Şekil 7). Deri, derialıaltı ve fasya geçildikten sonra quadriceps medialinden femur medial kondilsüne ulaşıldı.

Anterior eklem yüzeyinden yaklaşık 4 mm posteriorda, distal eklem yüzeyinden yaklaşık 6 mm proksimalde olacak şekilde, distal femur metafizinde 6 mm çapında ve 10 mm derinliğinde defekt oluşturuldu (Şekil 8A, B). Defektin tabanı ve lateral duvarın sağlamlığı prob kullanılarak kontrol edildi. Ardından tüm femur defektlerine kollajenize at kemik grefti yerleştirildi (Şekil 9A, B). Bu işlemin uygulamasından 7 gün sonra deneklerin defektlerinden bir tanesine 0,5 ml PRP tedavisi uygulandı (Şekil 10). Perioperatif ve postoperatif dönemde hiç bir denek kaybedilmedi ve hiç bir denekte de komplikasyon saptanmadı. Aynı gün içerisinde rutin beslenmelerine devam eden deneklerin birinci günden sonra serbest bir şekilde mobilize oldukları gözlemlendi.

Defektlerin onarım işlemlerinden sonraki 21. günde deneklerden 8 tanesi, 6. hafta sonunda da diğerleri yüksek doz intravenöz ketamin uygulaması ile sakrifiye edildi. Her bir denneğin femur kondilleri çıkarılıp % 10 formaldehide konuldu daha sonra sırasıyla tomografik, histopatolojik incelemeye tabi tutuldu ve bulgular istatistiki olarak değerlendirildi.



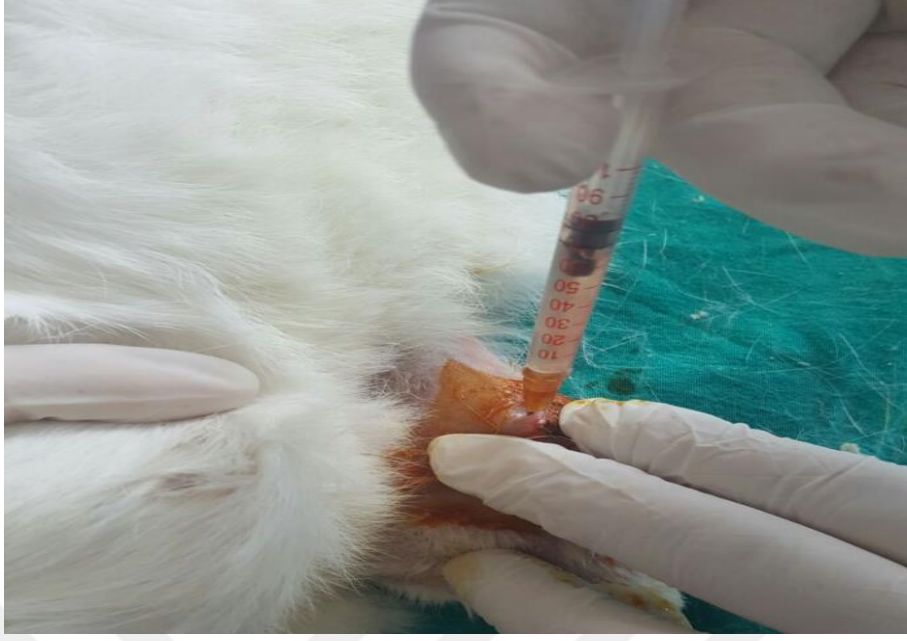
Şekil 7. Operasyon sahasına medial yaklaşım



Şekil 8 (A, B). Kritik boyut kemik defekti oluşturulması



Şekil 9 (A, B). At kemik greft materyalinin implantasyonu



Şekil 10. İmplantasyon alanına PRP uygulanması

3.2.4. Micro-CT prosedürü

Formaldehit (%10) içerisinde muhafaza edilen numuneler İnönü Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Merkezinde SkyScan 1172 micro-Ct cihazında 100 kV ve 100 mA güç ile 13,6 μm kesit ile 0,4⁰ açıyla 180⁰ ye tamamlanana kadar döndürülerek bir saat tarandı. Herbir numuneden elde edilen 1214 görüntü çıkar çatışması olmayan iki radyolog tarafından değerlendirildi.

3.2.5. Histopatolojik prosedür

Histopatolojik değerlendirme amacıyla alınan kemik dokuları %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildikten sonra, osteosoft (Merc, HC313331, Germany) içerisinde 120-130 saat bekletililerek yumuşatıldıktan sonra akan çeşme suyunda 24 saat yıkandı. Doku takibinde sırasıyla % 80'lik alkolde (12 saat x 2 defa), % 90'lık alkolde (12 saat x 2 defa), % 96'lık alkolde (12 saat x 2 defa), absolüt alkolde (12 saat x 2 defa), kloroform (5 saat x 3 defa) ve sıvı parafinde (12 saat) işlemlerinden geçtikten sonra parafin bloklara gömüldü. Her bloktan 4 μm kalınlığında hazırlanan preparatlar Hematoksilen Eosin (H&E) ile boyanıp ışık mikroskopunda (Olympus BX51) incelendi. Ossifikasyon, gelişimine göre; çıkar çatışması olmayan iki patolog tarafından; hafif (+), orta (++) ve ileri (+++) düzeyde olmak üzere değerlendirildi.

3.2.6. İstatistik analizler

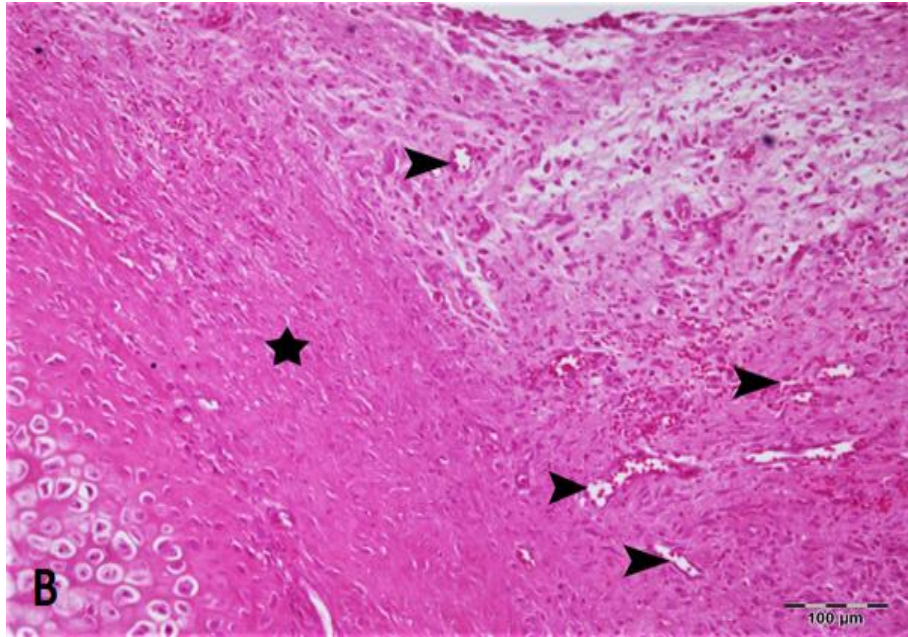
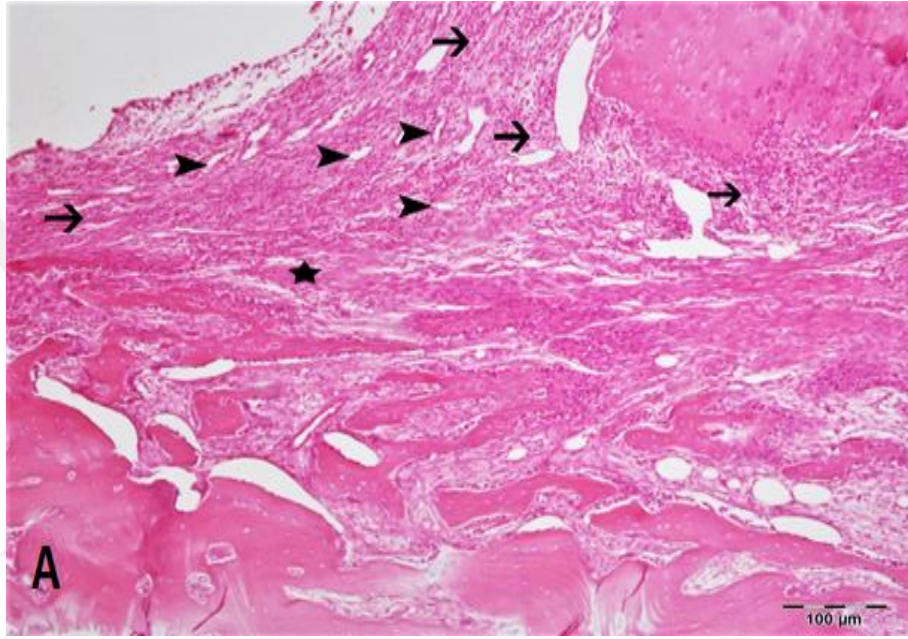
Çalışmada ele alınan özellik için tanımlayıcı istatistikler; medyan, ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değer olarak ifade edilmiştir. Bu özellik bakımından uygulamaları ve zamanları karşılaştırmada Wilcoxon testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda anlamlılık düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (ver:21) istatistik paket programı kullanılmıştır.



4. BULGULAR

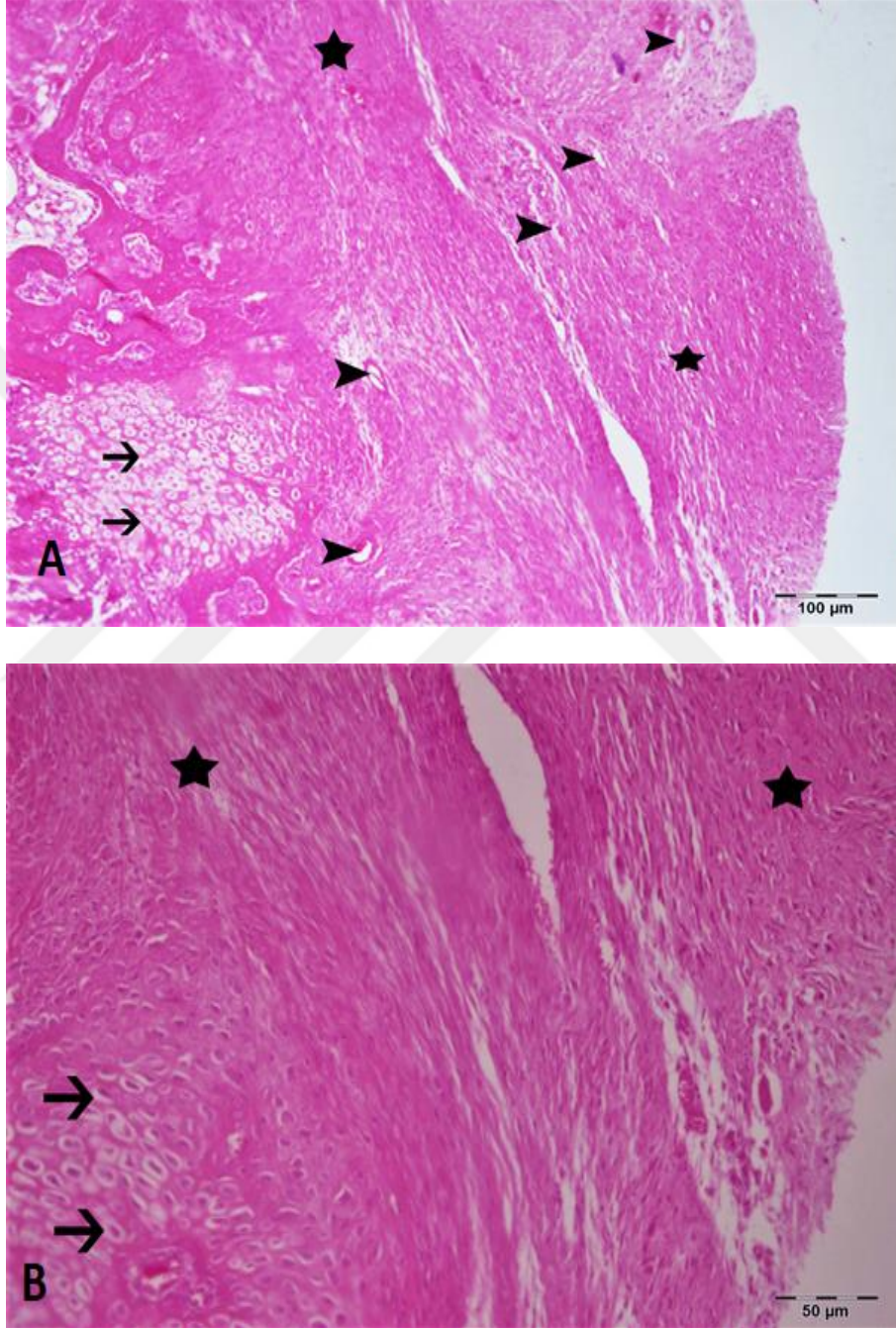
4.1. Histopatolojik Bulgular

3. hafta PRP'siz grup: İmplant uygulanan bölgede yoğun bir anjiyogenesis, damarlarda hiperemi, mononükleer hücre infiltrasyonları ve genç fibroz doku şekillendiği tesbit edildi (Şekil 11 A, B).



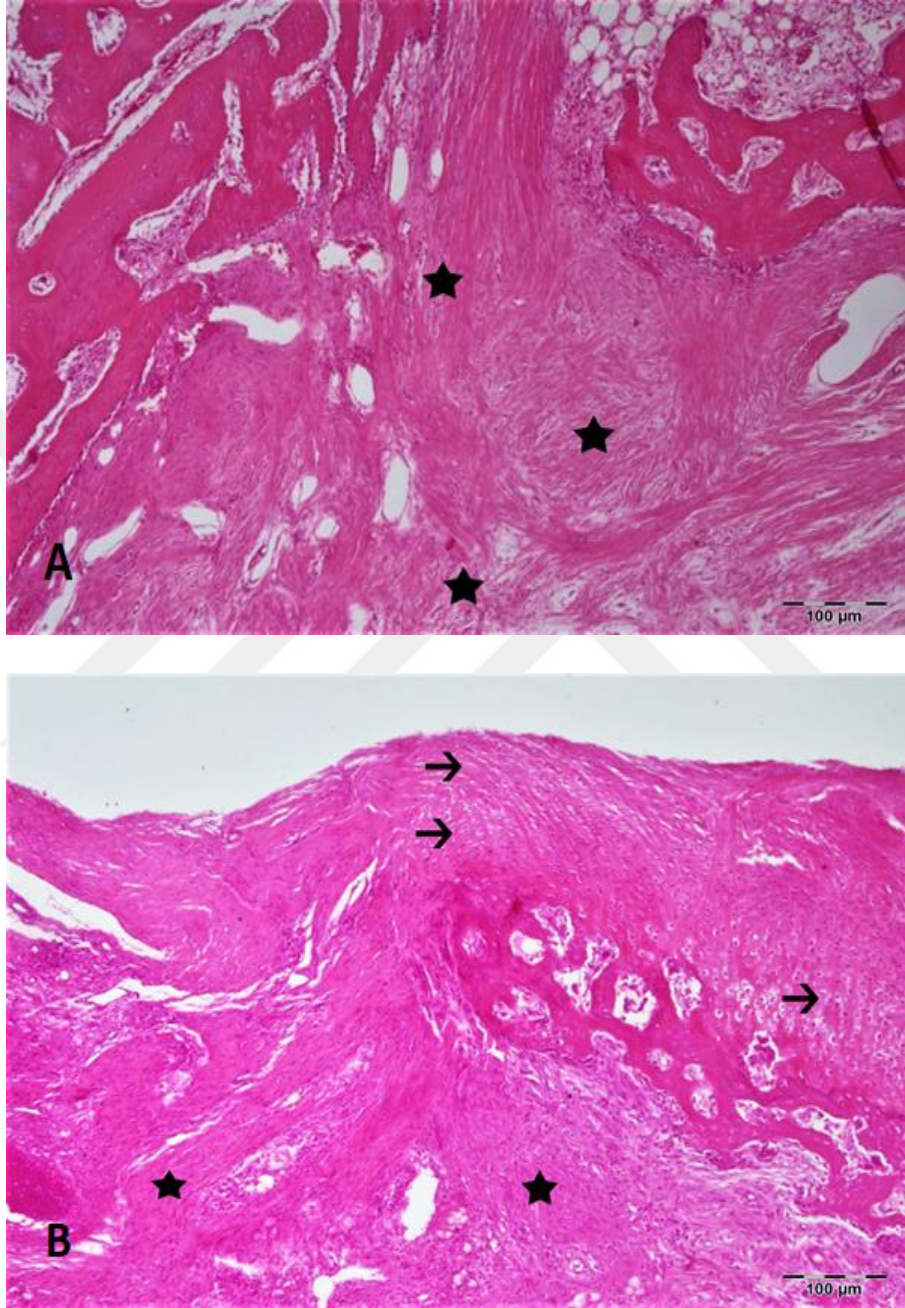
Şekil 11 (A, B). 3. hafta PRP'siz grup, fibröz kallus (yıldız), mononükleer hücre infiltrasyonu, şiddetli anjiogenesis (okbaşları), H&E, Bar:100µm

3. hafta PRP'li grup: Bu grupta bulunan tavşanların kondiluslarının histopatolojik incelenmesinde, sıkı bir bağdoku oluşumu tespit edilirken yangısal olayların hafiflediği ve bu fibröz dokunun kondrositlere dönüştüğü geçici kallusun şekillenmeye başladığı görüldü (Şekil 12 A, B).



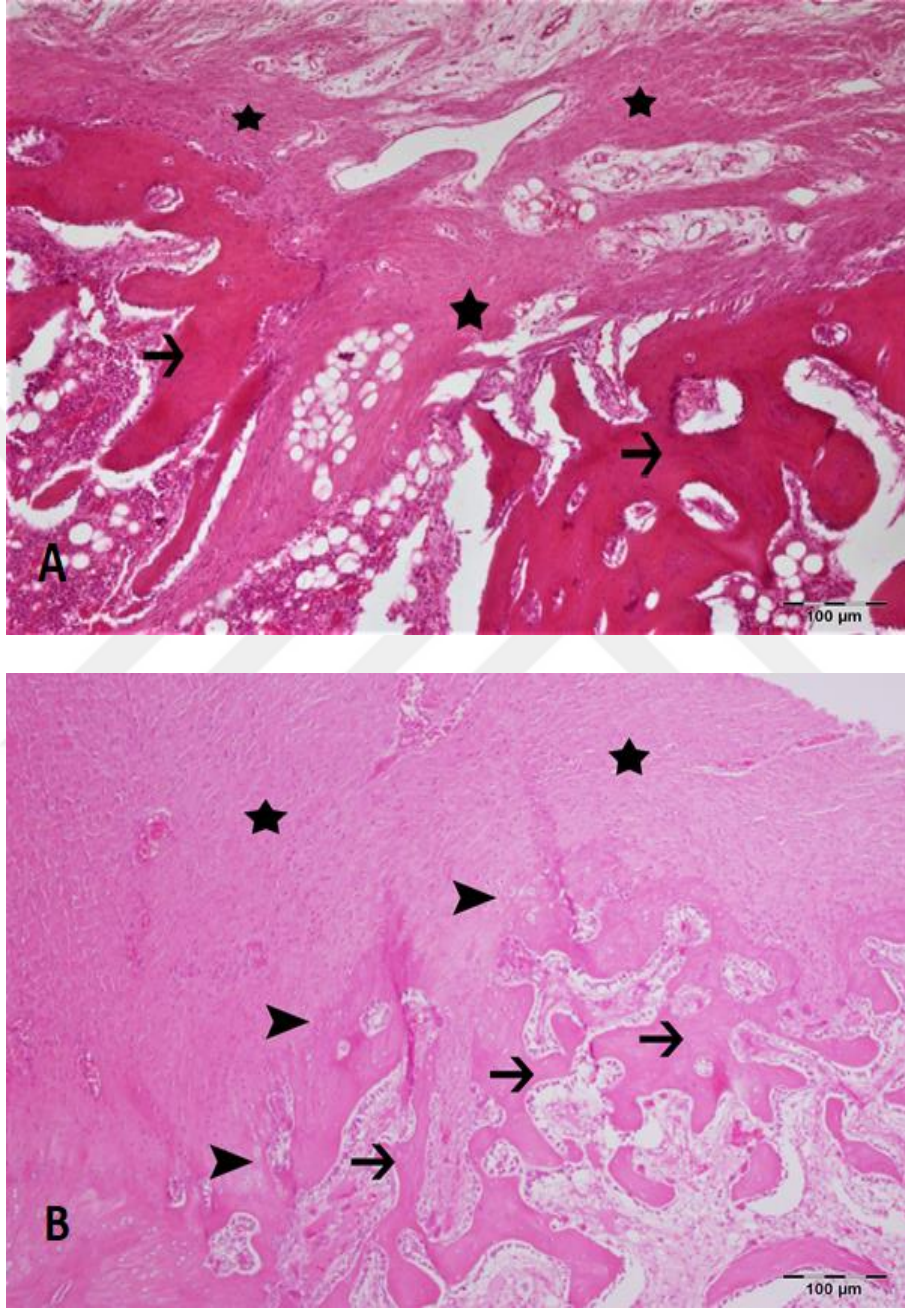
Şekil 12 (A, B). 3. hafta PRP'li grup, şiddetli fibröz kallus (yıldız), anjiogenesis (okbaşıları), yangı bölgesinde fibröz dokunun kondrositlere dönüşümü (oklar), H&E, Bar:100µm

6. hafta PRP'siz grup: Bu grupta bulunan tavşanların kondiluslarının histopatolojik incelenmesinde, yoğun şekillenmiş olan fibröz kallusun kondrositlere dönüştüğü ve az sayıda kemik trabeküllerinin şekillendiği görüldü (Şekil 13 A, B).



Şekil 13 (A, B). 6. hafta PRP'siz grup, Olgun fibröz kallus (yıldızlar), geçici kallus oluşumu kondrositler (oklar), damarlarda hiperemi, H&E, Bar:100µm

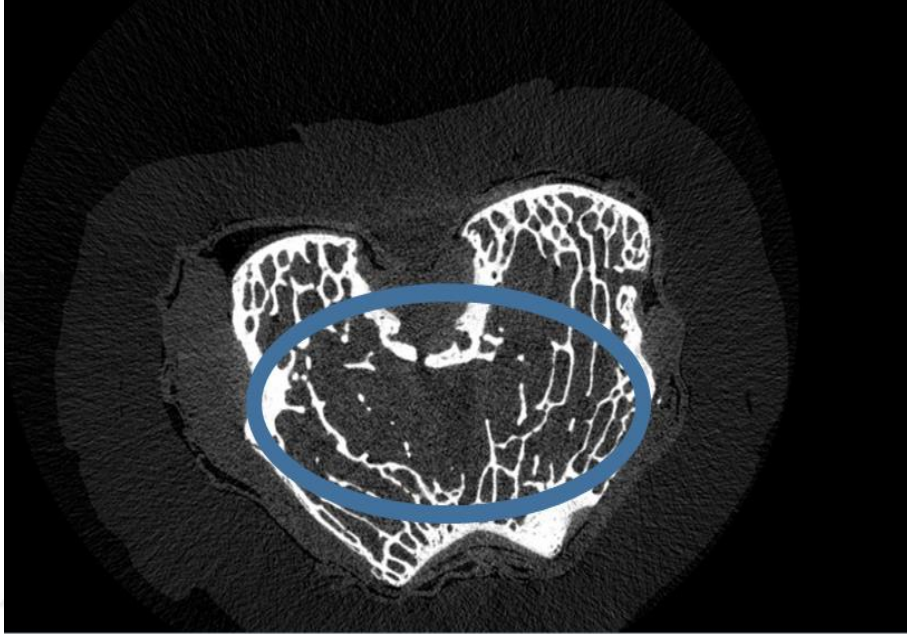
6. hafta PRP'li grup: Bu grupta bulunan tavşanların kondiluslarının histopatolojik incelenmesinde, fibröz dokunun bayağı azaldığı, geniş kemik trabeküllerinin şekillendiği, gerçek kallusun oluşmaya başladığı görüldü (Şekil 14 A, B).



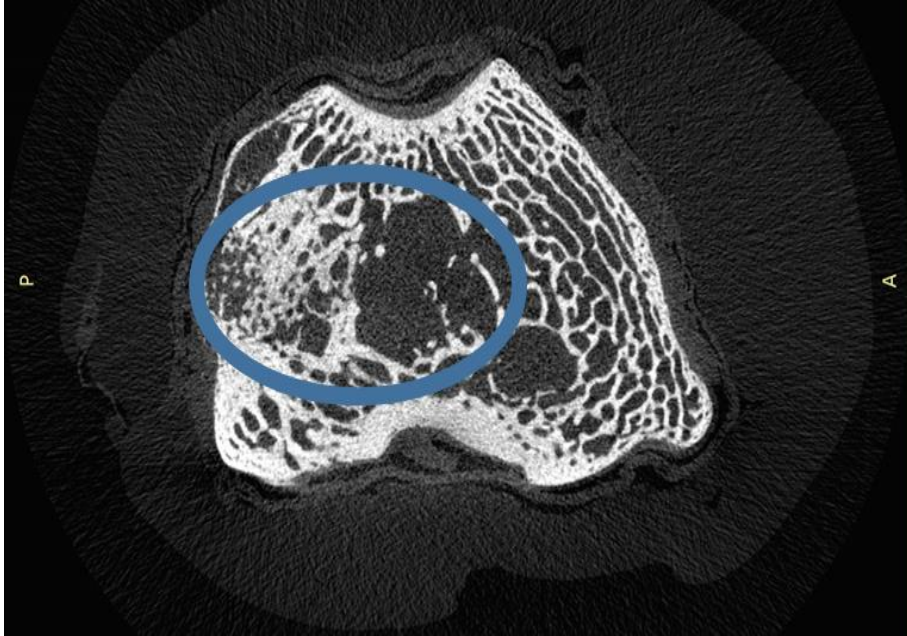
Şekil 14 (A, B). 6 hafta PRP'li grup, geçici kallus dönüşüm kodrositler (okbaşları), yoğun kemik trabekülleri (oklar), H&E, Bar:100µm

4.2. Mikro-CT Bulguları

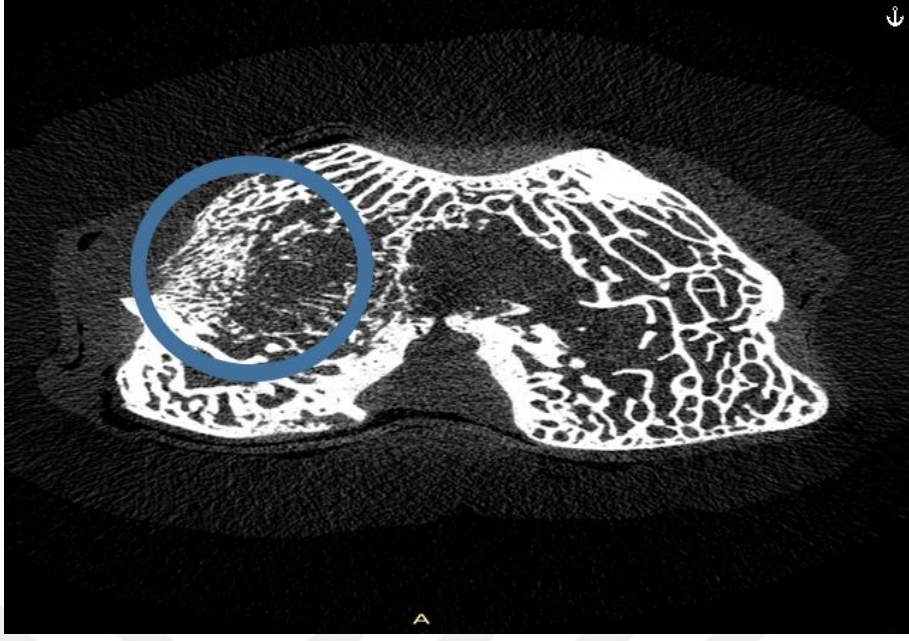
Trabeküllerin şekillenmesine göre yapılan değerlendirmede 3. haftada PRP’li gruptaki trabeküllerin oluşması, 6. haftadaki PRP’siz gruptan daha fazla olarak görüldü. 6. haftada PRP grubunda yoğun trabekül oluşumu ile defektin kemik doku ile tamamen kapandığı saptandı (Şekil 15, 16, 17, 18).



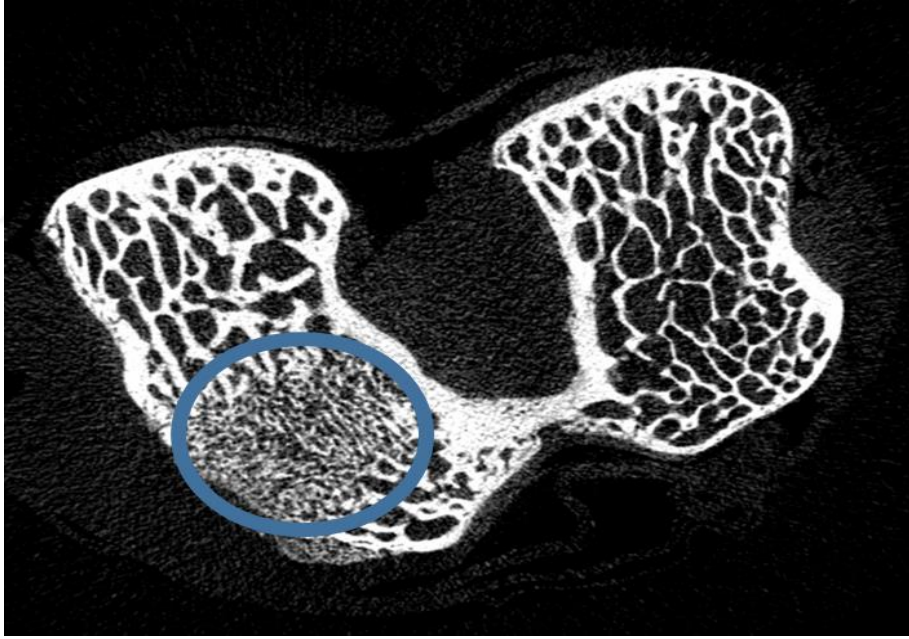
Şekil 15. 3. hafta PRP’siz grup eser miktarda trabekül oluşumu



Şekil 16. 3. hafta PRP’li grup orta derecede trabekül oluşumu



Şekil 17. 6. hafta PRP'siz grup orta derecede trabekül oluşumu



Şekil 18. 6. hafta PRP'li grup yoğun trabekül oluşumu

4.3. Micro-CT ve Histopatolojik Skolar

Tablo 1. Araştırmanın mikro-CT ve histopatoloji skorları

			PRP'siz					PRP'li					
			Medyan	Ort.	Std.Sap.	Min.	Max.	Medyan	Ort.	Std.Sap.	Min.	Max.	
Mikro-CT	Hafta	3	1,00	1,14	,38	1	2	2,00	2,29	,49	2	3	,023
		6	2,00	2,00	,00	2	2	3,00	3,00	,00	3	3	,014
**p			,014					,025					
Histopatoloji	Hafta	3	1,00	1,00	,00	1	1	2,00	1,86	,38	1	2	,008
		6	2,00	1,71	,49	1	2	3,00	3,00	,00	3	3	,014
**p			,025					,011					

* PRP uygulamasının zamandan bağımsız etkisi

** Haftaların uygulamadan bağımsız etkisi

Deneme gruplarının mikro-CT ve histopatoloji skorları incelendiğinde (Tablo 1), zamandan bağımsız olarak PRP uygulamasının matur düzenli tarbaküler yapı oluşumunu önemli derecede ($P < 0.05$) arttırdığı görüldü. Benzer şekilde histopatolojik olarak kemik hücresel yapısını da önemli derecede ($P < 0.05$) organize ettiği de saptandı. Diğer taraftan PRP uygulamasından bağımsız olarak greft materyali kullanılan defektlerde de hızlı bir iyileşme olduğu görüldü.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Kemik defektlerinde oluşabilecek iyileşme oranı, lezyonun genişliği ve derinliğine bağlıdır. Bu yüzden kemik onarımının değerlendirilebilmesi için oluşturulacak kemik defekti, kendiliğinden iyileşemeyecek kadar büyük olmalıdır. Osteojenik materyallerin kemik defektlerinin onarılmasında kullanılan kemik yarası KBD olarak belirlenmiştir (Hollinger ve Kleinschmidt, 1990). Bir implant veya greftin osteojenik potansiyeli ancak bu hacimdeki bir defekte tam olarak değerlendirilebilir (Schmitz ve Holinger 1986). KBD türlere ve bölgeye göre farklılık göstermek üzere hayat boyunca kendiliğinden iyileşemeyecek en küçük kemik defekti olarak da tanımlanabilir (Schmitz ve Holinger, 1986; Bosch ve ark., 1998; Clarck, 1998; Lemperle ve ark., 1998; Goasin ve ark., 2000). Bununla birlikte KBD birçok çalışmanın, hayvanın tüm hayatı boyunca sürdürülememesinden dolayı, süre sınırlı olması veya planlanması nedeniyle çalışma süresi boyunca kendiliğinden iyileşemeyen defektler şeklinde de tanımlanabilmektedir (Schmitz ve Holinger, 1986). Farklı implant uygulamalarının araştırılmasında kullanılacak hayvan modellerinin türü değişmekte ve klinik uygulanabilirlik için önem taşımaktadır (Stübinger ve Dard, 2013). Deneysel hayvan modeli olarak tavşanlar, kemik iyileşmesinin hızlı olması dolayısıyla çalışma süresinin kısalığı nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır (Xu ve ark., 2003; Stübinger ve Dard, 2013).

Tavşanlarda 0,5 mm ila 8 mm arasında değişen çeşitli boyutlarda defektler oluşturulabilmektedir ancak 4 mm ve daha geniş olanlarda (diyafiz genişliğini aşan defektlerde) kırık oluşmaktadır (Hollinger ve Kleinschmidt, 1990; Aaboe ve ark., 1994). Bu çalışmada tavşanlardaki femur kondili genişliği dikkate alınarak 6 mm çapta ve 10 mm derinlikte defekt oluşturulmasına rağmen herhangi bir olumsuzlukla karşılaşılmaı. Oluşturulan bu ölçekli silindirik defektlerin 6 haftalık erken dönem kemik iyileşmesinin takibi için KBD olduğu kanaatine varıldı.

Farklı implant uygulamalarının araştırılmasında kullanılacak hayvan modellerinin türü değişmekte ve klinik uygulanabilirlik için önem taşımaktadır (Stübinger ve Dard, 2013). Deneysel hayvan modeli olarak tercih edilen tavşanlarda kemik iyileşmesinin hızlı olması çalışma süresini kısaltmaktadır (Xu ve ark., 2003;

Stübinger ve Dard, 2013). Tavşanlarda kemik metabolizması göz önüne alındığında greft çalışma sonuçlarının değerlendirilmesi için 8 haftalık bir sürenin yeterli olacağı belirtilmiştir (Misch, 2008; Stübinger ve Dard, 2013). Erken dönem yeni kemik oluşumunun, osteoblastik proliferasyon ve kollajen yapımı dikkate alınarak, incelendiği birçok çalışmada tavşanlar ilk olarak ikinci haftada sakrifiye edilmişlerdir (Watanabe ve ark., 1999; Xu ve ark., 2005; Sicca ve ark., 2008; Ho ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2009; Kim ve ark., 2012). Yeni oluşan kemiğin artışı ve kalsifiye olmaya başlamasını görmek amacıyla birçok çalışmada dördüncü hafta ara değerlendirme dönemi, 8. hafta ise son değerlendirme dönemi olarak seçilmiştir (Watanabe ve ark., 1999; Xu ve ark., 2005; Sicca ve ark., 2008; Ho ve ark., 2009; Jiang ve ark., 2009; Kim ve ark., 2012). Bu bilgiler göz önüne alınarak çalışmada deney hayvanı olarak tavşan seçildi ve yukarıda belirtilen diğer şartlarda da standardizasyon sağlandı. Kullanılan materyallerin erken dönem kemik iyileşmesine etkisi ve yeni oluşan kemiğin matürasyonunun değerlendirilmesi açısından sakrifikasyonlar üçüncü ve 6'ncı haftada yapıldı.

Patelet kaynaklı büyüme faktörü ve TGF- β 'nin etkilerinin, kan alımını takiben 4 saat ile 3 gün arasında giderek azaldığı bildirilmiştir (Ferreira ve ark., 2005). Ayrıca trombositlerin agregasyon özelliklerinde de belirgin azalma olduğu belirtilmiştir (Kocazeybek ve ark., 2002). PRP'nin kontamine olmasını engellemek için hazırlandıktan sonra hemen veya en geç ilk 6 saat içerisinde kullanımı önerilmektedir (Kassolis, 2000; Kocazeybek ve ark., 2002). Trombositlerden büyüme faktörlerinin salınması ilk 3- 5 günde içerisinde gerçekleşir, bu nedenle PRP etkisinin 8-10 gün içerisinde sonlanacağı ileri sürülmüştür (Raghoobar ve ark., 2005). Trombositlerin ve PDGF'lerin etkinlikleri ilk 5-6 günden sonra kaybolur, ancak bunların aktive ettiği osteoblastların ömrünün yaklaşık 3 ay (Manolagas, 2000) olduğu göz önünde bulundurularak, kemik onarımının hızlı bir şekilde devam edeceğide vurgulanmıştır (Marx ve ark., 1998; Jakse ve ark., 2003). Bu çalışmada PRP'nin hazırlandıktan hemen sonra bölgeye uygulanması ile yukarıda belirtilen olası olumsuzlukların önüne geçilmiştir.

Canlı dokuya yerleştirilen materyallerin büyük bir çoğunluğu kan-materyal etkileşimi, geçici matriks oluşumu, akut inflamasyon, kronik inflamasyon, granülasyon dokusunun oluşumu, yabancı cisim reaksiyonu ve fibrozis ya da fibröz kapsül oluşumu

gibi doku reaksiyonuna maruz kalmaktadır. Bu reaksiyonlar biyomateryalin yerleştirilmesini takiben 2-3 hafta içerisinde meydana gelmektedir (Anderson, 2001).

Bir biyomateryalin neden olduğu, inflamasyonun süresi ve yabancı cisim reaksiyonu oluşturup oluşturmadığının anlaşılması biyouyumluluğunun değerlendirilmesi açısından önemlidir (Anderson ve ark., 2008). Bu çalışmada bazı araştırmalarda (Fukuta ve ark., 1992; Hurzeler ve ark., 1998; Valentini ve ark., 1998; Richardson ve ark., 1999; Artzi ve ark., 2000; Kasabah ve ark., 2002; Tadjoeidin ve ark., 2003), kullanılan heterogreftlere bağlı olarak ortaya çıktığı bildirilen yabancı cisim reaksiyonuna hafif derecede üçüncü haftada PRP'siz grupta rastlandı. PRP'li grubun histopatolojik incelemelerinde yabancı cisim reaksiyonuna rastlanılmamasına, bir hafta sonra kullanılan ve yapısında güçlü bir antiinflamatuvar etkiye sahip olan TGF- β 'yi bulunduran PRP'nin (Dohan ve ark., 2006), beklenen inflamatuvar cevabı baskılamasının neden olduğu kanaatine varıldı. Elde edilen bulgular değerlendirildiğinde çalışmada kullanılan at kemik greftinin tavşanlarda, genel manada, biyouyumlu olduğu görüldü.

Nannmark ve Azarmehr (2010) tavşan maksillalarında açtıkları defektlerde kollajenize heterogreft kullandıkları çalışmanın, 2. haftasında vasküler ve osteoblastik proliferasyon başladığını, 4. haftasında ise, osteojenik aktivitenin yoğun olduğunu, yeni oluşan kemik miktarının arttığını, defekt bölgesinde devam eden aktif bir neovaskülarizasyon ve greft materyalinde rezorpsiyon gözlendiğini, çalışmalarının 8. haftasında ise defekt içerisinde oluşan kemiğin daha matür ve organize olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmada PRP'li grupta organize kemik 3. haftada, matür ve organize kemik ise 6. haftada oluştu. Bu durum PRP'nin kemik onarımının her aşamasında olumlu katkı sağladığını ortaya koymaktadır.

Ho ve ark. (2009) tavşanların sinüs tabanı yükseltilmesinde otojen greft olarak elde ettikleri DBM ve farklı konsantrasyonlardaki sentetik BMP'leri kullandıkları çalışmada, biyolojik iyileşmeyi histolojik olarak değerlendirmişlerdir. Değerlendirmelerine göre iki hafta sonra, DBM içeren örneklerin kesitlerinde rezorbe olmamış partiküller, bu partiküllerin çevrelerinde de yeni kemik oluşumunun başladığını saptamışlardır. Sekizinci haftada ise otojen greft, DBM, DBM ile kombine BMP ve sadece BMP kullanılan bütün gruplarda oluşan kemik dokunun matür ve küçük

çaplı lamellar kemik trabekülleri içerdiğini gözlemlemişlerdir. Gruplar arasında, şekillenene kemiğin histolojik olarak herhangi bir farkının olmadığını rapor etmişlerdir. Kim ve ark. (2012) tavşan sinüslerinde heterojen rekombinant BMP-2 ve PRF'yi, TCP ile birlikte kullandıkları çalışmada, histolojik değerlendirmenin 2. Haftasında PRF'li gruplarda kontrol grubuna göre kollajen lif şekillenmesinin belirgin olduğu, yeni kemik oluşumunun erken döneminde de osteoblastik proliferasyonun geliştiği görülmüşlerdir. Çalışmalarının 4. haftasında bütün deney gruplarında kemik oluşumunun ve kalsifikasyonunun arzu edilen düzeyde olduğu vurgulanmışlardır. Sonuçta 8. haftada tüm gruplarda yeni oluşan kemiğin bütünüyle kalsifiye olduğu belirtilmiştir.

Sığır kemik protein ekstraktı ratlarda subkutan dokuya titanyum kafes içinde yerleştirilerek, ektopik kemik oluşumundaki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada (Walbomers ve Jansen, 2005), rekombinant BMP'lerin kullanıldığı çalışmalara benzer bir yeni kemik oluşumu bildirilmiş, ancak kırıldak matriks olmaksızın kemik dokusunun geliştiği gözlenmiştir. Buna neden olarak, implantasyon süresinin (8-12 hafta) uzun olması gösterilmiştir.

Woo ve ark. (2006) SKPE'nin direkt olarak mezenşimal kök hücreleri ve immatür osteoblastların üzerinde etki gösterdiğini ve endokondral kemikleşme olmaksızın osteogenezi uyardığını bildirmişlerdir.

Belirtilen bilginin (Woo ve ark., 2006) aksine bu çalışmada intramembranöz ossifikasyonun şekillendiği ortaya konulmuştur. PRP'siz grupta yoğun olmak üzere 3. haftadan itibaren her iki grupta kondrosit oluşum aktivitesi saptanmıştır. Bu doğal bir süreç olup incelemelerin erken dönemde yapılması nedeniyle rastlanmıştır gibi düşünülebilse de, histopatolojik veriler çalışma sırasında onarımın sekonder iyileşme ile olduğunu açıkça göstermiştir. Bu bulgu aynı zamanda PRP'nin fibrokartilaginöz kallus dönemini kısalttığını da göstermektedir. Bu nedenle, çalışmada Walbomers ve Jansen (2005) ile Woo ve ark. (2006)'ın bildirimleriyle farklı sonuçlar elde edilmiştir.

Sığır kemik protein ekstraktı ile otojen kemik greftleri üzerine PRP'nin etkinliğini araştıran bir çalışmada (Schlegel ve ark., 2004), PRP'nin osteogenezi uyardığı bildirilmekle birlikte, 12 hafta sonunda SKPE ile otojen kemik grefti ile elde

edilen kemik dokusu ile eşdeğer bir kemik dokusu elde edildiği mikroskopik ve mikroradyografik olarak gösterilmiştir. Araştırmacılar (Einhorn ve ark., 1984; Gepstein ve ark., 1987; Ragni ve Lindholm, 1991; Prewet ve ark., 1992; Russel ve Block, 1999; Finkemeier, 2002) DBM ile otojen kansellöz greft ile elde edilenlere benzer kemik iyileşmesi saptadıklarını bildirirlerde, bu iki yöntemi karşılaştıran araştırmaların az olması nedeniyle sağlıklı bir bilgi edinilememiştir. Çalışmamızda otojen greft ile bir çalışma grubu oluşturulmadığından yukarıda bu konu ile bildirilen tecrübelerle ilgili bir fikir sunulamamaktadır ancak çalışmada PRP'siz grupta bile iyileşmenin normal seyirden hızlı olduğunun tesbiti Artzi ve Merten (1998), Bertagnoli (2002), Schlegel ve ark. (2003)' nın görüşlerini desteklemektedir.

Nienhuijs ve ark. (2006) at kemik protein ekstraktının (AKPE) etkinliğini araştırdıkları rat modeli çalışmalarında, titanyum kafes içerisinde ektopik (yumuşak doku) yerleşim sonrası osteoindüktif aktiviteyi incelemişler, çalışmalarında AKPE ve SKPE kullanımında eşit miktarda osteoindüktif aktivite ayrıca AKPE ile yoğun bağ dokusu gözlendiğini bildirirerek bu durumun tip I kollajenden kaynaklandığı vurgulanmıştır. Doğası gereği yüksek oranda tip 1 kollajen ihtiva eden at kemik greftinin, araştırmacıların (Nienhuijs ve ark.; 2006) bulgularının aksine bu çalışmada yoğun bağ doku aktivitesine neden olmadığı gözlendi. Çalışmanın heriki grubunda da hem 3. hemde 6. hafta mikro-CT ve histopatolojik bulgularında düzgün kemik doku oluşumu saptandı.

Pripatnanont ve ark. (2013) tavşan kalvaryum defektlerinde PRF'nin, deproteinize sığır kemiği, otojen kemik ve deproteinize sığır kemiği ile birlikte otojen kemik kombinasyonuna etkisini değerlendirdikleri bir çalışmada, 8. hafta sonunda otojen kemiğin ve deproteinize kemik grefti ile otojen kemik kombinasyonunun PRF ile birlikte kullanıldığı defektlerde yeni oluşan mineralize kemik ile greft materyallerinin köprüler kurarak tamamen birleştiği gözlerken, PRF'nin sadece deproteinize kemik grefti ile birlikte kullanıldığı grupta yeni kemik oluşumunun yalnızca defekt duvarlarının yakınındaki partiküllerde görüldüklerini belirtilmiştir.

Choukroun ve ark. (2006) insan sinüslerinde FDBA ile PRF'yi birlikte kullandıkları klinik bir çalışmada, erken dönemde, PRF'li çalışma grubunda sadece DKKA kullandıkları kontrol bölgelerine göre daha iyi organize olmuş trabeküler yapı

olduğunu ve PRF'nin iyileşme zamanını kısalttığını, 4 ay sonraki histolojik değerlendirmelerde ise her iki taraftaki kemik kalitesinin aynı olduğunu belirtmişlerdir.

Sinüs tabanı yükseltilmesinin uygulandığı klinik bir çalışmada (Inchingolo ve ark., 2010), PRF ile deproteinize sığır heterogreftini birlikte kullanan araştırmacılar, yaptıkları klinik ve radyolojik değerlendirmeler sonucunda PRF'nin kemik iyileşmesini hızlandırdığı sonucuna varmışlardır.

Deproteinize sığır kemiği ile birlikte kullanılan PRF'nin anjiyogenez ve osteogenez üzerine etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada (Yoon ve ark., 2014) yapılan histomorfometrik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler sonucunda deproteinize sığır kemiğinin kullanıldığı gruplar ile bunun PRF ile birlikte kullanıldığı gruplar arasında önemli bir fark olmadığı belirtilmiştir. Farklı trombosit konsantrasyonlarının defekt iyileşmesine olan etkilerinin değerlendirildiği başka bir çalışmada (Kim ve ark., 2014) ise erken dönemde PRP'nin bütün konsantrasyonlarının kemik iyileşmesini hızlandırdığı ancak uzun dönemde osteojenik etkileri açısından aralarında herhangi bir fark olmadığı belirtilmiştir. He ve ark., (2009) PRP ve PRF'nin osteoblastlar üzerine etkisini in vitro olarak değerlendirdikleri bir çalışmada, PRF'nin osteoblastların çoğalması ve farklılaşmasına etkisinin PRP'ye göre daha güçlü ve daha uzun süreli olduğunu bildirilmişlerdir. Gabling ve ark. (2009) ise insan hücre kültürü üzerine yaptıkları çalışmada, osteoblast ve fibroblast hücre kültüründe sitokin konsantrasyonunun PRP için daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. İmplant çevresi defektlerde deproteinize sığır heterogrefti ile PRP'nin birlikte kullanıldığı bir çalışmada (You ve ark., 2007) PRP'nin implant çevresindeki kemik iyileşmesini azaltabileceği rapor edilmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışma 6. haftada sonlandırıldığından değerlendirmeler 3. ve 6. haftalarda yapıldı. Farklı zaman dilimlerinde yapılan başka çalışmaların bulguları ile bire bir tartışma yapılamamıştır. Bu süreler zarfında elde edilen bulgular bazı kaynaklarla (Choukroun ve ark., 2006; Gabling ve ark., 2009; He ve ark., 2009; Inchingolo ve ark., 2010, Kim ve ark., 2014) tam bir uyum, bazı kaynaklarla da (Schlegel ve ark., 2004; Ho ve ark., 2009; Pripatnanont ve ark., 2013) kısmen uyum, You ve ark. (2007) ile Yoon ve ark. (2014)'nın yaptıkları çalışmalarla da tezatlık gösterdi. Demineralize kemiğin osteoindüktif yeteneği, kemik matriks proteinlerinden

özellikle de BMP'lerden kaynaklanmaktadır. Demineralize kemik, BMP'lerin bütününi değişik oranlarda bulundurmaktadır (Wolfe ve ark., 1999; Groeneveld ve Burger, 2000; Reddi, 2000). DKM'nin, kemik greft materyali olarak yaygın kullanım alanı bulmasına karşın, osteoindüktif kapasitesi tartışmalıdır (Niederwanger ve Urist, 1996; Groeneveld ve Burger, 2000).

Schwartz ve ark. (1998) tarafından, DKM'nin osteoindüktif özelliklerinin az olması yeterli miktarda BMP içermemelerine bağlanmıştır. Allogreft ve heterogreft materyalleri genellikle FDBA ve DFDBA olmak üzere iki türü kullanılmaktadır ve değişik fiziki formlarda üretilmektedirler (Khoury ve ark., 2007). Allogreftler ve heterogreftler elde edilirken, değişik kimyasal ve fiziksel işlemlere tâbi tutulmaktadır (Grover ve ark., 2011). AKPE'nin elisa ile 55 ± 11 mg/g TGF- β 1, 2.6 ± 0.2 mg/g BMP-2, 3.8 ± 2.7 mg/g BMP-7 ve 2.9 ± 0.8 mg/g IGF-1 içerdiği saptamıştır (El-Sabban ve ark., 2007). Bu çalışmada kullanılan at kemik grefti kendi üretimimiz olmasına rağmen içerisindeki maddelerin elisa testi ile tayinleri yapılamadığından bu konuda bir veri sunulamaması çalışmamızın bir eksiği olarak görüldü.

Bu çalışmada kullanılan greft materyalinin, elde edilme yöntemi sonucu, demineralize dondurulmuş kurutulmuş kollajenize heterogreft olması nedeniyle yukarıda bildirilen maddeleri (El-Sabban ve ark., 2007) değişik oranlarda ihtiva etmektedir.

Segmenter defektler radyolojik olarak direkt radyografi ile kalsifikasyon, köprüleşme ve kaynama açısından değerlendirilebilirken, kaviter ve blok defekt bulguları ise ancak mikro-CT ile değerlendirilebilmektedir (Salkeld ve ark., 2001; Li ve ark., 2005). Dolayısıyla çalışmada direkt radyografi incelemesi yapılmadı.

Kemik iyileşmesinin hücresel boyutu incelenirken histolojik kontrollerin de yapılması gerekliliği (Kim ve ark., 2002; Yılmaz, 2009) göz önünde bulundurularak çalışmada micro-CT değerlendirme yanında histopatolojik incelemelerde yapıldı.

Walboomers ve Janen (2005) sığır kaynaklı kemik protein ekstraktı (Colloss) ile rat subkutan kemik oluşumu modelinde 8-12 hafta içinde ektopik kemik oluşumu elde etmişlerdir. Schlegel ve ark. (2004) domuz kranium KBD modelinde SKPE (Colloss) ile

otojen kemik grefti ile karşılaştırılabilecek derecede kemik iyileşmesi oluştuğuna dikkat çekmişler, dikkate değer bulgu olarakta 2. ve 4. haftadaki mineralizasyonun otojen greft grubundan daha yoğun olduğunu belirtmişlerdir. Bunun nedeni olarakta ekstrakttaki proteinlerin osteogenezi daha erken olgunlaştırması olarak görmüşlerdir. Bu çalışma sırasında oluşturulan yaklaşık 0,4 cc defektlere başlangıçta at kemik grefti implante edildi. Graft implante edilen bu defektlerden yarısına bir hafta sonra 0,5 ml PRP uygulandı. Çalışmada benzer bulguların (Walboomers ve Janen, 2005; Schlegel ve ark., 2004), erken dönemde yalnızca PRP uygulanan grupta görülmesi yukarıda belirtilen görüşlerle, süre bakımından, uyumlu bulunmamıştır. İki grup arasındaki bu farkın ($p < 0,05$) daha önceki çalışmada (Schlegel ve ark., 2004)) belirtilen kemik protein ekstraktının içerdiği osteoindüktif faktörlerin osteogenezi daha erken matüre etmesinden değil, uygulanan PRP'dan kaynaklandığı sonucuna varıldı. AKPE'nin yapısında bulundurduğu BF'ler nedeniyle osteoindüktif etki gösterdiği bildirilmiştir (Li ve ark., 2007; Songür ve ark., 2015). Kemik greftleri ve diğer greft materyallerinin üretimindeki sorunlar kaynak temini ve yüksek maliyet olarak bilinmektedir (Songür ve ark., 2015). Bir diğer önemli problemde greftin hazırlanması sürecinde kullanılan gelişmiş teknolojiye ve uygulanan sterilizasyon yöntemlerine rağmen hastalık nakletme olasılığının tamamen bertaraf edilememesidir (Songür ve ark., 2015).

Kemik onarımında heterojen greft materyallerinin rezorpsiyon şekli ve miktarının bilinmesi önemlidir (Merkx ve ark., 1999a; 1999b; Artzi ve ark., 2000; Merkx ve ark., 2000; Orsini ve ark., 2007). Keçiler üzerinde yapılan farklı deneysel çalışmalarda ksenogreft ile doldurulan defektlerin 3. ve 6. haftada daha radyopak olduğu (Merkx ve ark., 1999a), 12. haftada defekt bölgesindeki dokunun mineralizasyonunun azalmaya başladığı (Merkx ve ark., 1999b), 24. haftada ise defekt bölgesini dolduran mineralize dokunun eser miktarda olduğu belirtilmiş, histolojik incelemeler sonucunda da greftin osteoklastlar tarafından rezorbe edildiği ortaya konulmuştur (Merkx ve ark., 2000).

Bu çalışmada histopatolojik incelemelerde osteoklastik süreç gözlenmemiştir, Bu durumun, üretilen demineralize at kemik greftinin öncelikle tavşanlarda inert olması ayrıca kısa sürede rezorbe olarak kemik dokuyla yer değiştirmesinden kaynaklandığı sonucuna varılmıştır.

Deproteinize sığır kemiği greftinin alıcı doku tarafından iyi tolere edildiği ve iyileşmeye osteokondüktif katkı gösterdiği bildirilmiştir (Nanmark ve Sennerby, 2008; Pikdöken ve ark., 2011). Ancak bazı çalışmalarda (Skoklund ve ark., 1996; Berlundh ve Lindhe, 1997) deproteinize sığır kemiğinin tamamen rezorbe olmadığı, reabsorpsiyon hızının ve mekanizmasının halen belirsiz olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada, ksenogreft kullanılmadığı için, greft materyalinin makul bir süre sonra tespit edilmemesi olağan bir durum olarak karşılandı.

Kemik hücrelerinin grefte tutunması için zorunlu safha apatit yığılımıdır. Bu gerçekten hareketle, yapısında biyolojik apatit bulunduran greft materyallerinin osteointegrasyon gösterdiği, poröz yapıları vasıtasıyla da kemik dokusunun bu kanalcıkların içine doğru büyümesine imkan sağlayarak yeni kemik yapımını kolaylaştırdığı bildirilmektedir (Spector, 1994; Hammerle ve ark., 1998; Valentini ve ark., 1998; Hurzeler ve ark., 1998; Artzi ve ark., 2000; Van Steenberghe ve ark., 2000; Valentini ve ark., 2000; Artzi ve ark., 2001; Piatelli ve ark., 2002;). Bu çalışmada apatit yığılımı oluşturacak bir greft materyali kullanılmamasına rağmen özellikle PRP uygulanan grupta yeni kemik oluşumunun 3. haftada iyi düzeyde 6. haftada ise ileri düzeyde ($p < 0.05$) olduğu saptandı.

Kırık iyileşmesinin ilk aşamalarında tip II kollajen ağırlıkla gözlenirken ikinci haftadan sonra, tip I kollajen üretimi söz konusu olur (Hiltunen ve ark., 1993; Seeherman ve ark., 2003). Trabeküller şekillenmenin az da olsa çalışmanın 3. hafta PRP'siz grupta da görülmesi, bize kullanıldığımız at kemik greftindeki tip 1 kollajenin ortama sunulmasıyla iyileşmenin tip II kollajen oluşum dönemi gerçekleşmeden başlamasını göstermiştir. Çalışmada elde edilen iyileşme süresinin kısalığında bir nebze bu olgunun katkısının olduğu kanaatine varıldı. Bu çalışmadan 6. hafta sonunda elde edilen bulgular; greft olarak kullandığımız materyalin, komşu kemik dokusu ile hızlı osteointegrasyon göstererek, kemik hücrelerinin tutunması ve çoğalması için bir matriks görevi yaptığını (Spector, 1994; Hammerle ve ark., 1998; Hurzeler ve ark., 1998; Valentini ve ark., 1998; Valentini ve ark., 2000; Van Steenberghe ve ark., 2000; Artzi ve ark., 2001; Kasabah ve ark., 2002; Piatelli ve ark., 2002) gösterdi.

Ektopik dokularda osteoindüktif etki gösteren BMP'leri bulunduran, sığır ve at kaynaklı KPE'lerin dezavantajı fiziki desteğe sahip olmamaları ve vücut ve doku

sıvılarına temaslarında çözünmeye başlamalarıdır. Bu nedenle implantasyonlarında bir taşıyıcı kullanılması gerekli görülmüştür (Li ve ark., 2006; Nienhuijs ve ark., 2006). Bu çalışmada at kaynaklı kemik greftin monokortikal stabil kemik defektinde kullanılmasıyla kaynaklarda bildirilen olumsuzluklarla karşılaşılmadı.

Allogreftlerle ilgili çalışmalarda, demineralizasyon, dondurma ve kurutma işlemlerinin, kortikal kemiğin osteojenik potansiyelini arttırdığı, kemik uyarma potansiyeline sahip KMP'lerin açığa çıkmasına neden olduğu ve bu şekilde kemik oluşumunu arttırdığı görülmüştür (Urist ve ark., 1970; Urist ve ark., 1983). Araştırmacılar (Bowers ve ark., 1985; Francis ve ark., 1995; Bender ve ark., 2005; Mellonig, 2006) tarafından başlatılan ve günümüze kadar gerçekleştirilen histolojik ve klinik araştırmalarda DDKKA/DKM kullanımının etkili bir tedavi yaklaşımı olduğu ortaya konmuştur. DDKKA/DKM ile yapılan araştırmalarda farklı sonuçların elde edilmesine neden olarak partikül büyüklüğü, donör farklılıkları ve greft materyalinin içerisinde osteoindüksiyonu başlatacak miktarda KMP olmaması ya da KMP'lerin inaktif halde olması gibi sebepler gösterilmiştir (Schwarz ve ark., 1996; Boyan ve ark., 2006).

Bu çalışmanın her iki grubunda da aynı kadavradan üretilen, aynı miktar AKPE kullanıldı ancak PRP'li grupta daha yoğun ve düzenli kemik onarımı gözlemlendi. Elde edilen bu sonuç, yukarıdaki literatür verileri (Choukroun ve ark., 2006; Gabling ve ark., 2009; He ve ark., 2009; Inhincgolo ve ark., 2010, Kim ve ark., 2014) ışığı altında, PRP'nin olumlu katkısını ortaya koymuştur.

Çakar ve ark. (2010), DKM ve kalsiyum sülfat (KS) kombinasyonunun macun kıvamının klinik olarak uygulanmasının kolay olması, birden fazla defekte aynı anda uygulanabilmesi ve diğer uygulamalarda karşılaşılan problemlerin görülmemesini, materyalin avantajları olarak değerlendirmektedirler. Bu çalışmada kadavradan üretilen at kemik grefti hidrojel özellikte olup benzer avantajlara sahiptir. PRP kombinasyonları ile elde edilen klinik başarının, yönlendirilmiş doku rejenerasyonu ve biyolojik mediyatörler ile elde edilen başarıya (Hoidal ve ark., 2008; Sculean ve ark., 2008; Trombelli ve Farina, 2008; Yılmaz ve ark., 2009) benzer olduğu bildirilmiştir. Aynı araştırmacılar (Çakar ve ark., 2010) PRP kullanılmasında ise, hastadan alınan kanın işlenmesi için ilave bir cihaza ihtiyaç duyulması, az sayıda defektin tedavi edilebilmesi, uzun hazırlık süresi ve yüksek maliyet açısından tercih edilemeyeceğini

vurgulamışlardır. Bu araştırmadan elde edilen hem histopatolojik hemde tomografik bulgular da gruplar arasında önemli oranda fark ($p < 0,05$) görülmesi bu görüşe katılınmasını mümkün kılmamaktadır.

Titanyum kafes kullanılarak 100 mg/cc dozunda AKPE ile domuzlarda yapılan çalışmada (Li ve ark., 2007), üçüncü ay sonunda otogreft ile benzer histolojik ve radyolojik sonuçlar elde edilmiştir. Seramik taşıyıcı ile 20 mg/cc dozunda KPE ile fibröz doku olmaksızın yeni kemik dokusu elde edilmiştir (Baas ve ark., 2008). Domuzlarda yapılan bir diğer çalışmada ise 8. hafta sonunda PEEK kafes ile 35 mg/cc at KPE ile, otogreft ve BMP-2'nin oluşturduğu kadar kemik oluşumu sağlandığı bildirilmiştir (Foldager ve ark. 2008).

At kemik protein ekstraktı, BMP ve otogreftin karşılaştırıldığı çalışmada (Foldager ve ark., 2009) farklı trabeküler dizilim görüldüğü bildirilmiş, BMP ile AKPE ve otogreftten daha olgun bir kemik dokusu elde edilmiştir. Nienhuijs ve ark. (2010) keçi mandibulasında yaptıkları çalışmada 35 mg/ cc dozunda AKPE ile yeterli kemik oluşmadığını bildirilmişlerdir. Bu durumunda, AKPE'nin içerdiği BF'lerinin neden olduğu aşırı ödem ve defekt üzerine yerleştirilen biyomembranın hücre migrasyonunu engellemesinden kaynaklandığını bildirmişlerdir. Koyun humerusunda karboksimetil-selüloz taşıyıcılığıyla 20 mg/cc AKPE kullanılarak başarılı sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir (Jensen ve ark., 2010). Koyun femurunda hidroksiapatit-betatrikalsiyumfosfatpoli-D-laktik asit ile 100mg/cc AKPE'ı uygulaması ile yeterli miktarda yeni kemik oluşumu elde edilmiştir (Ding ve ark., 2012). Başka bir çalışmada (Baas ve ark., 2012) ise hidroksiapatit kullanımı ile 20 mg/cc dozunda AKPE'ı ile yüksek oranda osteointegrasyon elde edilmiştir. Songür ve ark. (2015) yaklaşık 67 mg/cc dozunda AKPE ile aynı özelliklere sahip DKM den ve kontrol grubuna göre daha yoğun kemik oluşumu elde ettiklerini bildirmişlerdir.

Bu çalışmadan elde edilen sonuç, mevcut çalışmada (Songür ve ark. 2015) göz önüne alınarak, histopatolojik açıdan tartışıldığında PRP grubunda daha kaliteli kemik doku oluştuğu gözlenmiştir ($p < 0.05$). Tomografik açıdan yukarıda bahsedilen hiçbir araştırma ile karşılaştırma yapılamamıştır, bu minvalde Songür ve ark. (2015) da tomografik inceleme yapmamalarını bir eksiklik olarak belirtmişlerdir. Çalışmada kullanılan greft, defekt hacminde, hazırlanarak uygulanmıştır. Her ne kadar önceki

Çalışmalarda geniş bir doz aralığındaki (20–100 mg/cc) kullanımların sonuçları bildirilmişse de bu çalışmada gruplar arasında PRP lehine belirgin fark gözlemlendi ($p < 0,05$). Bu farkın at kaynaklı kemik greftindeki büyüme faktörlerinin yanı sıra bölgeye PRP vasıtasıyla ilave büyüme faktörleri ve sitokinlerin verilmesi sonucu oluştuğı kanaatine varıldı.

Simunek ve ark. (2008) alışmalarında, 9. ayda β -TCP greft kullanılan grupta % 60,4, deproteinize sığır kaynaklı greft kullanılan grupta ise % 75 total kemik alanı elde etmişlerdir. Her ne kadar çalışmamızda nitel bir ölçüm yapılmamışsa da tomografik veriler total kemik alanının, çalışma süresi de göz önünde bulundurulduğunda, özellikle PRP grubunda ($p < 0,05$) başarılı sonuç elde edildiğini gösterdi. Kemik onarımında, fibröz dokunun defekt bölgesine penetrasyonu bölgede fibröz iyileşmeye yol açabilmektedir (Dahlin ve ark., 1988; Lundgren ve ark., 1992). Kollajen bariyerlerin, geniş defektlerde istenmeyen hücrelerin bölgeye invazyonunu engellediğini bildirilmektedir (Mundell ve ark., 1993). Bu çalışmada büyük oranda tip I kollajen ihtiva eden greft materyalinin istenmeyen çevre doku ve hücrelerin defekt alanına invazyonunu önlediğini histopatolojik bulgulardan anlaşılmıştır.

Demineralize kemik matriksi, osteokondüktif, ve de osteoindüktif özellik gösterir. Ayrıca DKM, canlı kemik hücrelerinde içermez. Bu nedenle kanla beslenmesi iyi ve yoğun osteoprogenitör desteğı olan bölgelerde kullanılmalıdır ya da otojen kemik grefti ile desteklenmelidir (Aspeberg ve ark., 1990; McLean 1993; Muntig ve ark., 1998). Bu çalışmada oluşturulan kemik defektleri monokortikal olup, kansellöz kemik yapıyla ilişkilidir. Bu nedenle bölgede yeni kemik oluşumunda önemli rolü olan anjiogenetik ve osteogenetik hücrelerin ekstra varlığında söz konusudur. Bu nedenlerle, çalışmadan elde edilen sonuçların değerlendirilmesinde bu hususun özellikle segmenter onarımlarda göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

Yapılan bu çalışmada, çalışma planı kapsamında üretilen at kemik grefti ve PRP ile birlikte kullanımıyla kemik defektinin onarımında iyileşme sürecini incelemek, greft uygulamalarında da biyomateryal çeşitliliğini artırmak amaçlandı ve çalışma sonunda bu amaca yönelik aşağıdaki bulgu ve sonuçlara ulaşıldı.

Çalışmanın önemli bulguları olarak, çalışma planı kapsamında üretilen at kemik grefti ile endokondral ossifikasyon ve PRP ile birlikte kullanımından da kısa sürede matür kemik oluşumunun elde edilmesi söylenebilir.

Yaygın katılımlı klinik çalışmalara gereksinim olmakla birlikte, çalışmada takip edilen protokol çerçevesinde, üretilen at kemik greftinin PRP ile birlikte kullanılmasıyla tavşanlarda kritik boyut kemik defektinin onarımında başarılı sonuç elde edildi.



ÖZET

Gökdere D. Kemik Defektlerinin Onarımında Kollajenize At Kemik Greftinin Tek Başına ve Trombositten Zengin Plazma (PRP) Uygulaması ile Birlikte Kullanımının Histopatolojik ve Tomografik (Micro-CT) Değerlendirilmesi: Deneyisel Çalışma. Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Veteriner Programı, Cerrahi Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Van, 2018. Bu çalışmada; osteoindüktif özelliklere sahip ve yüksek oranda tip I kollajen ve diğer kemik proteinlerini içeren, kollajenize at kemik greftinin PRP ile birlikte, kaviter kemik defektlerinin onarımında etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Kaviter kemik defektleri tavşan femur kondillerinde oluşturuldu. Medial girişimle her iki femur kondillerinde 6 mm. çapında ve 10 mm. derinliğinde kemik defektleri oluşturuldu. Femur kondillerinden birine, birinci grup (n=16), yalnızca kollajenize at kemik grefti, diğer ikinci gruba (n=16) kollajenize at kemik grefti ve bir hafta sonra kavite bölgesine 0,5 cc PRP uygulandı. Üçüncü ve altıncı hafta sonunda defekt bölgesinin tomografik ve histopatolojik incelenmesi yapılarak analiz edildi. Radyolojik incelemede defektin kaviter defekt olması nedeniyle belirgin bir radyolojik fark saptanmadı. Histopatolojik incelemelerde yeni kemik oluşumu açısından kollajenize at kemik grefti ve PRP uygulanan grupta yalnızca kollajenize at kemik grefti uygulanan gruptan daha yüksek değerler bulunmuştur ve bu değerlerin istatistiksel ($p < 0.05$) olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Tomografik incelemelerde ise greft inkorporasyonu ve kemik oluşum kalitesi açısından kollajenize at kemik grefti ve PRP grubunda, kollajenize at kemik grefti grubuna göre daha yüksek değerler elde edilmiştir ($p < 0.05$). Çalışmada kollajenize at kemik greftinin kullanılmasıyla; kemik protein ekstraktının osteoindüktif özellikleri ile ilgili bildirilmiş önceki yayınlar ile uyumlu bulgular gözlenmiş, ayrıca at kemik greftinin PRP ile birlikte kullanılması protokolünün, kaviter kemik defektlerinin onarımında, uygulanması ile de hem kemik oluşum kalitesi bakımından hem de onarım süresi açısından olumlu sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler: At kemik grefti, Büyüme faktörleri, Kemik defekti, Osteogenezis, Osteoindüksiyon, PRP

SUMMARY

Gökdere D. Histopathologic and Tomographic (micro-CT) Evaluation of Collagenated Horse Bone Graft Alone and in Combination with Platelet Rich Plasma (PRP) Treatment in Rapair of Bone Defects: Experimental Study. Van Yuzuncu Yil University Health Science Institute, Program of Veterinary, Department of Surgery, Master Thesis, Van, 2018. In this study it is aimed to evaluate the effectiveness of the collagenized horse bone graft that has osteoinductive properties, high ratio type I collagen and other bone proteins, with PRP on the treatment of cavitary bone defects. Cavitary bone defects were created on the condyle of the femur. For one of the condyle, only collagenized horse bone graft was applied (first group n=16), and for the other condyle, one week later following application of collagenized horse bone graft, 0,5 cc PRP was also administered (second group n=16). At the end of the third and sixth week, the tomographic and histopathologic evaluations were performed on the defect areas. In the histopathologic evaluations, higher values were determined in the second group in the aspect of new bone formation, and these values were statically significant ($p < 0.05$). In the tomographic assessments, higher values were obtained in the second group in the aspect of incorporation of the graft and bone formation quality ($p < 0.05$). By the usage of collagenized horse bone graft, similar findings were obtained with earlier publications that report osteoindüktive properties of bone protein extracts, and favorable outcomes were achieved by combined usage of horse bone graft with PRP considering the bone formation quality and repair time.

Key words: Bone defect, Growth factors, Horse bone graft, Osteogenesis, Ostedoiduction, PRP

KAYNAKLAR

- Aaboe M, Pinholt EM, Hjorting-Hansen E (1994). Unicortical critical size defect of rabbit tibia is larger than 8 mm. *J Craniofac Surg*, 5(3): 201-203.
- Aaboe M, Pinhol ME, Hjorting-Hansen, E (1995). Healing of experimentally created defects: A review, *Br J Oral Maxillofac Surg*, 33, 312-318.
- Alberius P, Dahlin C, Linde A (1992). Role of osteopromotion in experimental bone grafting to the skull, *J Oral Maxillofac Surg*, 50, 829-834.
- Albrektsson T, Johansson C (2001). Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J, Suppl* 2: 96-101.
- Alexander JW (1987). Bone Grafting. *Vet Clin North Am Small Anim Prac*, 17(4): 811-819.
- Alpaslan C, Irie K, Takahashi K, Ohashi N, Sakai H, Nakajima T, Ozowa H (1996). Long term evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced bone formation with a biologic and synthetic delivery system. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 34: 414-418.
- Anderson JM (2001). Biological responses to materials. *Ann Rev Mater Res*, 31: 81-110.
- Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT (2008). Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology, Elsevier, pp*, 86-100.
- Artzi T, , Merten HA (1998). Klinisch relevante, durch bone inducing complex (BIC) induzierte osteogenese im rahmen der sinus-bodenelevation. *Stomatologie*, 95: 739-743.
- Artzi Z, Tal H, Dayan D (2000). Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. part 1: histomorphometric evaluations at 9 months. *J Periodontol*, 71(6): 1015-1023.
- Artzi Z, Tal H, Dayan D (2001). Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. histochemical observations at 9 months. *J Periodontol*, 72(2): 152-159.
- Asharani PV, Keupp K, Semler O, Wang W, Li Y, Thiele H, Yigit G, Pohl E, Becker J, Frommolt P, Sonntag C, Altmuller J, Zimmermann K, Greenspan DS, Akarsu NA, Netzer C, Schonau E, Wirth R, Hammerschmidt M, Nurnberg P, Wollnik B, Carney TJ (2012). Attenuated BMP1 function compromises osteogenesis, leading to bone fragility in humans and zebrafish. *Am J Hum Gen*, 90: 661-674.
- Aspenberg P, Johnsson E, Thorngren KG (1990). Dose-dependent reduction of bone inductive properties by ethylene oxide. *J Bone Joint Surg Br*, 72B: 1036-1047.
- Athanasίου VT, Papachristou DJ, Panagopoulos A, Saridis A, Scopa CD, Megas P (2010). Histological comparison of autograft, allograft, allograft-DBM, xenograft and

synthetic grafts in a trabecular bone defect: An experimental study in rabbits. *Med Sci Monit*, 16(1): 24-31.

Baas J, Elmengaard B, Bechtold J, Chen X, Soballe K (2008). Ceramic bone graft substitute with equine bone protein extract is comparable to allograft in terms of implant fixation: a study in dogs. *Acta Orthop*, 79: 841-850.

Baas J, Jakobsen T, Elmengaard B, Bechtold JE, Soballe K (2012). The effect of adding an equine bone matrix protein lyophilisate on fixation and osseointegration of HA-coated Ti implants. *J Biomed Mater Res A*, 100: 188-194.

Bagheri SC, Bell B, Khan HA (2011). Current Therapy In Oral and Maxillofacial Surgery. *Elsevier Health Sciences*.

Bender SA, Rogalski JB, Millis MP, Arnold RM, Cochran DL, Melloning JT (2005). Evaluation of demineralized bone matrix paste and putty in periodontal intraosseous defects. *J Periodontol*, 76: 768-777.

Berglundh T, Lindhe J (1997). Healing around implants placed in bone defects treated with Bio-Oss®. An experimental study in the dog. *Clin Oral Imp Res*, 8: 117-124.

Bertagnoli R (2002). Osteoinductive bone regeneration substance Colloss in spinal fusion. *Eur Spine J*, 11: 189-195.

Boden SD, Schimandle JH, Hutton WC (1995). Lumbar inter- transverse-process spinal arthrodesis with use of a bovine bone-derived osteoinductive protein. A preliminary report. *J Bone Joint Surg Am*, 77: 1404-1417.

Bosch C, Melsen B, Vangervik K (1998). Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J. Craniofac Surg*, 9(4): 310-316.

Bostrom MPG, Yang X, Koutras I (2000). Biologics in bone healing. *Curr Opin Orthop*, 11: 403-412.

Botticelli D, Berglundh T, Lindhe J (2004). The influence of a biomaterial on the closure of a marginal hard tissue defect adjacent to implants. An experimental study in the dog. *Clin Oral Impl Res*, 15: 285-292.

Boyan DB, Ranly MD, McMillan J, Sunwoo M, Roche K, Schwartz Z (2006). Osteoinductive ability of human allograft formulations. *J Periodontol*, 77: 1555-1563.

Bowers GM, Granet M, Stevens M, Emerson J, Corio R (1985). Histologic evaluation of new attachment in humans. A preliminary report: *J Periodontol*, 56: 381-3967.

Bragdon B, Moseychuk O, Saldanha S, King D, Julian J, Nohe A (2011). Bone morphogenetic proteins: a critical review. *Cellular Signalling*, 23: 609-620.

Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R (1996). Bone Biology. I. Structure, blood supply, cells, matrix, and mineralization. *Instructional Course Lectures*, 45: 371-386.

- Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L (2009). Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury* 40, Suppl, 3: 67-76.
- Can HN (2013). Tavşanlarda Deneysel Olarak Oluşturulan Kemik Defektlerinin İyileşmesi Üzerinde Değişik Greft Materyalleri ve Trombositten Zengin Fibrinin Etkilerinin İncelenmesi. *Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Elazığ*.
- Can HN, Durmuş AS (2015). Trombositten Zengin Fibrin'in kemik iyileşmesi üzerine etkileri. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 29(2): 91-95.
- Carlson NE, Roach RB Jr (2002). Platelet-rich plasma: clinical applications in dentistry. *J Am Dent Assoc*, 133: 1383–1386.
- Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard M-O, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *OOOOE*, 101: 299-303.
- Clark AE (1998). Comparison of porous bone mineral and biologically active glass in critical-sized defects *J Periodontol*, 69(11): 1312-1314.
- Constantino PD, Friedman CD (1994). Soft tissue augmentation and replacement in the head and neck. *Otolaryngol Clin North Am*, 27(1): 1-12.
- Çakar G, Özkan E, İpçi ŞD, Ü Noyan, Yılmaz S (2010). Demineralize kemik matriksi ve kalsiyum sülfat kombinasyonunun kronik periodontitisli hastalardaki kemik içi defektlerin tedavisinde kullanımının klinik ve radyografik olarak incelenmesi: Olgu Serisi. *İstanbul Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi*, 44 (2): 125-132.
- Çılbır Ö (1999). Pyrost, Demineralize Kemik ve Solvent Dehidrate Kemik Greftlerinin Membranlı ve Membransız Kullanımının Kemik İyileşmesi Üzerine Etkilerinin Deneysel Olarak İncelenmesi, *Doktora Tezi, Gazi Üniv. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD, Ankara*.
- Dahlin C, Alberius P, Linde A (1991). Osteopromotion for Cranioplasty, *J Neurosurg*, 74, 487-491.
- Dahlin C, Linde A, Gottlow J, Nyman S (1988). Healing of bone defects by guided tissue regeneration, *Plast Reconst Sur*, 81(5), 672-676.
- Ding M, Røjskjaer J, Cheng L, Theilgaard N, Overgaard S (2012). The effects of a novel-reinforced bone substitute and Colloss E on bone defect healing in sheep. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 100: 1826-1835.
- Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B (2006). Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *OOOOE*, 101: 45-50.
- Dohan DM, Rasmusson L, Albrektsson T (2009). Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte-and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends in Biotechnology*, 27: 158-167.

Durmuş A, Can HN (2016). Trombositten Zengin Fibrin ve ortopedik cerrahide kullanımı. *Türkiye Klinikleri J Vet Sci*, 7(1): 24-29.

Durmuş AS, Ünsaldı E (2001). Köpeklerde Deneysel Maddi Kayıplı Femur Kırıklarında Koral ve Spongiyöz Ototref Uygulamalarının Karşılaştırması. *F Ü Sağ Bil Vet Derg*, 15(1): 101-112.

Efeoglu C, Akçay YD, Ertürk S (2004). A modified method for preparing platelet-rich plasma: An experimental study. *J Oral Maxillofac Surg*, 62: 1403-1407.

Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH (1984). The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix: a radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*, 66: 2749-2757.

El-Sabban ME, El-Khoury H, Hamdan-Khalil R, Sindet- Pedersen S, Bazarbachi A (2007). Xenogenic bone matrix extracts induce osteoblastic differentiation of human bone marrow- derived mesenchymal stem cells. *Regen Med*, 2: 383-390.

Eppley BL, Woodell JE, Higgins JP (2004). Platelet quantification and growth factor analysis from platelet-rich plasma: implications for wound healing. *Plast Reconst Sur*, 114: 1502-1508.

Ferreira FC, Gomez MCC, Filho JS, Granjeiro JM, Simoes CMO, Magini RS (2005). Platelet-rich plasma influence on human osteoblasts growth. *Clin Oral Implants Res*, 16: 456-460.

Finkemeier CG (2002). Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am*, 84: 45-64.

Francis RM, Brunsvold MA, Prewett AB, Mellonig JT (1995). Clinical evaluation of an allogenic bone matrix in the treatment of periodontal osseous defects. *J Periodontol*, 66: 1074- 1079.

Foldager C, Bendtsen M, Nygaard JV, Zou X, Bünger C (2009). Differences in early osteogenesis and bone micro-architecture in anterior lumbar interbody fusion with rh-BMP-2, equine bone protein extract, and autograft. *Bone*, 45: 267-273.

Foldager C, Bendtsen M, Zou X, Zou L, Olsen AK, Munk OL (2008). ISSLS prize winner: positron emission tomography and magnetic resonance imaging for monitoring interbody fusion with equine bone protein extract, recombinant human bone morphogenetic protein-2, and autograft. *Spine*, 33: 2683-2690.

Fukuta K, Har-Shai Y, Collares MV, Lichten JB, Jackson IT (1992). Comparison of inorganic bovine bone mineral particles with porous hydroxyapatite granules and cranial bone dust in the reconstruction of full- thickness skull defect. *J Craniofac Surg*, 3(1): 25-29.

Fujimoro K, Bessho K, Kusumoto K, Konishi Y, Ogowa Y, Lizuka T (2001). Experimental osteoinduction by recombinant human bone morphogenetic protein-2 in tissue with low blood flow: a study in rats. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 39: 294-300.

Gabling VL, Aıl Y, Springer IN, Hubert N, Wiltfang J (2009). Platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin in human cell culture. *OOOOE*, 108: 48-55.

Garant PR (2003). Oral Cells and Tissues. Quintessence Pub. Co.

Garg KA (2004). Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants: Rationale and Clinical Applications. 1th ed. Chicago, Quintessence Publishing Company, 1-56.

Gepstein R, Weiss RE , Hallel T (1987). Bridging large defects in bone by demineralized bone matrix in the form of a powder: a radiographic, histological, and radioisotope uptake study in rats. *J Bone Joint Surg Am*, 69: 92-99.

Gosain AK, Song L, Yu P, Mehrara BJ, Maeda CY, Gold LI, Longaker MT (2000). Osteogenesis in cranial defects: reassessment of the concept of critical size and the expression of tgf-beta isoforms. *Plast Recon Surg*, 106(2): 360-372.

Görmez U (2008). Dental implant çevresinde cerrahi olarak oluşturulan kemik defektlerinde sığır kaynaklı laktoferrinin kemik rejenerasyonuna etkisi. Doktora Tezi, *T.C. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Ağız, Diş, Çene Hastalıkları ve Cerrahisi AD*, Adana.

Grgurevic L, Macek B, Mercep M, Jelic M, Smoljanovic T, Erjavec I, Dumic-Cule I, Prgommet S, Durdevic D, Vnuk D, Lipar M, Stejskal M, Kufner V, Brkljacic J, Maticic D, Vukicevic S (2011). Bone morphogenetic protein (BMP)1-3 enhances bone repair. *Biochemical and Biophysical Res Com*, 408: 25-31.

Groeneveld EH, Burger EH (2000). Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. *Eur J Endocrinol*, 142: 9-21.

Grover V, Kapoor A, Malhotra R, Sachdeva S (2011). Bone allografts: A review of safety and efficacy. *Ind J Dent Res*, 22: 496-504.

Guillemin G, Meunier A, Dallant P, Christel P, Pouliquen JC, Sedel L (1989). Comparison of coral resorption bone apposition with two natural corals of different porosities. *J Biomed Mater Res*, 23: 765-779.

Hammerle CH, Chiantella GC, Karring T, Lang NP (1998). The Effect of a Deproteinized Bovine Bone Mineral on Bone Regeneration Around Titanium Dental Implants. *Clin Oral Implants Res*, 9(3): 151-162.

He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H (2009). A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *OOOOE*, 108: 707-713.

Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT (1993). A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*, 11: 305-312.

Ho S, Peel S, Hu ZM, Sándor G, Clokie C (2009). Augmentation of the maxillary sinus: comparison of bioimplants containing bone morphogenetic protein and autogenous bone in a rabbit model. *J Can Dent Assoc*, 76: 108-108.

Hollinger JO, Kleinschmidt JC (1990). The Critical Size Defect as an experimental model to test bone repair materials. *J Craniofac Surg*, 1(1): 60-68.

Hoidal MJ, Grimard BA, Mills MP, Schoolfield JD, Mellonig JT, Mealey BL (2008). Clinical evaluation of demineralized freeze-dried bone allograft with and without enamel matrix derivative for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J Periodontol*, 79: 2273-2280.

Hupp JR (2013). Contemporary Oral and Maxillofacial Surgery, 6e. Elsevier, India.

Hopkins DR, Keles S and Greenspan DS (2007) The bone morphogenetic protein 1/Tolloid-like metalloproteinases. *Matrix Biology*, 26: 508-523.

Hurzeler MB, Kohal RJ, Naghshbandi J, Mota LF, Conradt J, Hutmacher D, Caffesse RG (1998). Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 27(4): 315-320.

Inchingolo F, Tatullo M, Marrelli M, Inchingolo A, Scacco S, Inchingolo A, Dipalma G, Vermesan D, Abbinante A, Cagiano R (2010). Trial with Platelet-Rich Fibrin and Bio-Oss used as grafting materials in the treatment of the severe maxillary bone atrophy: clinical and radiological evaluations. *Eur Rev Medi and Pharma Sci*, 14: 1075-1084.

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. *Clin Oral Implants Res*, 14(5): 578-583.

Jang HY, Kim HC, Lee SC, Lee JY (2010). Choice of graft material in relation to maxillary sinus width in internal sinus floor augmentation. *J Oral Maxillofac Surg*, 68: 1859-1868.

Jiang XQ, Sun XJ, Lai HC, Zhao J, Wang SY, Zhang ZY (2009). Maxillary sinus floor elevation using a tissue-engineered bone complex with β -TCP and BMP-2 gene-modified bMSCs in rabbits. *Clin Oral Imp Res*, 20: 1333-1340.

Jensen J, Foldager CB, Jakobsen TV, Søballe K, Bünger C, Baas J (2010). Use of carboxymethyl cellulose and collagen carrier with equine bone lyophilisate suggests late onset bone regenerative effect in a humerus drill defect-a pilot study in six sheep. *Open Orthop J*, 4: 181-187.

Kahnberg K (2005). Bone Grafting Techniques for Maxillary Implants. Hong Kong, Blackwell Munksgaard, 1-7.

Kalfas IH (2001). Principles of Bone Healing. *Neurosurgical Focus*, 10:E1.

Kao ST, Scott DD (2007). A review of bone substitutes. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 19: 513-521.

Kasabah S, Simunek A, Krug J, Lecaro MC (2002). Maxillary sinus augmentation with deproteinized bovine bone (bio-oss) and impladent dental implant system. Part II. Evaluation of deprotienized bovine bone (Bio-Oss) and implant surface. *Acta Medica*, 45(4): 167-171.

- Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA (2000). Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: Case series. *J Periodontol*, 71: 1654-1661.
- Keating JF, McQueen MM (2001). Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *The J Bone Joint Surg Br*, 83: 3-8.
- Khan SN, Tomin E, Lane JM (2000). Clinical applications of bone graft substitutes. *Ortho Clin North Am*, 31: 389-398.
- Khoury F, Antoun H, Missika P (2007). Bone Augmentation in Oral Implantology. Quintessence.
- Kim BJ, Kwon TK, Baek HS, Hwang DS, Kim CH, Chung IK, Jeong JS, Shin SH (2012). A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits. *OOOOE*, 113: 583-592.
- Kim SG, Chung CH, Kim YK (2002). Use of particulate dentinplaster of Paris combination with/without platelet-rich plasma in the treatment of bone defects around implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 17: 86-94.
- Kim TH, Kim SH, Sador GK, Kim YD (2014). Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol*, 59: 550-558.
- Kleinschmidt JC, Hollinger JO (1992). Animal Models in Bone Research in “ Bone Grafts & Bone Substitutes ”, (Mutaz HB, Reddi AH ed.) Vol: 13, 133-146, W.B. Saunders Company, Pennsylvania, Philadelphia.
- Kluppel LE, Antonini F, Olate S, Nascimento FF, Albergaria-Barbosa JR, Mazzonetto R (2013). bone repair is influenced by different particle sizes of anorganic bovine bone matrix: A histological and radiographic study in vivo. *J Craniofac Surg*, 24(4): 1074-1077.
- Kocazeybek B, Arabaci U, Akdur H, Sezgiç M, Erentürk S (2002). Prospective evaluation of platelets prepared by single and random methods during 5 days of storage: aspects related to quality and quantity. *Transfus Apher Sci*, 26: 29-34.
- Kökden A, Türker M (1999). Oral ve maxillofasiyal cerrahide kullanılan kemik greftleri ve biyomateryaller. *Cumhuriyet Dental Journal*, 2: 134-140.
- Lasmezas CI (2003). The transmissible spongiform encephalopathies. *Rev Sci Tech*, 22: 23-36.
- Lemperle SM, Calhoun CJ, Curran RW, Holmes RE (1998). Bony healing of large cranial and mandibular defects protected from soft-tissue interposition: a comparative study of spontaneous bone regeneration, osteoconduction, and cancellous autografting in dogs. *Plast Reconst Surg*, 101(3): 660-672.
- Li H, Springer M, Zou X, Briest A, Büngrer C (2006). Ectopic bone induction by equine bone protein extract. *Adv Exp Med Biol*, 585: 393-402.

- Li H, Zou X, Springer M, Briest A, Lind M, Bunger C (2007). Instrumented anterior lumbar interbody fusion with equine bone protein extract. *Spine*, 32: 126-129.
- Li H, Zou X, Woo C, Ding M, Lind M, Bunger C (2005). Experimental anterior lumbar interbody fusion with an os- teoinductive bovine bone collagen extract. *Spine*, 30: 890–896.
- Li SW, Sieron AL, Fertala A, Hojima Y, Arnold WV, Prockop DJ (1996). The C-proteinase that processes procollagens to fibrillar collagens is identical to the protein previously identified as bone morphogenic protein-1. *Proceed Nat Acad Sci*, 93: 5127-5130.
- Lindhe J, Lang NP, Karring T (2009). Clinical Periodontology and Implant Dentistry. Wiley
- Little N, Rogers B, Flannery M (2011). Bone formation, remodelling and healing. *Surgery (Oxford)*, 29: 141-145.
- Lundgren D, Nyman S, Mathisen T, Isaksson S, Klinge, B (1992). Guided bone regeneration of cranial defects, using biodegradable barriers: An experimental pilot study in the rabbit. *J Cranio Maxillofac Surg*, 20, 257- 260.
- Lucarelli E, Beccheroni A, Donati D, Sangiorgi L, A C (2003). Platelet derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials*, 24: 3095-3100.
- Lynch SE, Genco RJ , Marx RE (1999). Tissue Engineering. 217-226. Quintessence boks, Illinois,
- Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW (1999). Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res*, 324: 86-97.
- Manolagas SC (2000). Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev*, 21(2): 115-137.
- Marby TW, Yukna RA, Sepe WW (1985). Freeze- dried bone allografts combined with tetracycline in the treatment of juvenile periodontitis. *J Periodontol*, 56: 74-81.
- Marukawa E, Oshina H, Iino G, Morita K, Omura K (2011). Reduction of bone resorption by the application of platelet-rich plasma (PRP) in bone grafting of the alveolar cleft. *J Cranio Maxillofac Surg*, 39: 278-283.
- Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998). Platelet-Rich Plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *OOOOE*, 85: 638-646.
- McLean VA (1993). AATB information alert. *American Association of Tissue Banks*.
- Mellonig JT (1984). Decalcified freeze-dried bone allografts as an implant material in human periodontal defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 4: 41-55.

- Mellonig JT (2006). Histologic evaluation of an allogenic bone matrix for the treatment of periodontal osseous defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 6: 561-569.
- Merkx MA, Maltha JC, Freihofer HP, Kuijpers- Jagtman AM (1999a). Incorporation of three types of bone block implants in the facial skeleton. *Biomaterials*, 20(7): 639-645.
- Merkx MA, Maltha JC, Freihofer HP, Kuijpers- Jagtman AM (1999b). Incorporation of Particulated Bone Implants in the Facial Skeleton. *Biomaterials*, 20(21): 2029-2035.
- Merkx MA, Maltha JC, Freihofer HP (2000). Incorporation of Composite Bone Implants in the Facial Skeleton. *Clin. Oral Implants Res.* 11(5): 422-429
- Miller SC, de Saint-Georges L, Bowman B , Jee W (1989). Bone lining cells: structure and function. *Scanning Microscopy*, 3: 953-960.
- Mills SE (2012). Histology for Pathologists. Wolters Kluwer Health.
- Miloro M, Ghali GE, Larsen P, Waite P (2004). Peterson's Principles of Oral and Maxillofacial Surgery, B C Decker.
- Minamide A, Tamaki T, Kawakami M, Hashizume H, Yoshida M, Sakata R (1999). Experimental spinal fusion using sintered bovine bone coated with type I collagen and recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Spin*; 24(18): 1863-1870
- Misch CE (2008). Contemporary Implant Dentistry. Mosby Elsevier, St. Louis, Missouri. Marsh DR and Li G (1999). The biology of fracture healing: optimising outcome. *Br Med Bulletin*, 55: 856-869.
- Mizuno M, Fujisawa R, Kuboki Y (2000). Type I collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen-alpha2 beta1 integrin interaction. *J Cell Physiol*, 184: 207-216.
- Mokbel N, Bou Serhal C, Matni G, Naaman N (2008). Healing Patterns of Clinical Size Bony Defects in Rat Following Bone Graft. *J Oral Maxillofac Surg*, 2: 73-78.
- Mundell RD, Mooney MP, Siegel, ML, Losken A (1993). Osseous Guided Tissue Regeneration Using a Collagen Barrier Membrane, *J Oral Maxillofac Surg*, 51: 1004-1012
- Mundy GR (1995). Osteoblasts, bone formation and mineralization. In: Fogelman I.ed. Bone Remodeling and Its Disorders. London: Maetin Dunitz, 1737-1743.
- Munting E, Wilmarth JF, Wijne A, Hennebert P, Delloye C (1998). Effect of sterilization on osteoinduction. Comparison of five methods in demineralized rat bone. *Acta Orthop Scand*, 59: 34-38.
- Mustoe TA, Purdy J, Gramates P, Deuel TF, Thomasen A, Pierce GF (1989). Reversal of impaired wound healing in irradiated rats by platelet-derived growth factor-BB: requirement of an active bone marrow. *Am J Surg*, 158: 345-350.
- Nanci A (2008). Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure, and Function. Mosby Elsevier.

- Nannmark U, Azarmehr I (2010). Short Communication: Collagenated Cortico-Cancellous Porcine Bone Grafts. A Study in Rabbit Maxillary Defects. *Clin Imp Dent and Related Res*, 12: 161-163.
- Nannmark U, Sennerby L (2008). The Bone Tissue Responses to Prehydrated and collagenated cortico-cancellous porcine bone grafts: A study in rabbit maxillary defects. *Clin Imp Dent and Related Res*, 10: 264-270.
- Nash TJ, Howlett CR, Martin C, Steele J, Johnson KA, Hicklin DJ (1994). Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone*, 15(2): 203-208.
- Niederwanger M, Urist MR (1996). Demineralized bone matrix supplied by bone banks for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein (rhbmp-2): a substitute for autogeneic bone grefts. *J Oral Implant*, 22: 210-215.
- Nienhuijs ME, Poulsen K, van der Zande M, Briest A, Merkx MA, Stoelinga PJ (2009). Analytical assessment of the osteoinductive material COLLOSSE. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 89: 300-305.
- Nienhuijs ME, Walboomers XF, Briest A, Merkx MA, Stoelinga PJ, Jansen JA (2010). Healing of bone defects in the goat mandible, using COLLOSS E and beta-tricalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 92: 517-524.
- Nienhuijs MEL, Walboomers XF, Merkx MAW, Stoelinga PJW, Jansen JA (2006). Bonelike tissue formation using an equine COLLOSS E-filled titanium scaffolding material. *Biomaterials*, 27: 3109-3114.
- Nolff MC, Gellrich NC, Hauschild G, Fehr M, Bormann KH, Rohn K, Spalthoff S, Rücker M, Kokemüller H (2009). Comparison of two Beta- Tricalcium Phosphate composite grafts used for reconstruction of mandibular critical size bone defects. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 22(2): 96-102.
- Omura S, Mizuki N, Kawabe R, Ota S, Kobayashi S, Fujita K (1998). A carrier for clinical use of recombinant human bmp- 2:dehydrothermally cross linked composite of fibrillar and denatured atelocollagen sponge. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 27: 129-134.
- Orsini G, Scarano A, Degidi M, Caputi S, Iezzi G, Piattelli A (2007). Histological and ultrastructural evaluation of bone around Bio-Oss particles in sinus augmentation. *Oral Dis*, 13(6): 586-593.
- Ott SM (2010). New Aspects of Normal Bone Biology. In: Olgaard K, Salusky IS, Silver J (eds). The spectrum of mineral and bone disorders in chronic kidney disease. 2nd ed. Oxford, Oxford University Press, 15-29.
- Parikh SN (2002). Bone graft substitutes: past, present, future. *J Postgrad Med*, 48(2): 142-148.
- Piatelli A, Değdi M, Di Stefano DA, Rubinei C, Fiorini M, Strocchi R (2002). Microvessel Density in Alveolar Ridge Regeneration with Autologous and Alloplastic Bone. *Implant Dent*. 11(4) 370-375

- Pierce GF, Tarpley J, Yanagihara D, Deuel TF (1992). PDGF-BB, TGF-B1, and basic FGF in dermal wound healing: neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol*, 140: 1375-1388.
- Pikdöken L, Gürbüz B, Küçükodacı Z, Urhan M, Barış E, Tezulaş E (2011). Sintigraphic, histologic, and histomorphometric analyses of bovine bone mineral and autogenous bone mixture in sinus floor augmentation: A randomized controlled trial- results after 4 months of healing. *J Oral Maxillofac Surg*, 69: 160-169.
- Prewett AB, Moyer MP, OLeary RK, Mellonig JT (1992). Decalcification inactivates HIV in spiked and infected bone. *Trans Orthop Res Soc*, 17: 436-445.
- Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S (2009). Proportion of deproteinized bovine bone and autogenous bone affects bone formation in the treatment of calvarial defects in rabbits. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 38(4): 356-362.
- Pripatnanont P, Nuntanaranont T, Vongvatcharanon S, Phurisat K (2013). The primacy of platelet-rich fibrin on bone regeneration of various grafts in rabbit's calvarial defects. *J Cranio Maxillofac Surg*, 41: 191-200.
- Quintero G, Mellonig JT, Gambill VM, Pelleu GB (1982). A six-month clinical evaluation of decalcified freeze-dried bone allografts in periodontal osseous defects. *J Periodontol*, 53: 726-730.
- Ragni P, Lindholm TS (1991). Interaction of allogeneic demineralized bone matrix and porous hydroxyapatite bioceramics in lumbar interbody fusion in rabbits. *Clin Orthop*, 272: 2929-2937.
- Raghoobar GM, Schortinghuis J, Liem RSB, Ruben JL, Van Der Wal JE, Vissink A (2005). Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? *Clin Oral Implants Res*, 16: 349-356.
- Reddi AH (2000). Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside. *Biochem Soc Trans*, 28: 345-349.
- Richardson CR, Mellonig JT, Brunsvold MA, McDonnell HT, Cochran DL (1999). Clinical evaluation of Bio-Oss: A bovine-derived xenograft for the treatment of periodontal osseous defects in humans. *J. Clin. Periodontol*, 26(7): 421-428.
- Ripamonti U, Duneas N (1998). Tissue morphogenesis and regeneration by bone morphogenetic proteins. *Plast Reconstr Surg*, 101: 227-239.
- Roden RD (2010). Principles of bone grafting. *Atlas Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 22: 295-300.
- Russell JL, Block JE (1999). Clinical utility of demineralized bone matrix for osseous defects, arthrodesis, and reconstruction: impact of processing techniques and study methodology. *Orthopedic*, 22: 524-531.
- Salkeld SL, Patron LP, Barrack RL, Cook SD (2001). The effect of osteogenic protein-1 on the healing of segmental bone defects treated with autograft or allograft bone. *J Bone Joint Surg Am*, 83A(6): 803-816.

- Sanchez AR, Sheridan PJ, Kupp LI (2003). Is Platelet-rich Plasma the Perfect Enhancement Factor? A Current Review. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18: 93-103.
- Sandberg E, Dahlin C, Linde A (1993). Bone Regeneration by the osteopromotion Technique Using Bioabsorbable Membranes: An Experimental Study in Rats, *J.Oral Maxillofac. Surg.*, 51: 1106-1114.
- Sassard WR, Eidman DK, Gray PM, Block JE, Russo R, Russell JL, Taboada EM (2000). Augmenting local bone with Grafton demineralized bone matrix for posterolateral lumbar spine fusion: avoiding second site autologous bone harvest. *Orthopedics*, 23:1059-1075.
- Schlegel KA, Donath K, Rupprecht S, Falk S, Zimmermann R, Felshzeghy E, Wiltfang J. (2004). De novo bone formation using bovine collagen and platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 25: 5387-5393.
- Schlegel KA, Kloss FR, Kessler P (2003). Bone conditioning to enhance implant osseointegration: an experimental study in pigs. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 18: 505-511.
- Schmitz JP, Hollinger JO (1986). The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop*, 205: 299-308.
- Schwarz Z, Mellonig JT, Carnes DL (1996). Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to induce new bone formation. *J Periodontol*, 67: 918-926.
- Schwartz Z, Somers A, Mellonig JT, Carnes DL Jr, Wozney JM, Dean DD, Cochran DL, Boyan BD (1998). Addition of human recombinant bone morphogenetic protein-2 to inactive commercial human demineralized freeze-dried bone allograft makes an effective composite bone inductive implant material. *J Periodontol*, 69: 1337-1345.
- Sculean A, Chiantella GC, Arweiler NB, Becker J, Schwartz F, Stravropoulos A (2008). Clinical and histologic evaluation of an enamel matrix derivative combined with a biphasic calcium phosphate for the treatment of human intrabony periodontal defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 28: 153-161.
- Seeherman H, Li R, Wozney J (2003). A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg Am*, 85A: 96-108.
- Sicca CM, Corotti MV, Sgarbosa SHPV, Cestari TM, Cavalcanti MGP, Ferreira PM, Taga R, Granjeiro JM (2008). Comparative histomorphometric and tomographic analysis of maxillary sinus floor augmentation in rabbits using autografts and xenografts. *J Biomed Mater Res Part B*, 86: 188-196.
- Skoglund A, Hising P, Young C (1996). A clinical and histologic examination in humans of the osseous response to implanted natural bone mineral. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 12: 194-199.
- Smiler D, Soltan M (2006). The bone grafting decision tree: a systematic methodology for achieving new bone. *Implant Dent*, 15(2): 122-128.

Smiler DG, Johnson P, Lozada JLe, Misch C, Rosenlicht J, Tatum Jr O, Wagner J (1992). Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am*, 36: 151-186.

Simunek A, Kopecka D, Somanathan RV, Pilathadka S, Brazda T (2008). Deproteinized bovine bone versus beta-tricalcium phosphate in sinus augmentation surgery: a comparative histologic and histomorphometric study. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 23: 935-942.

Sohn DS, Bae MS, Choi BJ, An KM, Shin HI (2009). Efficacy of demineralized bone matrix paste for maxillary sinus augmentation: a histologic and clinical study in humans. *OOOOE*, 108: 30-35.

Sommerfeldt D, Rubin C (2001). Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*, 10: 86-95.

Songür Mt, Şahin E, Tuğcan D, Kalem M, Kaplanoğlu G, Altun NŞ (2015). At kemiği kaynaklı kemik protein ekstrelerinin (Colloss-E) kaviter kemik defektlerinin tedavisindeki etkisi: Deneysel çalışma. *Acta Orthop Traumatol Turc*, 49(3): 311–318.

Soost F, Koch S, Stoll C, Amthauer H, Grosse-Siestrup C, Zorn P. (2001). Validation of bone conversion in osteoconductive and osteoinductive bone substitutes. *Cell and Tissue Banking*, 2: 77-86.

Spector M (1994). Anorganic bovine bone and ceramic analogs of bone mineral as implants to facilitate bone regeneration. *Clin Plast Surg*, 21(3): 437-444.

Stassen LF, Hislop WS, Still DM, Moos KF (1994). Use of anorganic bone in periapical defects following apical surgery: a prospective trial *Br J Oral Maxillofac Surg*, 32(2): 83-85.

Stevens MR, Emam HA (2011). Dental Implant Prosthetic Rehabilitation: Allogeneic grafting/Bone Graft Substitutes in Implant Dentistry. *Current Therapy in Oral Maxillofac Surg*, 157: 49-58.

Stevenson S (1999). Biology of bone grafts. *The Orth Clin North Am*, 30: 543-552.

Stübinger S, Dard M (2013). The rabbit as experimental model for research in implant dentistry and related tissue regeneration. *J Invest Surg*, 26: 266-282.

Tadjoedin ES, De Lange GL, Bronckers AL, Lyaruu DM , Burger EH (2003). Deproteinized cancellous bovine bone (bio-oss) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. *J Clin Periodontol*, 30(3): 261-270.

Taşkaldıran A (2013). Trombositten Zengin Plazma ve Trombositten Zengin Fibrin Yapılarının Kemik İyileşmesi Üzerindeki Etkilerinin Hayvan Modelinde Karşılaştırılması. Doktora Tezi. *Kırıkkale Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale*.

Tambini K (2001). Platelet Rich Plasma. UIC Dept OMFS Grand Rounds.

- Tiedeman JJ, Conolly JF, Strates BS, Lippiello L (1991). Treatment of nonunion by percutaneous injection of bone marrow and demineralized bone matrix. An experimental study in dogs. *Clin Orthop Relat Res*, 268: 294-302.
- Torabinejad M, Goodacre C, Sabeti M (2013). Principles and Practice of Single Implant and Restoration. Elsevier Health Sciences.
- Tovar N, Jimbo R, Gangolli R, Perez L, Manne L, Yoo D, Lorezoni F, Witek L, Coelho PG (2014). Evaluation of bone response to various anorganic bovine bone xenografts: an experimental calvaria defect study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 43(2): 251-260.
- Tözüm TF, Demiralp B (2003). Platelet-rich plasma: A promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc*, 69: 664-667.
- Trombelli L, Farina R (2008). Clinical outcomes with bioactive agents alone or in combination with grafting or guided tissue regeneration. *J Clin Periodontol*, 8: 117-135.
- Truumees E, Herkowitz HN (1999). Alternatives to autologous bone harvest in spine surgery. *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal* 12: 77-88.
- Urist MR, Dawson E (1981). Intertransverse process fusion with the aid of chemosterilized autolysed antigen-extracted allogenic (AAA) bone. *Clin Orthop*, 154: 97-113.
- Urist MR, Sato K, Brownell TI (1983). Human bone morphogenetic protein (h BMP). *Proc Soc Exp Biol Med*, 173: 194-197.
- Urist MR, Strates B (1970). Bone formation in implants of partially and wholly demineralized bone matrix. *Clin Orthop*, 71: 271-273.
- Xu H, Shimizu Y, Ooya K (2003). Experimental sinus grafting with the use of deproteinized bone particles of different sizes, *Clin Oral Implant Res*, 14: 548-555.
- Xu H, Shimizu Y, Onodera K, Ooya K (2005). Long-term outcome of augmentation of the maxillary sinus using deproteinised bone particles experimental study in rabbits. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 43: 40-45.
- Vaananen K, Zhao H (2002). Osteoclast function. Biology and Mechanisms. In: Bilezikian J P, Raisz LG, Rodan GA (eds). *Principles of Bone Biology. 2nd ed. Volume 1. San Diego, Academic Press*, 127-139.
- Van Steenberghe D, Callens A, Geers L, Jacobs R (2000). The clinical use of deproteinized bovine bone mineral on bone regeneration in conjunction with immediate implant installation. *Clin Oral Implants Res*, 11(3): 210-216.
- Valentini P, Abensur D, Densari D, Graziani JN, Hammerle C (1998). Histological evaluation of bio-oss in a 2-stage sinus floor elevation and implantation procedure. A human case report. *Clin Oral Implants Res*, 9(1): 59-64.
- Valentini P, Abensur D, Wenz B, Peetz M, Schenk R (2000). Sinus grafting with porous bone mineral (bio-oss) for implant placement: a 5-year study on 15 patients. *Int J Periodontics Restorative Dent*, 20(3): 245-253.

- Vehof JW, Takita H, Kuboki Y, Spauwen PH, Jansen JA (2002). Histological characterization of the early stages of bone morphogenetic protein-induced osteogenesis. *J Biomed Mater Res*, 61(3): 440-449.
- Waite PD, Morawetz RB, Zeiger HE, Pincock JL (1989). Reconstruction of cranial defects with porous hydroxylapatite blocks. *Neurosurg*, 25(2): 214-217.
- Walboomers XF, Jansen JA (2005). Bone tissue induction, using a COLLOSS-filled titanium fibre mesh-scaffolding material. *Biomaterials*, 26: 4779-4785.
- Watanabe K, Niimi A, Ueda M (1999). Autogenous bone grafts in the rabbit maxillary sinus. *OOOOE*, 88: 26-32.
- Whitman DH, Berry RL, Green DM (1997). Platelet gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg*, 55: 1294-1305.
- Wikesjo UM, Sorensen RG, Kinoshita A, Wozney JM (2002). RhBMP-2/alphaBSM induces significant vertical alveolar ridge augmentation and dental implant osseointegration. *Clin Implant Dent and Related Res*, 4: 174-182.
- Williams EM, Miller EM, (2003). Transmissible spongiform encephalopathies in nondomestic animals: origin transmission and risk factors. *Rev Sci Tech Off Int Epiz*, 22(1): 145-156
- Wolfe MW, Salkeld SL, Cook SD (1999). Bone morphogenetic proteins in the treatment of non-unions and bone defects: historical perspective and current knowledge. *The University of Pennsylvania Orthopaedic Journal*, 12: 1-6.
- Woo C, Li H, Baatrup A, Krause A, Kassem M, Bunger C, Lind M (2006). Effects of bone protein extract on human mesenchymal stem cells proliferation and differentiation. *J Biomed Mat Res*, 45: 552-556.
- Yılmaz S, Çakar G, Kuru B, Dirikan S, Yıldırım B (2009). Platelet-rich plasma in combination with bovine derived xenograft in the treatment of deep intrabony periodontal defects: a report of 20 consecutively treated patients. *Platelets*, 6: 432-440.
- Yokota S, Sonohara S, Yoshida M, Murai M, Shimokawa S, Fujimoto R, Fukushima S, Kokubo S, Nozaki K, Takahashi K, Uchida T, Yokohama S, Sonobe T (2001). A new recombinant human bone morphogenetic protein-2 carrier for bone regeneration. *Int J Pharm*, 223: 69-79.
- Yoon JS, Lee SH, Yoon HJ (2014). The influence of platelet-rich fibrin on angiogenesis in guided bone regeneration using xenogenic bone substitutes: A study of rabbit cranial defects. *J Cranio Maxillofac Surg*, 43: 105-113.
- You TM, Choi BH, Zhu SJ, Jung JH, Lee SH, Huh JY (2007). Platelet-enriched fibrin glue and platelet-rich plasma in the repair of bone defects adjacent to titanium dental implants. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 22: 417- 422.

Yu X, Hsieh SC, Bao W, Graves DT (1997). Temporal expression of PDGF receptors and PDGF regulatory effects on osteoblastic cells in mineralizing cultures. *Am J Physiol*, 272(5Pt1): 1709-1716.

Zhang M, Powers RM, Jr., Wolfinbarger L, Jr (1997). Effect(s) of the demineralization process on the osteoinductivity of demineralized bone matrix. *J Periodontol*, 68: 1085-1092.



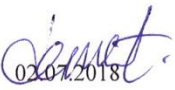
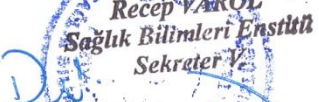
ÖZGEÇMİŞ

Isparta da doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini aynı ilde 2005 yılında tamamladı. Yükseköğrenimini Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesinde 2013 yılında bitirdi. 2014-2016 yılları arasında Van ilinde serbest veteriner hekim olarak çalıştı. Mesleğini 2017 yılından itibaren Süleyman Demirel Üniversitesi Şarkikaraağaç MYO da öğretim görevlisi olarak sürdürmektedir.



EKLER

EK 1. Tez Orijinallik Raporu

YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU	
Tarih: 02/07/2018	
Tez Başlığı / Konusu:	
Kemik Defektlerinin Onarımında Kollajenize At Kemik Greftinin Tek Başına Ve Trombositten Zengin Plazma (PRP) Uygulaması İle Birlikte Kullanımının Histopatolojik Ve Tomografik (Micro-Ct) Değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma	
Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 46 sayfalık kısmına ilişkin, 18/06/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 (Beş) tir. Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir: - Kabul ve onay sayfası hariç, - Teşekkür hariç, - İçindekiler hariç, - Simge ve kısaltmalar hariç, - Gereç ve yöntemler hariç, - Kaynakça hariç, - Alıntılar hariç, - Tezden çıkan yayınlar hariç, - 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit match size to 7 words) Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim. Gereğini bilgilerinize arz ederim.  02.07.2018	
Adı Soyadı: Demet GÖKDERE Öğrenci No: 139301028 Anabilim Dalı: Cerrahi Programı: Veteriner Statüsü: Y.Lisans ☒ Doktora ☐	
DANIŞMAN ONAYI UYGUNDUR  (Unvan, Ad Soyad, İmza) Prof. Dr. Nazmi ATASOY	ENSTİTÜ ONAYI UYGUNDUR  Recep VAROL Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sekreter V. (Unvan, Ad Soyad, İmza)

EK 2. Etik Kurul Raporu



T.C.
YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA KESİN SONUÇ ONAY BELGESİ

YUZUNCUYILUNIVERSITY (TURKEY)
ANIMAL RESEARCHES LOCAL ETHIC COMMITTEE
RESEARCH FINAL REPORT APPROVAL CERTIFICATE

Araştırmancının Adı	Kemik Defektlerinin Onarımında Kollajenize At Kemik Greftinin Tek Başına ve Trombositten Zengin Plazma (Prp) Uygulaması İle Birlikte Kullanımının Histopatolojik Ve Tomografik (Micro-Ct) Değerlendirilmesi: Deneysel Çalışma	
<i>Title of the Research</i>	Histopathologic and Tomographic (micro-CT) Evaluation of Collagenated Horse Bone Graft Alone and in Combination with Platelet Rich Plasma (PRP) Treatment in Repair of Bone Defects	
Araştırmacı(lar)	Yürütücü / Chief investigator : Prof.Dr. Nazmi ATASOY	
<i>Investigator(s)</i>	Yardımcı Araştırmacı(lar) / Co-investigator(s): Vet. Hek. Demet GÖKDERE	
Araştırmanın Başlama Tarihi / Research Starting Date: 25.02.2016		
Araştırmanın Bitiş Tarihi / Research Completion Date: 07.05.2018		
Proje Süresi / Total Time of Project: 2 yıl		
Proje No / Project Number: TYL-2016-5120		
Araştırmayı Destekleyen Kuruluş (varsa) / Funding institution(s) (if available):		
Destek Şekli ve Miktarı / Type and amount of funding: 6000 TL		
Karar: Yukarıda bilgileri verilen araştırma projesinin kesin sonuç raporu Yüzüncü Yıl Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 31/05/2018 tarih ve 2018/05 sayılı kararı ile kabul edilmiştir. Decision: Final report of the research project detailed above was approved by Yuzuncu Yil University Animal Researches Local Ethic Committee in the session held on 31/05/2018 (decision number 2018/05).		
	BAŞKAN/CHAIR Prof. Dr. Semiha DEDE	
 ÜYE Prof. Dr. N. Tuğba BİNGÖL	 ÜYE Prof. Dr. Sıddık KESKİN	 ÜYE Prof. Dr. Suphi DENİZ
 ÜYE Prof. Dr. Nalan ÖZDAL	 ÜYE Doç. Dr. Atilla DURMUŞ	 ÜYE Doç. Dr. Yıldırım BAŞBUĞAN
 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Ferda KARAKUŞ	 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Oruc ALLAHVERDİYEYEV	 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Cansel Yılmaz DEMİR
 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Hacer ŞAHİN AYDINYURT	 ÜYE Dr. Öğr. Ü. Şükrü ÖNALAN	 ÜYE Vet. Hek. Kerem OĞRAK
 ÜYE Vet. Hek. İsmail Hakkı BEHÇET	 ÜYE Zir. Müh. Kenan YILDIRIMOĞLU	